



ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



Russian Journal
of Biotherapy

3 /2011

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№3 Том 10 2011 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

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

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

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

Редколлегия

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

Редакционный совет

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

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

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

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

Почтовый адрес:

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

Подписной индекс 81679

Объем 7,5 усл.-печ. листов,
подписано в печать 05.07.2011
Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:
115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24.
Тел. +7 (495) 324 24 70; ronc@list.ru
Координаторы: Е.Г. Турнянская, Б.Б. Крюков (макет)

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Е.В. Степанова, К.Р. Зейналова
МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТРАСТУЗУМАБУ.....3

З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова, Е.Г. Славина
НКТ-КЛЕТКИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ИММУНИТЕТ.....9

Д.Ю. Блохин, Е.Ф. Чмутин, П.К. Иванов
**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ:
ФАКТОРЫ РОСТА, АНГИОГЕНЕЗА И АПОПТОЗА**.....17

И.Н. Григорьева, Т.К. Харатишвили, А.Ю. Барышников
**ВАСКУЛОГЕННАЯ МИМИКРИЯ –
АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕХАНИЗМ КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ ОПУХОЛИ?**.....25

Г.В. Какурина, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов
**ПОСТГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
В ПРОГНОЗЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМ ГОЛОВЫ И ШЕИ**.....31

П.М. Бычковский, А.А. Кладиев, С.О. Соломевич, С.Ю. Щеголев
**ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ:
СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, БИМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**.....37

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

М.В. Антонов, А.Х. Сабиров, Т.М. Сабиров, К.В. Уткин, В.В. Решетникова, А.Ю. Барышников, О.Д. Мустаев
**ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ
ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ТАРГЕТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ**.....47

А.В. Самойлов, В.В. Мартиросян, А.Ю. Барышников, Н.М. Сураева
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЕТУХА
В КАЧЕСТВЕ ПЕРЕНОСЧИКОВ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ
И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ
МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ**.....53

*В.М. Бухман, И.Б. Меркулова, Н.П. Ермакова, О.И. Коняева, Е.Л. Членова, Н.Ю. Кульбачевская,
Т.В. Абрамова, А.А. Сергеев, Ю.Е. Чукунова, А.Л. Николаев, Л.М. Михайлова*
**ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НА КРЫСАХ
ЛОКАЛЬНОГО УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СРЕДНЕЙ ИНТЕНСИВНОСТИ,
ГЕНЕРИРУЕМОГО УСТАНОВКОЙ «УСДТ»**.....57

И.В. Манина, Н.М. Сапрыкина, А.М. Козлов, И.Н. Михайлова, И.Н. Григорьева, Н.Н. Касаткина, А.Ю. Барышников
**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНОЙ GМ-CSF
СЕКРЕТИРУЮЩЕЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ
ПУТЕМ ПРЕИНКУБАЦИИ С ЦИТОКИНАМИ**.....61

А.В. Безгин, Л.А. Князева
**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕРАПИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА
В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И КЛИНИЧЕСКУЮ СИМПТОМАТИКУ
У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЗИТИВНОСТИ ПО РЕВМАТОИДНОМУ ФАКТОРУ**.....67

И.О. Чикилева, М.В. Киселевский, Т.В. Борисова, О.Г. Фотиади, А.В. Караулов
**ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ
БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ**.....71

Т.В. Осипова, Т.П. Рябых, З.А. Соколова, В.И. Карасева, Н.Б. Паклин
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТАТИЧЕСКОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ
В ФОРМАТЕ БИОЧИПА: РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ**.....77

В.А. Галынкин, Н.В. Кожемякина, Е.П. Ананьева, С.В. Гурина
**ДЕЙСТВИЕ УГЛЕВОДНЫХ ФРАКЦИЙ МИЦЕЛИЯ FOMES FOMENTARIUS
И GANODERMA APPLANATUM
НА РОСТ ПОДКОЖНО ПЕРЕВИТОЙ ОПУХОЛИ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ**.....83

Е.Д. Хадиева, И.Р. Лукманов, А.Х. Сабиров, К.О. Шилин, В.П. Зуевский, В.Л. Янин, В.Г. Бычков
**МОДЕЛИРОВАНИЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЖКТ
У СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ НА ФОНЕ СУПЕРИНВАЗИОННОГО ОПИСТОРХОЗА**.....87

Е.В. Степанова, И.А. Файнштейн
**ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ
ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**.....91

*О.В. Короткова, Т.Н. Заботина, Л.В. Скотаренко, А.А. Борунова,
Н.Ю. Очеева, И.К. Воротников, З.Г. Кадагидзе*
СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РМЖ.....95

*Д.В. Соколова, Е.В. Тазина, М.А. Кортава, П.К. Иванов, Е.В. Игнатьева, А.П. Полозкова, Е.М. Трещалина,
Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников*
**АНТИ-MUS-1 ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДОКСОРУБИЦИНА
ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛЬ**.....99

В.Н. Капинус, М.А. Каплан, И.С. Стиченкова, Е.В. Ярославцева-Исаева, А.М. Шубина
**ФЛТ БАЗАЛЬНО-КЛЕТОЧНОГО
И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ВЕРХНЕЙ И НИЖНЕЙ ГУБЫ**.....105

Берицивили А.И., Тупицын Н.Н., Лактионов К.П., Левкина Н.В., Кочоян Т.М., Керимов Р.А.
**ОСОБЕННОСТИ МИКРОМЕТАСТАЗИРОВАНИЯ
ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНОЙ ФОРМЫ РМЖ В КОСТНЫЙ МОЗГ**.....109

Список сокращений.....113
Правила подачи статей.....115

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 618.19-006.6-085.277.3:577.2.088

*Е.В. Степанова, К.Р. Зейналова***МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТРАСТУЗУМАБУ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация***Зейналова Камала Руфатовна, врач-онколог отделения химиотерапии и комбинированного лечения злокачественных опухолей НИИ клинической онкологии***адрес:** 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-96-80**e-mail:** kamka80@yahoo.com

Статья поступила 19.04.2011., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Трастузумаб широко используется в клинической онкологии для лечения HER-2⁺ рака молочной железы в комбинациях с химиотерапией. Однако накапливаются данные, что существует группа больных (15–25 %), имеющих первичную резистентность к трастузумабу. Молекулярно-биологические исследования позволили выявить ряд маркеров, которые могут предсказывать эффективность терапии с трастузумабом. К ним относятся фосфорилированный HER-2, EGFR, PTEN, PI3K и другие. В обзоре рассматриваются механизмы возникновения резистентности к трастузумабу, приводятся данные о клинической значимости данных маркеров.

Ключевые слова: рак молочной железы, Трастузумаб, молекулярно-биологические маркеры, резистентность.*E.V. Stepanova, K.R. Zeinalova***MECHANISMS OF TRASTUZUMAB RESISTANCE***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Trastuzumab is widely used drug for the treatment of HER-2/neu⁺ breast cancer in combination with chemotherapy. However, there is an evidence that some of patients (15–25 %) have primary Trastuzumab resistance. Molecular biological studies have revealed a number of markers that can predict the Trastuzumab efficacy. These include phosphorylated HER-2, EGFR, PTEN, PI3K and others. This review discusses the possible mechanisms of resistance to Trastuzumab. Here, we also discuss the data on the clinical significance of these markers.

Key words: breast cancer, Trastuzumab, molecular biomarkers, resistance.**Введение**

Рак молочной железы – одна из наиболее часто встречаемых опухолей у женщин. Примерно у 25 % женщин, имеющих РМЖ, при морфологическом исследовании определяется экспрессия/амплификация HER-2 (erbB2) [42]. Такие опухоли характеризуются агрессивным биологическим течением, ассоциированным с высоким риском прогрессирования после проведенного лечения, укорочением безрецидивной и общей выживаемости больных [51]. Создание препарата Трастузумаб (Герцептин), гуманизированного моноклонального антитела против HER-2 рецептора, позволило разработать высокоэффективные режимы лечения таких опухолей. Трастузумаб является высокоэффективным препаратом в комбинации с традиционной противоопухолевой терапией как при лечении метастатической болезни, так и в адъювантных или неоадъювантных режимах [17; 21; 24]. К сожалению, высокие результаты лечения достигаются не для всех больных HER-2⁺ РМЖ. Эффективность монотерапии Трастузумабом в I-й и последующих линиях терапии метастатического HER-2⁺ РМЖ составляет от 12 до 34 % с медианой продолжительности эффекта примерно 9 мес. То есть, в 66–88 % случаев имеет ме-

сто первичная резистентность к Трастузумабу [2; 10; 59]. Адъювантная терапия с включением Трастузумаба улучшает безрецидивную и общую выживаемость больных ранними формами HER-2⁺ РМЖ [45; 47]. Тем не менее, у 15 % из них развиваются отдаленные метастазы. Даже у женщин, эффективно леченных Трастузумабом в течение долгого времени, может развиться приобретенная резистентность к препарату. Отсутствие гиперэкспрессии/амплификации HER-2 в опухоли помогает выделить группу больных, которые с высокой вероятностью не ответят на терапию Трастузумабом. Актуальна разработка методов предсказания эффективности терапии Трастузумабом больных HER-2⁺ РМЖ. Понимание молекулярных механизмов противоопухолевой активности Трастузумаба, которые могут быть вовлечены в первичную или приобретенную резистентность, и поиск путей ее преодоления важно для дальнейшего улучшения выживаемости больных РМЖ с гиперэкспрессией HER-2. Механизмы действия Трастузумаба многочисленны и до конца не изучены. На моделях *in vivo* и в клинических испытаниях было показано, что Трастузумаб обладает не только цитостатическими, но и цитотоксическими свойствами. По крайней мере, частично эти свойства могут быть связаны с активацией антителозависимой клеточной цитотоксичности [15].

Другим механизмом действия Трастузумаба является блокирование отщепления внеклеточного домена HER-2 (p105) путем ингибирования активности матриксных металлопротеиназ [33]. В опухолях часто имеет место процесс отщепления внеклеточного фрагмента HER-2 металлопротеиназами, что приводит к образованию постоянно активированной формы рецептора, способной к передаче сигнала внутрь клетки без дополнительных стимулов. Трастузумаб при связывании с рецептором также вызывает снижение активности фосфатидилинозитол-3 киназы (PI3K), что приводит к блокированию пролиферации (за счет ареста в фазе G₁) опухолевых клеток [28] и повышает их чувствительность к запуску апоптоза [62]. Также показано, что Трастузумаб может снижать ангиогенную активность опухоли путем блокирования синтеза VEGF [26].

В этом обзоре будут рассмотрены только механизмы резистентности, ассоциированные с HER-2–тирозинкиназным сигнальным путем передачи сигнала внутрь клетки. Они могут быть разделены на несколько типов:

- Блокирование/активация нижележащих белков сигнального пути (потеря PTEN, активация pAkt, потеря активации pHER-2 и другие).
- Активация альтернативных рецепторов роста (гиперэкспрессия белков семейства эпидермального фактора роста, инсулиноподобного рецептора и других).
- Блокирование связывания Трастузумаба с рецептором (гиперэкспрессия MUC4).

Предполагается, что белки, участвующие в механизмах формирования резистентности к Трастузумабу, могут рассматриваться как молекулярно-биологические маркеры предикции резистентности к препарату.

Блокирование/активация нижележащих белков сигнального пути

По своей структуре HER-2–рецептор относится к трансмембранному, состоящим из внеклеточного домена (обеспечивает взаимодействие рецептора со специфическим лигандом), трансмембранной части и внутриклеточного домена с тирозинкиназной активностью [22]. Активация HER-2–рецептора приводит к фосфорилированию его внутриклеточного киназного домена, который, в свою очередь, активирует нижележащие сигнальные пути, такие как Sos-Ras-Raf-MAPK и PI3K. Активация PI3K запускает фосфорилирование белка Akt, что приводит к ингибированию апоптоза (через фосфорилирование Bad, члена семейства Bcl-2), дифференцировке и клеточному росту. Вовлечение белков Sos ведет к активации p21^{ras}, участвующего в стимуляции клеточной пролиферации.

Фосфорилированный HER-2 (pHER-2)

Активация HER-2 путем может происходить либо при гетеродимеризации с другими рецепторами семейства после связывания с различными лигандами-агонистами, либо при гомодимеризации в отсутствие каких-либо активных лигандов. В настоящее время определено, что основным сайтом фосфорилирования HER-2 является тирозиновый остаток 1248 [61].

В инвазивном HER-2⁺ РМЖ только в 12–14 % случаев наблюдается присутствие активированного pHER-2. Экспрессия pHER-2 ассоциируется с высокой степенью злокачественности опухоли, наличием метастазов в регионарных лимфоузлах, снижением безрецидивной и общей выживаемости больных [9; 13; 14; 54]. Показано, что случаи с гиперэкспрессией HER-2, но без pHER-2, имеют такой же относительно благо-

приятный прогноз, как и случаи с HER-2⁺ РМЖ [54]. Также экспрессия pHER-2 в опухолевых клетках ассоциирована с резистентностью к химиотерапии таксанами [32], но в то же время предсказывает чувствительность к монотерапии Трастузумабом и Трастузумаб-содержащим режимам лечения [39].

Предполагается, что опухоли с активированным сигнальным путем pHER-2 могут быть более чувствительны к действию анти-HER-2–антитела. Был исследован статус фосфорилирования по аминокислотному остатку 1248 (pHER-2 у1248) у 62 больных РМЖ, получавших Трастузумаб в монотерапии или комбинации с химиотерапией [20]. Обнаружено, что только 24 % HER-2⁺ опухолей имели активированный pHER-2 у1248. Ответ опухоли на лечение имел только тенденцию быть выше у pHER-2-положительных больных. Показано значительное удлинение медианы времени до прогрессирования при назначении Трастузумаб содержащих режимов (11,7 и 4,5 мес. соответственно у больных, положительных и отрицательных по pHER-2, p=0,001).

PI3K/Akt-сигнальный путь

PI3K/Akt-сигнальный путь регулирует важнейшие клеточные функции, такие как пролиферация клеток, их выживаемость, апоптоз, метаболизм, синтез различных протеинов, ангиогенез и инвазия [58]. На рисунке представлена краткая схема активации данного сигнального пути.

Активация PI3K тирозинкиназным рецептором ведет к фосфорилированию фосфатидилинозитола в D3 позиции, что приводит к образованию фосфатидилинозитол-3,4-бифосфата (PIP2) и фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата (PIP3). PIP2 и PIP3 связываются с серин-треониновой киназой Akt, что приводит к ее прикреплению к внутренней части цитоплазматической мембраны и активации.

При введении Трастузумаба происходит быстрое дефосфорилирование Akt, путем быстрого (в течение 30-минутной инфузии) повышения активности PTEN [36], в дальнейшем инактивация pAkt поддерживается ингибированием активности PI3K [23]. Основными механизмами возникновения резистентности к Трастузумабу, связанными с активацией PI3K/Akt-сигнального пути, являются постоянная активация Akt (pAkt), которая не блокируется Трастузумабом, и потеря PTEN.

Известно, что активация Akt белка в опухолевых клетках молочной железы происходит примерно в 40 % случаев за счет гиперэкспрессии или активации HER-2, мутационной активности онкогена Ras или инактивации гена PTEN [11; 52]. Постоянная активация pAkt ассоциирована с возникновением активных мутаций/увеличением числа копий онкогенов, гиперэкспрессией PI3K или рецепторов, активирующих PI3K.

В HER-2⁺ опухоли молочной железы гиперэкспрессия pAkt ассоциирована с неблагоприятными клинико-морфологическими факторами, в частности отрицательным гормональным статусом и поражением лимфоузлов [63]. Нарушения в HER-2/PI3K/Akt системе сопровождаются развитием резистентности к проводимой химио- и эндокринотерапии, в том числе и Трастузумабу, и сопровождается низкой безрецидивной и общей выживаемостью [52; 55; 63]. Гиперэкспрессия pAkt рассматривается как неблагоприятный прогностический и предсказательный фактор при HER-2⁺ РМЖ. Основным антагонистом киназы Akt является белок и липидная фосфатаза PTEN, который нейтрализует PI3K-зависимую активацию Akt (см. рис.) [57]. Потеря PTEN ассоциирована с повышением уровня pAkt в опухолевых клетках.

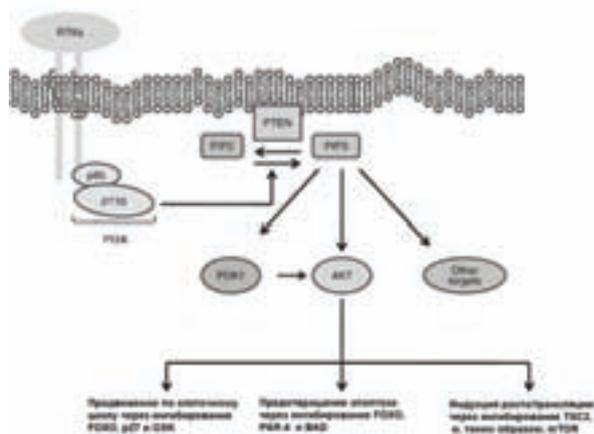


Рис. Краткая схема Р3К/Акт-сигнального пути.

Некоторые исследования показывают, что PTEN играет важную роль в регуляции апоптоза и прохождения опухолевых клеток по клеточному циклу [60].

PTEN

Онкосупрессор PTEN (фосфатаза и гомолог тензина) – белок, кодируемый геном PTEN, являясь частью сигнального пути, участвует в регуляции клеточного цикла. Гиперэкспрессия PTEN приводит к аресту клеточного цикла и индукции апоптоза. При мутациях и делециях PTEN белок теряет свою ферментативную активность, что приводит к активации пролиферации и снижению гибели клеток. Потеря PTEN приводит к повышению уровня PIP3, что имитирует стимуляцию ростовыми факторами.

При РМЖ мутации PTEN встречаются примерно в 5 % случаев, потеря гетерозиготности (делеция) PTEN локуса – в 40 % случаев [12], в общей сложности нарушения PTEN наблюдаются в 50 % случаев РМЖ [44]. Наиболее часто потеря функциональной активности PTEN вследствие делеции наблюдается при РМЖ с гиперэкспрессией HER-2 [31].

В отсутствие лечения, в частности Трастузумабом, большая часть белка PTEN находится в неактивном состоянии. При терапии Трастузумабом уровень активированного PTEN заметно повышается, что приводит к блокированию активации PIP3, и соответственно, Akt.

Показано, что потеря PTEN HER-2⁺ опухолевыми клетками сопровождается значительным снижением антипролиферативного эффекта Трастузумаба, что не сказывается на клетках, нелеченных Трастузумабом [36].

Согласно данным экспериментальных и клинических исследований на чувствительность HER-2⁺ клеток к монотерапии таксанами статус PTEN влияет совсем незначительно [36].

В случае же комбинированной терапии Трастузумабом и таксанами прослежена прямая взаимосвязь между потерей PTEN и устойчивостью опухолевых клеток к лечению. В исследовании J. Nagata et al. [36] с помощью иммуногистохимического метода определен уровень PTEN и проанализирована его корреляция с клиническим эффектом в двух группах больных метастатическим РМЖ. В 1-й группе 47 больных с HER-2⁺ опухолью получили комбинированную терапию Трастузумабом и таксанами (Паклитакселом или Доцетакселом). Во 2-й контрольной группе 37 больных без предварительного отбора по HER-2-статусу получили терапию таксанами без Трастузумаба. В 1-й группе об-

щий эффект комбинированной терапии был значительно выше у больных с опухолью с нормальным статусом PTEN, нежели у больных с потерей PTEN (35,7 % против 66,7 %; $p < 0,05$). Во 2-й группе результаты были равными по эффективности у больных с разным статусом PTEN.

Перспективы использования статуса PTEN, как предсказывающего эффективность лечения больных РМЖ Трастузумабом, являются многообещающими, однако для широкого внедрения его определения в клиническую практику необходимы еще дополнительные исследования.

Активация альтернативных рецепторов роста

Было показано, что активация многочисленных альтернативных путей ассоциировано с резистентностью к Трастузумабу в предклинических моделях. В настоящее время проводятся клинические исследования для подтверждения данной гипотезы.

Рецепторы семейства EGFR

Хотя Трастузумаб вызывает блокаду только HER-2-активированной передачи сигнала внутрь клетки через P3K-Akt и MAPK-пути, не оказывая влияния на другие рецепторы семейства HER, тем не менее, гомодимерные EGFR/EGFR и гетеродимерные EGFR/HER-3 комплексы способны активировать эти же пути в случае терапии Трастузумабом [39]. Так как препарат связывается с внеклеточным доменом HER2, не влияя на процесс димеризации рецепторов, препарат не способен вызывать блокаду лиганд-индуцированных EGFR/HER-2 и HER-2/HER-3-гетеродимеров [19].

При РМЖ гиперэкспрессия EGFR встречается в 16–36 % случаев и играет ключевую роль в стимуляции клеточной пролиферации, дифференцировке, миграции и выживаемости [25]. Гиперэкспрессия EGFR часто ассоциирована с мутациями и амплификациями гена EGFR, увеличением коэкспрессии лигандов рецепторов (TGF-альфа, амфирегулин), гетеродимеризацией и перекрестной связью с HER-2 или другими членами Erb-семейства [8].

Коэкспрессия EGFR и HER-2 наблюдается примерно в 30 % случаев РМЖ и ассоциируется с неблагоприятным прогнозом и резистентностью к эндокринотерапии даже при положительном гормональном статусе [3; 27; 48]. Активация сигнального пути EGFR может снижать эффективность терапии Трастузумабом [50]. Блокада обоих рецепторов при таких опухолях является рациональной стратегией, которая может устранить резистентность к Трастузумабу [56].

Рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R)

Другим трансмембранным рецептором, стимулирующим пролиферацию опухолевых клеток, является IGF-1R, который широко экспрессируется на опухолевых клетках, резистентных к Трастузумабу. В предклинических исследованиях было показано, что антитела против IGF-1R восстанавливают чувствительность опухолевых клеток к Трастузумабу [39; 40].

В клинических исследованиях, изучающих факторы, способные предсказать эффективность неoadьювантного режима Трастузумаб+Винорельбин, у больных операбельным HER-2⁺ РМЖ показано, что экспрессия IGF-1R на мембране опухолевых клеток ассоциирована с низким ответом на терапию (50 % против 97 %, $p=0,001$) [18].

p27

Ингибитор циклин-зависимых киназ (Cdk) p27 является нижележащим регулятором многочисленных сходящихся сигнальных путей рецепторов роста, включая EGFR, HER-2 и IGF-1R. Показано, что HER-2⁺ опухолевые клетки, резистентные к Трастузумабу, имеют низкий уровень p27, его комплекса p26/Cdk2 и соответственно высокую скорость пролиферации [38]. Когда экспрессия p27 в клетках восстанавливалась при фармакологической индукции или трансфекции, чувствительность к Трастузумабу также увеличивалась.

Блокирование связывания Трастузумаба с рецептором

Одним из возможных механизмов возникновения резистентности к Трастузумабу является блокирование его связывания с HER-2 либо за счет отщепления внеклеточного домена рецептора, содержащего сайт связывания препарата, либо за счет его «маскировки» различными белками на поверхности опухолевых клеток.

p95HER-2

Как было сказано выше, матриксные металлопротеиназы способны отщепить внеклеточный домен HER-2, что приводит к образованию постоянно активированной укороченной формы рецептора p95HER-2, не имеющего сайта связывания с Трастузумабом. Трастузумаб не способен подавить активность такого рецептора. Экспрессия полноразмерного и укороченного HER-2 рецептора была оценена в 337 образцах первичного РМЖ и 81 образцах метастатических лимфатических узлов с использованием Вестерн-блоттинга [34]. Укороченная форма p95HER-2 обнаружена в 2,1 % случаев при отсутствии HER-2 в опухоли, в 19,5 % – при низкой экспрессии HER-2, в 31,8 % – при средней и в 60 % – при высокой гиперэкспрессии HER-2. Причем частота гиперэкспрессии p95HER-2 была выше у больных HER-2⁺ РМЖ, имеющих метастазы в региональные лимфоузлы, по сравнению с теми, у которых метастазы отсутствовали [7; 34]. Хотя данные *in vitro* показывают, что Трастузумаб может блокировать отщепление внеклеточного домена HER-2 и, соответственно, появление постоянно активного p95HER-2 [33], ретроспективные исследования показали высокую корреляцию между присутствием p95HER-2 и клинической резистентностью к Трастузумабу [49]. В этом исследовании чувствительность к Трастузумабу 46 больных метастатическим РМЖ сравнивалась с экспрессией p95HER-2, измеренной иммунофлуоресцентным методом. Эффект на терапию Трастузумабом наблюдался у 1 из 9 (11,1 %) больных с экспрессией p95HER-2 и 19 из 37 (51,4 %) без экспрессии полноценного HER-2 в ткани опухоли. Кроме того Трастузумаб может связываться с внеклеточным доменом рецептора, циркулирующим в крови больных, формируя комплекс. Период полувыведения этого комплекса, как было обнаружено на предклинических моделях и в популяционных фармакокинетических исследованиях, меньше чем свободного Трастузумаба [2; 5]. Во II фазе клинических исследований по оценке эффективности самостоятельного использования Трастузумаба при HER-2⁺ метастатическом РМЖ показано, что концентрация в плазме крови p95HER-2 выше чем 500 нг/мл ассоциируется с укорочением периода полувыведения Трастузумаба из организма и субтерапевтического падения уровня препарата [2]. Уровень p95HER-2 долгое время рассматривался как потенциальный маркер предсказания ответа на лечение. Но анализ 4 клинических исследований Трастузумаба при метастатическом РМЖ показал, что как начальный уровень p95HER-2, так и степень его снижения во время лечения обладает низкой предсказывающей значимостью [29].

Муцин 4 (MUC4)

MUC4 – гетеродимерный мембранный муцин-гликопротеин, кодируемый геном, располагающийся на хромосоме 3q29 [35]. Как показано, MUC4 связываясь с HER-2 рецептором, затрудняет связывание Трастузумаба с ним [37; 46]. Интересен тот факт, что связываясь с MUC4, HER-2 не способен взаимодействовать не только с Трастузумабом, но и с другими членами HER-семейства (EGFR, HER-3). Несмотря на непосредственное блокирование активации HER-2, MUC4 не оказывает влияния на общий уровень экспрессии рецептора [6; 46]. Также MUC4 ингибирует узнавание иммунной системой опухолевых клеток, усиливает опухолевую прогрессию, метастазирование и ингибирует апоптоз [6].

При иммуногистохимических исследованиях было показано, что MUC4 локализуется на люминальной поверхности как нормальных, так и опухолевых кровеносных сосудов, экспрессируется в эпителиальных и эндотелиальных клетках [64]. Экспрессия MUC4 наблюдается в различных эпителиальных тканях, в том числе трахее, легких, желудке, кишечнике, шейке матки [1]. Гиперэкспрессия MUC4 наблюдается при многих солидных опухолях: РМЖ, яичников, поджелудочной железы, легкого, шейки матки, простаты, желчного пузыря [30; 41; 53]. В некоторых исследованиях было показано, что он вовлечен в механизмы прогрессирования и метастазирования опухоли [6]. Так, гиперэкспрессия MUC4 выше в опухолевых клетках метастазов в лимфоузлы, чем в соответствующей первичной ткани РМЖ. При некоторых злокачественных новообразованиях, в том числе и РМЖ гиперэкспрессия MUC4 – это маркер неблагоприятного исхода течения болезни [30; 53].

В исследованиях *in vitro* показано, что экспрессия MUC4 выше в Трастузумаб-резистентной клеточной линии, чем в Трастузумаб-чувствительных клеточных линиях [37]. Клиническое значение гиперэкспрессии MUC4 для прогнозирования резистентности РМЖ к Трастузумабу требует дальнейшего изучения.

Комплекс CD44/ полимер гиалуронана

CD44 – трансмембранный рецептор для гиалуронана. Связывание с полимером гиалуронана с CD44 активирует RAS и PI3K сигнальные пути передачи сигнала [4]. В исследованиях *in vivo* и *in vitro* было показано, что комплекс CD44/ полимер гиалуронана может затруднять связывание Трастузумаба с HER-2 рецептором за счет мимикрии близлежащего эпитопа [16; 43]. Однако трансляционные исследования у больных, получавших Трастузумаб, не проводились.

Заключение

Таким образом, в последнее время накапливается все больше данных о том, что определение молекулярно-биологических маркеров дает дополнительную информацию о возможной эффективности использования химиотерапии с использованием Трастузумаба у больных РМЖ. Дополнительные исследования позволят выделить значимые молекулярно-биологические маркеры, пригодные к использованию в клинической практике. Также эти исследования позволят разработать новые препараты направленного действия для повышения эффективности лечения РМЖ.

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

Литература

1. Audie J.P., Janin A., Porchet N. et al. Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization // *J Histochem Cytochem.* – 1993. – 41. – P. 1479–85.
2. Baselga J., Tripathy D., Mendelsohn J. et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer // *J Clin Oncol.* – 1996. – 14. – P. 737–44.
3. Bhamrah R., Julka P.K., Nair O. et al. Correlations between epidermal growth factor receptor, her-2-neu and estrogen receptor in carcinoma breast-A study from cancer centre in India // *J Clin Oncology.* – 2008. – 26(15S). – P. 22173.
4. Bourguignon L.Y., Zhu H., Zhou B. et al. Hyaluronan promotes CD44v3–2 interaction with Grb2–185(HER2)... // *J Biol Chem.* – 2001. – 276. – P. 48679–92.
5. Bruno R., Washington C.B., Lu J-F. et al. Population pharmacokinetics of trastuzumab in patients With HER2⁺ metastatic breast cancer // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2005. – 56. – P. 361–9.
6. Carraway K.L., Price-Schiavi S.A., Komatsu M. et al. Muc4/sialomucin complex in the mammary gland and breast cancer // *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* – 2001. – 6. – P. 323–37.
7. Christianson T.A., Doherty J.K., Lin Y.J. et al. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer // *Cancer Res.* – 1998. – 58. – P. 5123–9.
8. Ciardiello F., Tortora G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs // *Eur. J. Cancer.* – 2003. – 39(10). – P. 1348–54.
9. Cicenias J., Urban P., Kung W. et al. Phosphorylation of tyrosine 1248-ERBB2 measured by chemiluminescence-linked immunoassay is an independent predictor of poor prognosis in primary breast cancer patients // *Eur J Cancer.* – 2006. – 42. – P. 636–45.
10. Cobleigh M.A., Vogel C.L., Tripathy D. et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER-2 overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease // *J Clin Oncol.* – 1999. – 17. – P. 2639–48.
11. Datta S.R., Brunet A., Greenberg M.E. Cellular survival: a play in three Acts // *Genes Dev.* – 1999. – 13. – P. 2905–27.
12. Depowski P.L., Rosenthal S.I., Ross, J.S. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer // *Mod. Pathol.* – 2001. – 14. – P. 672–6.
13. DiGiovanna M.P., Stern D.F., Edgerton S.M. et al. Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients // *J Clin Oncol.* – 2005. – 23. – P. 1152–60.
14. Frogne T., Laenkholm A-V., Lyng M.B. et al. Determination of HER-2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors // *Breast Cancer Res.* – 2009. – 11(1). – P. R11.
15. Gennari R., Menard S., Fagnoni F. et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2 // *Clin Cancer Res.* – 2004. – 10. – P. 5650–5.
16. Ghatak S., Misra S., Toole B.P. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway // *J Biol Chem.* – 2002. – 277. – P. 38013–20.
17. Gonzalez-Angulo G.N., Hortobagyi F.J., Esteva et al. Adjuvant therapy with trastuzumab for Her-2/neu-positive breast cancer // *Oncologist.* – 2006. – 11. – P. 857–67.
18. Harris L.N., You F., Schnitt S.J. et al. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer // *Clin Cancer Res.* – 2007. – 13. – P. 1198–207.
19. Holbro T., Beerli R.R., Maurer P. et al. The ErbB2-ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2003. – 100. – P. 8933–8.
20. Hudelist G., Kostler W.J., Attems J. et al. Her-2/neu-triggered intracellular tyrosine kinase activation: in vivo relevance of ligand-independent activation mechanisms and impact upon the efficacy of trastuzumab-based treatment // *Br. J. Cancer.* – 2003. – 89. – P. 983–91.
21. Hudis C.A. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. // *N. Engl. J. Med.* – 2007. – 357(1). – P. 39–51.
22. Hung M-C., Lau Y-K. Basic Science of HER-2/neu: A Review // *Seminars in Oncology.* – 1999. – 26(4). – Suppl 12. – P. 51–9.
23. Ignatoski K.M., Maehama T., Markwart et al. ERBB-2 overexpression confers PI 3_kinase-dependent invasion capacity on human mammary epithelial cells // *Br. J. Cancer.* – 2000. – 82. – P. 666–74
24. Jakisch C. Her-2-positive metastatic breast cancer: optimizing trastuzumab-based therapy. // *Oncologist.* – 2006. – 11. – P. 34–41.
25. Klijn J.G., Berns P.M., Schmitz P.I., Foekens J.A. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients // *Endocr. Rev.* – 1992. – 13(1). – P. 3–17.
26. Klos K.S., Zhou X., Lee S. et al. Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB2-mediated angiogenesis... // *Cancer.* – 2003. – 98. – P. 1377–85.
27. Kurokawa H., Lenferink A.E., Simpson J.F. et al. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells // *Cancer Res.* – 2000. – 60. – P. 5887–94.
28. Lane H.A., Motoyama A.B., Beuvink I., Hynes N.E. Modulation of p27/Cdk2 complex formation through 4D5-mediated inhibition of HER2 receptor signaling // *Ann Oncol.* – 2001. – 12. – Suppl. 1. – P.21–2.
29. Lennon S., Barton C., Banken L. et al. Utility of serum HER2 extracellular domain assessment in clinical decision making: pooled analysis of four trials of trastuzumab in metastatic breast cancer // *J Clin Oncol.* – 2009. – 27. – P. 1685–93.

30. *Llinares K., Escande F., Aubert S. et al.* Diagnostic value of MUC4 immunostaining in distinguishing epithelial mesothelioma and lung adenocarcinoma // *Mod Pathol.* – 2004. – 17. – P. 150–7.
31. *Lu Y., Lin Y.Z., LaPushin R. et al.* The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells // *Oncogene.* – 1999. – 18. – P. 7034–45.
32. *Modi S., DiGiovanna M.P., Lu Z. et al.* Phosphorylated/activated HER2 as a marker of clinical resistance to single agent taxane chemotherapy for metastatic breast cancer // *Cancer Invest.* – 2005. – 23. – P. 483–7.
33. *Molina M.A., Codony-Servat J., Albanell J. et al.* Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her-2 ectodomain cleavage in breast cancer cells // *Cancer Res.* – 2001. – 61. – P. 4744–9.
34. *Molina M.A., Saez R., Ramsey E.E. et al.* NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with... // *Clin Cancer Res.* – 2002. – 8. – P. 347–53.
35. *Moniaux N., Escande F., Porchet N. et al.* Structural organization and classification of the human mucin genes // *Front Biosci.* – 2001. – 6. – P. 1192–206.
36. *Nagata Y., Lan K.H., Zhou X. et al.* PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients // *Cancer Cell.* – 2004. – 6. – P. 117–27.
37. *Nagy P., Friedlander E., Tanner M. et al.* Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line // *Cancer Res.* – 2005. – 65. – P. 473–82.
38. *Nahta R., Takahashi T., Ueno N.T. et al.* P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells // *Cancer Res.* – 2004. – 64. – P. 3981–6.
39. *Nahta R., Yu D., Hung M.C. et al.* Mechanisms of disease: Understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer // *Natl Clin Pract Oncol.* – 2006. – 3. – P. 269–80.
40. *Nahta R., Yuan L.X., Zhang B. et al.* Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2... // *Cancer Res.* – 2005. – 65. – P. 1118–28.
41. *Ogata S., Uehara H., Chen A., Itzkowitz S.H.* Mucin gene expression in colonic tissues and cell lines // *Cancer Res.* – 1992. – 52. – P. 5971–8.
42. *Owens M.A., Horten M.C., da Silva M.M. et al.* Her2 amplification ratios by immunofluorescence in situ hybridization... // *Clin. Breast Cancer.* – 2004. – 5. – P. 63–9.
43. *Palyi-Krek Z., Barok M., Isola J. et al.* Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalization in trastuzumab resistant breast cancer // *Eur J Cancer.* – 2007. – 43. – P. 2423–33.
44. *Parsons R., Simpson L.* PTEN and cancer // *Methods Mol. Biol.* – 2003. – 222. – P. 147–66.
45. *Piccart-Gebhart M.J., Procter M., Leyland-Jones B. et al.* Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer // *N Engl J Med.* – 2005. – 353. – P. 1659–72.
46. *Price-Schiavi S.A., Jepsen S., Li P. et al.* Rat Muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-ErbB2 antibodies to... // *Int J Cancer.* – 2002. – 99. – P. 783–91.
47. *Romond E.H., Perez E.A., Bryant J. et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer // *N Engl J Med.* – 2005. – 353. – P. 1673–84.
48. *Sassen A., Rochon J., Wild P. et al.* Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients // *Breast Cancer Res.* – 2008. – 10(1). – P. 2–7.
49. *Scaltriti M., Rojo F., Ocana A. et al.* Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 receptor, and response to anti-HER-2 therapies in breast cancer // *J Natl Cancer Inst.* – 2007. – 99. – P. 628–38.
50. *Singer C.F., Köstler W.J., Hudelist G.* Predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy in breast cancer: Current standards and future strategies // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – 1786(2). – P. 105–13.
51. *Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G. et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene // *Science.* – 1987. – 235. – P. 177–82.
52. *Stål O., Pérez-Tenorio G., Akerberg L. et al.* Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy // *Breast Cancer Res.* – 2003. – 5. – P. 37–44.
53. *Tamada S., Shibahara H., Higashi M. et al.* MUC4 is a novel prognostic factor of extrahepatic bile duct carcinoma // *Clin Cancer Res.* – 2006. – 12. – P. 4257–564.
54. *Thor A.D., Liu S., Edgerton S. et al.* Activation (tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): A study of incidence and correlation with outcome in breast cancer // *J Clin Oncol.* – 2000. – 18. – P. 3230–9.
55. *Tokunaga E., Kimura Y., Oki E. et al.* Akt is frequently activated in HER-2/neu-positive breast cancers and associated with poor prognosis among hormone-treated patients // *Int J Cancer.* – 2006. – 118. – P. 284–9.
56. *Valabrega G., Montemurro F., Aglietta M.* Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer // *Annals of Oncology.* – 2007. – 18. – P. 977–84.
57. *Vazquez F., Seller W.R.* The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signalling // *Biochem Biophys Acta.* – 2000. – 1470. – P. 21–35.
58. *Vivanco L., Sawyers C.L.* The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in human cancer // *Nat Rev Cancer.* – 2002. – 2. – P. 489–501.
59. *Vogel C.L., Cobleigh M.A., Tripathy D. et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer // *J Clin Oncol.* – 2002. – 20. – P. 719–26.
60. *Weng L.P., Brown J.L., Eng C.* PTEN coordinates G(1) arrest by downregulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity... // *Hum Mol Genet.* – 2001. – 10. – P. 599–604.
61. *Wolf-Yadlin A., Kumar N., Zhang Y. et al.* Effects of HER2 overexpression on cell signaling networks governing proliferation and migration // *Mol. Syst. Biol.* – 2006. – 2. – P. 54.
62. *Yakes F.M., Chinratanalab W., Ritter C.A. et al.* Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action // *Cancer Res.* – 2002. – 62. – P. 4132–41.
63. *Yanyuan Wu, Mohamed H., Chillar R. et al.* Clinical significance of Akt and HER2/neu overexpression in African-American and Latina women with breast cancer // *Breast Cancer Research.* – 2008. – 10. – P. 3.
64. *Zhang J., Theodore G., Yasin M. et al.* MUC4 expression at the apical surfaces of endothelial cells: A new contributor to the cell surface properties of blood vessels // *Ophthalmol Vis Sci.* – 2006. – 47. – Abstr. 5006.

УДК 616-006-097:612.017.1

*З.Г. Кадагидзе, А.И. Черткова, Е.Г. Славина***NKT-КЛЕТКИ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ИММУНИТЕТ***РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва***Контактная информация***Кадагидзе Заира Григорьевна, д-р мед. наук, профессор, заведующая централизованным клинико-лабораторным отделом***Адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.:** +7(495)324-94-74**e-mail:** kad-zaira@yandex.ru

Статья поступила 19.04.2011., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

В обзоре дана краткая характеристика основных свойств NKT-клеток, их субпопуляций, особенностей их активации и роли в противоопухолевом иммунитете.

Ключевые слова: NKT-клетки, активация NKT-клеток, противоопухолевый иммунитет.*Z.G. Kadagidze, A.I. Chertkova, E.G. Slavina***NKT-CELLS AND ANTITUMOR IMMUNITY***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

This review summarizes the main features of NKT-cells, their subpopulations and the canonical pathways of their activation. We also discuss the role of NKT in antitumor immunity.

Key words: NKT-cells, activation of NKT-cells, antitumor immune response.**Введение**

В ответе организма на опухоль участвуют различные клеточные популяции. Среди них NK-клетки, Т-клетки, макрофаги. Эти популяции включают в себя как клетки-эффекторы противоопухолевого иммунитета, так и клетки-супрессоры, и они достаточно хорошо изучены. В последнее время значительное внимание уделяется NKT-клеткам, представляющим собой минорную популяцию Т-клеток, которая благодаря своей аутореактивности и способности быстро продуцировать достаточные количества различных цитокинов, обеспечивает связь между врожденным и адаптивным звеньями иммунитета и играет важнейшую, возможно, уникальную роль в регуляции иммунного ответа при различных патологических состояниях:

- аутоиммунных процессах, аллергических заболеваниях и астме,
- воспалении и трансплантационном иммунитете,
- различных инфекционных заболеваниях, а также в модуляции противоопухолевого иммунного ответа [69; 75].

Основные субпопуляции NKT-клеток

Термин NKT-клетки впервые появился в публикациях в 1995 г. [34]. Первоначально эти клетки были определены как субпопуляция Т-клеток, которые обладают некоторыми свойствами NK-клеток, в частности экспрессируют маркер NK1.1 (NKR-P1 или CD161) [5]. В дальнейшем стало очевидным, что не все NKT-клетки являются NK1.1⁺ [36], и что эта молекула экспрессируется также МНС I- и МНС II-зависимыми Т-клетками после активации [3; 58]. Крупным научным достижением явилось открытие того, что NK1.1⁺ Т-клетки «наивных» мышей распознают антигены в комплексе с неклассической МНС I-подобной анти-

генпрезентирующей молекулой CD1d, входящей в семейство CD1-гликопротеинов, представляющих липидные и гликолипидные антигены Т-клеткам [5; 55]. По мнению D.J. Godfrey et al. наиболее точным является определение NKT-клеток как CD1d-зависимых NK-подобных Т-лимфоцитов [19]. Эти клетки обнаружены у животных разных видов и у человека среди Т-клеток печени, селезенки, тимуса, костного мозга и периферической крови. NKT-клетки привлекают большое внимание исследователей из-за своей необычной способности при активации очень быстро секретировать большие количества Th1 (IFN- γ), и/или Th2 (IL-4 и IL-13) цитокинов [21; 69]. Они могут влиять на функцию различных клеточных популяций, включая CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, дендритные клетки (ДК), миелоидные супрессорные клетки (MDSC), NK-клетки, В-клетки, нейтрофилы, и могут как инициировать иммунный ответ, так и подавлять его. По мнению многочисленных исследователей, регуляторная функция отражает истинную физиологическую роль NKT-клеток [18; 26; 33; 46; 75].

NKT-клетки являются истинными Т-лимфоцитами, так как в отличие от NK-клеток экспрессируют антиген-специфический Т-клеточный рецептор (TCR $\alpha\beta$ ⁺). В настоящее время предполагается существование двух типов NKT-клеток: I и II типа. Основным общим свойством NKT-клеток I и II типов является их рестрикция по CD1d, у CD1d-дефицитных мышей отсутствуют все NKT-клетки. Наиболее хорошо изучены NKT-клетки I типа или инвариантные NKT (iNKT), которым посвящено большинство исследований, касающихся NKT-клеток. Они экспрессируют TCR, в состав которого входит инвариантная α -цепь V α 14Ja18 у мышей (образует пары с V β 8, V β 2 или V β 7) и V α 24Ja18 у человека (образует пару с V β 11). NKT-клетки II типа экспрессируют более разнообразный TCR, и они значительно менее изучены [57].

В экспериментальных исследованиях для определения функциональных различий между двумя типами NKT-клеток используются CD1d- и α 18- дефицитные мыши. У последних отсутствуют только NKT-клетки I типа. У человека количество $V\alpha 24^+$ NKT-клеток (iNKT) в периферической крови и в печени значительно ниже, чем количество гомологичных $V\alpha 14^+$ клеток у мышей. По данным разных авторов процентное содержание iNKT-клеток в периферической крови здоровых доноров в среднем составляет 0,2–0,6 % от общего числа T-клеток [21; 30]. Использование тетрамеров CD1d, нагруженных α -GalCer (CD1d – α -GalCer тетрамеры; α -галактозилцерамид – гликолипид, полученный из морских губок или микроорганизмов, симбионтов этих губок, является мощным активатором iNKT-клеток) дало возможность идентифицировать iNKT-клетки у мышей с помощью проточной цитометрии.

К сожалению, тетрамеры, позволяющие идентифицировать всю популяцию NKT-клеток II типа, в настоящее время неизвестны, хотя некоторые из этих клеток можно идентифицировать с помощью CD1d – сульфатид тетрамеров [29]. У человека, в отличие от мышей, на α -GalCer могут также отвечать некоторые NKT-клетки II типа, поэтому для определения NKT-клеток I типа у человека CD1d – α -GalCer тетрамеры используют в комбинации с анти- $V\alpha 24$ антителами [20]. У мышей NKT-клетки I типа включают в себя 2 субпопуляции: $CD4^+$ и $CD4^-CD8^-$ (двойную негативную). По данным J.E. Gumperz et al. [21] CD1d – α -GalCer тетрамер позитивные T-клетки периферической крови человека также включают две субпопуляции: $CD4^+$ и $CD4^-$ и, в отличие от мышей, определенный процент как $CD4^+$, так и $CD4^-$ NKT-клеток экспрессирует молекулу CD8 [21; 30; 38; 76]. Оказалось, что эти субпопуляции iNKT-клеток различаются как по экспрессии некоторых лимфоцитарных маркеров и рецепторов хемокинов, так и по своим функциональным характеристикам [21; 32; 33]. По данным J.E. Gumperz et al. [21] и P.T. Lee et al. [32]. $CD4^-$ популяция NKT-клеток периферической крови человека продуцирует *ex vivo* главным образом Th1 цитокины, в частности – IFN- γ , в то время как $CD4^+$ -популяция продуцирует как Th1– так и Th2–цитокины [21; 32]. Но L.P. Ho et al. показали, что $V\alpha 24^+$ NKT-клетки человека с фенотипом $CD4^-CD8\alpha^+$, обладающие высокой цитолитической активностью, способны *in vitro* подавлять пролиферацию активированных T-клеток [27]. Помимо CD161 iNKT экспрессируют и другие маркеры NK-клеток, NKG2D, CD94, CD16 и CD56 и др. [20; 30; 32]. Маркеры CD56 и CD16 в сочетании с T-клеточным маркером CD3 часто используют в клинических исследованиях для определения NKT-клеток периферической крови. Однако как и маркер CD161, эти NK-клеточные маркеры, экспрессируют не все NKT-клетки [20; 38].

Активация NKT-клеток

TCR NKT-клеток позволяет им распознавать как ауто-, так и чужеродные липидные/гликолипидные антигены, представляемые антигенпрезентирующей клеткой (АПК) в комплексе с молекулой CD1d. Распознавание NKT-клетками липидных/гликолипидных антигенов в комплексе с CD1d означает, что они отвечают на класс антигенов, игнорируемый обычными T-клетками, распознающими пептидные лиганды в комплексе с продуктами МНС I и II класса. CD1d экспрессируется на $CD4^+CD8^+$ тимоцитах, гепатоцитах, ДК, В-клетках и макрофагах. Решающую роль в активации NKT-клеток играют, по-видимому, ДК [7; 56; 71]. Некоторые экзогенные бактериальные

гликолипидные антигены, презентруемые АПК в комплексе с CD1d, могут прямо активировать iNKT-клетки. В случае некогатных антигенов активация может осуществляться непрямом путем провоспалительными цитокинами (IL-12, IL-18), продуцируемыми ДК в ответ на связывание Toll-like рецепторов ДК с соответствующими TLR-лигандами. При этом необходимо также взаимодействие TCR NKT-клеток с эндогенными гликолипидами, презентруемыми ДК в комплексе с CD1d [49; 71], хотя в некоторых случаях экспрессия CD1d на АПК не требуется [45]. Для активации NKT-клеток I типа в экспериментальных исследованиях наиболее часто используется гликолипид α -GalCer, который рассматривается как искусственный аналог естественных эндогенных и экзогенных лигандов. Некоторые из NKT-клеток II типа способны активироваться сульфатидом – наиболее характерным галактолипидом миелиновой оболочки аксонов центральной нервной системы [29]. Известные в настоящее время лиганды, способные активировать iNKT- и не iNKT-клетки человека и мышей, помимо α -GalCer и его аналогов включают в себя бактериальные и нормальные эндогенные гликолипиды, фосфолипиды и гликолипиды опухолей. Некоторые из этих молекул оказывают иммунопотенцирующее действие, в то время как другие могут отрицательно влиять на активность NKT-клеток. Идентификация эндогенных лигандов NKT-клеток имеет первостепенное значение для полного понимания развития и функционирования этой популяции T-клеток. Одним из установленных эндогенных лигандов является лизосомальный гликофинголипид *isoglobotrihexosylceramide* (iGb3), способный *in vitro* активировать большую часть iNKT-клеток человека и мышей [8; 71]. При активации NKT-клетки очень быстро секретируют большие количества Th1- и/или Th2-цитокинов. Эту особенность NKT-клеток связывают, в частности, с присутствием в них готовой mRNA таких цитокинов, как, например, IFN- γ и IL-4. Предполагается, что распознавание эндогенных антигенов приводит к постоянному накоплению в клетках цитокиновой mRNA, что поддерживает NKT-клетки в состоянии, готовом к быстрому осуществлению своих функций при дополнительном активационном сигнале [35]. NKT-клетки могут продуцировать также и другие цитокины: IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IL-21, TNF- α и GM-CSF [21].

На функциональную активность iNKT-клеток оказывают влияние различные факторы микроокружения: присутствие тех или иных цитокинов, активационный статус других субпопуляций лимфоцитов, характер взаимодействия с клетками, презентрующими комплекс CD1d/липид [11; 70; 72; 77]. N.Y. Crowe et al. продемонстрировали тканеспецифические различия в функционировании NKT-клеток. Они обнаружили, что адаптивный перенос NKT-клеток печени приводил к практически полному подавлению роста MCA-индуцированной саркомы и меланомы B16F10 у мышей $\alpha 18^{-/-}$. В то же время NKT-клетки селезенки и тимуса такой способностью не обладали [12]. Решающее значение для генерирования эффективного ответа на соответствующие гликолипиды имеет взаимодействие iNKT-клеток с АПК, экспрессирующими CD1d. Презентация α -GalCer незрелыми ДК в комплексе с CD1d индуцирует активацию iNKT, экспрессию CD40L на них и продукцию ими IFN- γ . IFN- γ и CD40-CD40L взаимодействие незрелых ДК с iNKT-клетками приводит к созреванию ДК и продукции ими IL-12, который, в свою очередь, повышает продукцию IFN- γ iNKT-клетками. IFN- γ , а также IL-12 активируют NK-клетки, $CD8^+$ T-клетки и макрофаги [26; 64].

Исследования на мышах показали, что презентация α -GalCer не ДК *in vivo* может приводить к NKT-клеточной дисфункции [15]. Характер активации NKT-клеток определяет и структура лиганда, ее изменения могут «настраивать» NKT-клетки на продукцию преимущественно одного типа цитокинов – или Th1, или Th2 [17; 28; 75].

Влияние NKT-клеток на противоопухолевый иммунитет

На различных экспериментальных моделях было продемонстрировано, что NKT-клетки играют важную роль в контроле роста злокачественных новообразований. Они могут как стимулировать противоопухолевый иммунный ответ, так и подавлять его. Это парадоксальное поведение связывают, в частности, с существованием разных субпопуляций NKT-клеток: I и II типов [6]. NKT-клетки I типа (iNKT) в подавляющем большинстве случаев проявляют противоопухолевую активность, которая во многом зависит от их способности продуцировать IFN γ . При этом они, как правило, играют роль стимуляторов активности других клеток-эффекторов, таких как NK- и CD8⁺ T-клетки [6; 41; 42]. IFN γ , продуцируемый iNKT- и NK-клетками, играет также важную роль в подавлении опухолевого ангиогенеза [25]. Даже в отсутствии экзогенной стимуляции NKT-клетки способны предупреждать развитие опухоли. Мыши, лишенные iNKT-клеток (J α 18^{-/-}), намного более чувствительны к химически индуцированному канцерогенезу, чем интактные животные [60]. Адоптивный перенос iNKT-клеток от интактных мышей мышам J α 18^{-/-} восстанавливал защиту от роста саркомы MCA-1, что зависело от продукции iNKT-клетками IFN γ и активации цитотоксических CD8⁺- и NK-клеток и способности последних продуцировать перфорин [13]. Н. Nishikawa et al. обнаружили, что при внутривенном введении мышам BALB/c клеток сингенной саркомы CMS5m, индуцированной метилхолантроном (MCA), у мышей J α 18^{-/-} в легких образуется значительно большее количество метастазов, чем у нормальных животных [47]. Активация iNKT-клеток α -GalCer приводит к последующей активации NK-и T-клеток и индуцирует выраженный противоопухолевый иммунный ответ как в отношении трансплантированных и химически индуцированных, так и спонтанных опухолей [4; 24; 61; 64]. На различных экспериментальных моделях была продемонстрирована антиметастатическая активность iNKT-клеток, активированных α -GalCer, которая также зависела от последующей активации NK-клеток. [15; 59; 61].

Презентация опухолевых антигенов CD8⁺ T-клеткам одновременно с активацией iNKT-клеток может усилить индукцию антиген-специфических CD8⁺ T-клеток [26; 64]. S. Fujii et al., в опытах на мышах продемонстрировали, что однократное в/в введение α -GalCer индуцировало быстрое (в пределах 4 ч) и полное созревание ДК (повышалась экспрессия CD40, CD80, CD86, MHC II и продукция IL-12), которые приобретали способность активно стимулировать пролиферацию аллогенных T-клеток в смешанной культуре лейкоцитов. Быстрое созревание ДК зависело от активации iNKT, так как у мышей, лишенных этих клеток, введение α -GalCer не влияло на статус ДК [16]. В опытах *in vivo* одновременное введение животным α -GalCer и пептидного антигена приводило к усилению специфического T-клеточного иммунного ответа в отношении последнего и повышало резистентность мышей к росту опухоли, экспресси-

рующей этот антиген. Однако по данным S. Fujii et al. и V.V. Parekh et al. введение мышам свободного α -GalCer может приводить к развитию анергии: iNKT-клетки не могут быть рестимулированы повторным введением этого агента, по крайней мере, в течение 1 месяца. В связи с этим, ДК, нагруженные α -GalCer (ДК/ α -GalCer) могут быть более эффективны в предупреждении развития опухоли, чем свободный α -GalCer [15; 50]. T.R. Petersen et al. продемонстрировали, что введение мышам C57Bl/6j ДК, нагруженных облученными и термически обработанными клетками меланомы B16.OVA в комбинации с α -GalCer (ДК/B16.OVA/ α -GalCer), достоверно увеличивала время до появления опухолей (на 10 дней по сравнению с контролем), трансплантированных через 7 дней после этого, однако опухоли появлялись у 70 % животных. При иммунизации животных ДК/B16.OVA или ДК/ α -GalCer эффект был минимальным. Введение мышам за 2 дня до иммунизации anti-CD25 антител для инактивации регуляторных CD4⁺CD25⁺T-клеток полностью предупреждало развитие опухолей у всех животных, вакцинированных ДК/B16.OVA/ α -GalCer, но при вакцинации мышей ДК/B16.OVA или ДК/ α -GalCer было неэффективным [51]. Развитие анергии могут индуцировать и различные бактериальные агенты или их продукты, а также сульфатид, активирующий NKT-клетки II типа [10; 22].

Исследования, выполненные *in vitro*, показали, что благодаря высокому содержанию гранзима В, перфорина, FasL и TRAIL iNKT-клетки могут в ряде случаев прямо участвовать в иммунологических реакциях в качестве клеток-эффекторов. Так, после активации iNKT-клетки человека способны проявлять цитотоксическую активность (ЦТА) в отношении CD1d⁺ опухолевых клеток. При этом уровень экспрессии CD1d на клетках-мишенях влияет на величину ЦТА [23; 37; 73]. iNKT клетки человека распознают α -GalCer презентруемый и человеческой и мышьиной молекулой CD1d. К. Haraguchi et al. использовали полученные путем трансфекции клоны клеток T-клеточной лимфомы EL-4, экспрессирующие различные уровни CD1d и обнаружили прямую зависимость величины цитотоксической активности V α 24⁺ NKT-клеток человека (только в присутствии α -GalCer) от уровня экспрессии CD1d на опухолевых клетках. В опытах *in vivo* продолжительность жизни мышей, инокулированных опухолевыми клетками, экспрессирующими наивысший уровень CD1d была значительно выше, чем у мышей, получивших клетки EL-4 с низкой экспрессией CD1d [23]. iNKT-клетки участвуют в контроле опухолевого роста и у человека. Снижение количества NKT-клеток I типа, их пролиферативной способности, продукции ими IFN γ было обнаружено у онкологических больных различными злокачественными новообразованиями [14; 31; 39; 74]. По данным J.W. Molling et al. снижение количества iNKT в периферической крови больных сквамозноклеточным раком головы и шеи коррелировало с плохим прогнозом заболевания [40]. Высокая степень инфильтрации опухолевой ткани этими клетками по данным T. Tachibana et al. явилась независимым благоприятным прогностическим фактором у больных раком толстой кишки [65]. E. Spanoudakis, обследуя больных с предзлокачественной формой миеломной болезни, больных с вновь диагностированной MM и больных с распространенной формой или рецидивом заболевания, обнаружили связь между прогрессированием болезни и низким уровнем (вплоть до полного отсутствия) экспрессии CD1d на клетках миеломы [63].

Однако большинство опухолей человека не экспрессируют CD1d. По данным S. Song et al. противоопухолевая активность iNKT-клеток может быть в ряде случаев связана с их прямым цитотоксическим действием не на опухолевые клетки, а на CD1d⁺ опухолеассоциированные моноциты/ макрофаги (TAMs), инфильтрирующие опухолевую ткань и ускоряющие опухолевый рост [62]. В настоящее время до конца не ясно насколько велик вклад цитолитической функции iNKT-клеток в защиту организма от опухолевого роста.

Клинические исследования, в которых α -GalCer или ДК, нагруженные α -GalCer, вводили онкологическим больным внутривенно, несмотря на достигнутую активацию NKT-клеток, имели ограниченный успех. В качестве основных причин предполагались:

- слабое проникновение α -GalCer или ДК, нагруженных α -GalCer, в опухолевые ткани;
- снижение количества iNKT-клеток в периферической крови онкологических больных и их дисфункция;
- влияние предварительного лечения на активность iNKT-клеток и ДК [44].

Обнадеживающие результаты были получены S. Motohashi et al. у больных немелкоклеточным раком легкого, которым 4-кратно вводили мононуклеарные клетки периферической крови, культивированные в присутствии α -GalCer, IL-2 и GM-CSF. Продолжительность жизни пациентов, у которых в результате лечения отмечалось значительное повышение количества IFN- γ -продуцирующих клеток, была намного выше (31,9 мес., 2-летняя выживаемость 60 %), чем у больных с низким ответом на терапию (9,7 мес., 2-летняя выживаемость 14,3 %) [43].

В настоящее время ясно установлено, что NKT-клетки участвуют не только в защите от опухолевого роста, как предполагалось ранее, но и в подавлении противоопухолевого иммунного ответа. В настоящее время супрессорную активность NKT-клеток связывают с NKT-клетками II типа. NKT-клетки II типа, также как и iNKT-клетки рестриктивны по CD1d, но специфические маркеры этих клеток в настоящее время не установлены, в связи с чем они значительно менее изучены, и изменения их количества и функции в процессе опухолевого роста до конца не известны. Подобно iNKT NKT-клетки II типа продуцируют как Th1, так и Th2 цитокины, и, по-видимому, реагируют на класс антигенов, отличных от распознаваемых iNKT-клетками. Супрессорная активность NKT II типа была продемонстрирована на различных экспериментальных моделях. M. Terabe et al. [68] на модели 4 опухолей мышей BALB/c (фибросаркома 15-12RM, рак толстой кишки CT26, рак молочной железы 4T1, рак толстой кишки CT-26-L5) показали, что CD1d^{-/-} мыши (отсутствуют все NKT-клетки) были намного более резистентны к опухолевому росту и развитию метастазов, чем $J\alpha 18^{-/-}$ (отсутствуют только iNKT-клетки, экспрессия CD1d сохраняется) мыши и животные исходной линии. По данным E. Ambrosino et al. [2] на ранних стадиях опухолевого роста количество метастазов рака прямой кишки CT26 в легких $J\alpha 18$ -дефицитных мышей ($J\alpha 18$ KO) было выше, а у CD1d-дефицитных мышей (CD1dKO) значительно ниже, чем у животных исходной линии. Авторы исследовали также влияние прямой стимуляции NKT-клеток I и II типов на опухолевый рост. Введение интактным животным α -GalCer для стимуляции NKT-клеток I типа защищало от роста п/к фибросаркомы 15-12RM и развития метастазов карциномы CT26 в легких, но не влияло на рост опухолей у мышей

$J\alpha 18$ KO. В то же время, введение мышам сульфатида – стимулятора субпопуляции NKT-клеток II типа – приводило к достоверному увеличению количества метастазов CT26 как у интактных, так и у $J\alpha 18$ KO мышей, но не влияло на рост опухоли у CD1dKO реципиентов. Введение мышам в день инокуляции фибросаркомы 15-12RM или клеток карциномы CT26 сульфатида через 30 минут после введения α -GalCer полностью отменяло или значительно снижало противоопухолевый эффект последнего. Супрессивный эффект сульфатида был выше у мышей $J\alpha 18$ KO, т.е. в отсутствии NKT-клеток I типа. Одновременная стимуляция NKT-клеток обоих типов приводила к повышению продукции IL-13 и подавлению продукции IFN- γ по сравнению с продукцией этих цитокинов при стимуляции только α -GalCer.

Таким образом, NKT-клетки II типа способны подавлять противоопухолевый иммунный ответ и оказывать супрессивное воздействие на NKT-клетки I типа, и оба типа NKT-клеток, по-видимому, способны влиять на активность друг друга. Супрессия противоопухолевого иммунного ответа NKT-клетками II типа может быть связана с повышением уровня IL-13 и TGF- β и количества CD11b⁺Gr1⁺ миелоидных супрессорных клеток [53; 67]. Однако эти NKT-клетки, по-видимому, используют и другие механизмы супрессии [66].

Субпопуляция NKT-клеток II типа была идентифицирована и у онкологических больных. D.N. Chang et al., исследуя CD1d-связывающие липиды из плазмы больных множественной миеломой, обнаружили повышение количества лизофосфатидилхолин-реактивных CD4⁺ и CD8⁺ V α 24-V β 11⁻ NKT-клеток, т.е. NKT-клеток II типа у пациентов по сравнению со здоровыми донорами, и эти клетки секретировали преимущественно IL-13 [9].

В нашей лаборатории А.А. Борунова и соавт., изучали изменения структуры популяции CD16⁺ лимфоцитов у больных диссеминированной меланомой на фоне вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками, нагруженными опухолевыми антигенами больного. В исследование были включены пациенты с полной клинической ремиссией (в процессе вакцинотерапии безрецидивное течение заболевания наблюдалась у 7 больных, прогрессирование – у 3 из 10 пациентов) и с распространенной стадией заболевания (в процессе вакцинотерапии стабилизация болезни наблюдалась у 7 больных, прогрессирование – у 14 из 21).

Авторы обнаружили, что при прогрессировании заболевания в процессе вакцинотерапии у больных отмечалось постепенное увеличение количества CD16⁺CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов (NKT-клеток), которое к концу наблюдения значительно превышало величину этого показателя у здоровых доноров (в среднем более 26 % по сравнению с 3,6 соответственно).

В то же время у больных, вакцинотерапия которых приводила к стабилизации процесса, количество этих клеток в процессе лечения возрастало незначительно (в среднем не превышало 5–8 %). Следует отметить, что при распространенной стадии заболевания вакцинотерапия вызывала стабилизацию болезни лишь у тех пациентов, у которых количество CD16⁺CD3⁺CD8⁺ клеток до начала лечения было в пределах нормы.

В настоящее время роль этой популяции клеток в противоопухолевом иммунном ответе не ясна, однако полученные результаты позволяют рассматривать увеличение количества CD16⁺CD3⁺CD8⁺ клеток как неблагоприятный прогностический фактор у больных меланомой при вакцинотерапии [1].

В экспериментальных исследованиях супрессорная активность при опухолевом росте была показана и для NKT-клеток I типа [48; 52; 54]. К.А. Pilonis et al. [52] продемонстрировали, что отсутствие iNKT-клеток приводило к значительному терапевтическому эффекту местного облучения и блокады CTLA-4 у мышей с карциномой 4T1 по сравнению с мышами исходной линии, получившими то же лечение. Только у iNKT^{-/-} мышей наблюдалась полная регрессия опухоли и излечение 50% мышей, полное исчезновение метастазов в легких, резистентность к повторному разрешению вылеченных животных клетками той же опухоли и значительное увеличение продолжительности жизни.

Тот факт, что iNKT-клетки, которые в подавляющем большинстве исследований проявляли противоопухолевую активность, а в данном случае играли отрицательную роль, возможно, говорит о значении в определенных случаях каких-то пока не известных факторов микроокружения, определяющих направление влияния этих клеток на опухолевый рост.

Заключение

Многочисленные экспериментальные и клинические исследования продемонстрировали важную роль, которую NKT-клетки играют в модуляции им-

мунологической реактивности организма при злокачественных новообразованиях. NKT-клетки участвуют не только в защите от опухолевого роста, но и в подавлении противоопухолевого иммунного ответа.

Это парадоксальное поведение связывают, в частности, с существованием разных субпопуляций NKT-клеток: I и II типов.

Определение маркеров субпопуляций NKT-клеток, количественные изменения которых коррелируют с неблагоприятным течением заболевания, может иметь прогностическое значение при различных иммунотерапевтических воздействиях.

Очевидно, что iNKT-клетки обладают мощным потенциалом для проявления противоопухолевой активности. Решающее значение имеет их способность осуществлять связь между врожденным и адаптивным иммунитетом.

Для повышения эффективности iNKT-клеточной терапии онкологических больных необходимо дальнейшее изучение биологии этих клеток и способов их оптимальной активации. Возможность влиять на активность NKT-клеток, а также получение новых агентов, способных дифференцированно активировать различные функции NKT-клеток, может не только помочь в разработке новых методов лечения и профилактики злокачественных новообразований, но и повысить эффективность существующих методов иммунотерапии.

Литература

1. Борунова А.А., Чакадуа Г.З., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г. Изучение популяции CD16⁺ лимфоцитов у онкологических больных на фоне вакцинотерапии // Мед. иммунол. – 2006. – Т. 8, № 2–3. – С. 334.
2. Ambrosino E., Terabe M., Halder R.C. et al. Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis // J. Immunol. – 2007. – 179. – P. 5126–36.
3. Assarsson E., Kambayashi T., Sandberg J.K. et al. CD8⁺ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo // J. Immunol. – 2000. – 165. – P. 3673–9.
4. Bellone M., Ceccon M., Gironi M. et al. iNKT cells control mouse spontaneous carcinoma independently of tumor-specific cytotoxic T cells // PLoS ONE – 2010. – 5. – Issue 1. – P. e8646.
5. Bendelac A., Lantz O., Quimby M.E. et al. CD1 recognition by mouse NK1⁺ T lymphocytes. // Science. – 1995. – 268(5212) – P. 863–5.
6. Berzofsky J.A., Terabe M. The contrasting roles of NKT cells in tumor immunity // Curr. Mol. Med. – 2009. – 9. – P. 667–72.
7. Bezbradica J.S., Stanic A.K., Matsuki N. et al. Distinct roles of dendritic cells and B cells in Vα14Jα18 natural T cell activation in vivo // J. Immunol. – 2005. – 174. – P. 4696–705.
8. Brukiewicz R.R. CD1d ligands: the good, the bad, and the ugly // J. Immunol. – 2006. – 177. – P. 769–75.
9. Chang D.H., Deng H., Matthews P. et al. Inflammation-associated lysophospholipids as ligands for CD1d-restricted T cells in human cancer // Blood. – 2008. – 112. – P. 1308–16.
10. Chiba A., Dascher C.C., Besra G.S., Brenner M.B. Rapid NKT cell responses are self-terminating during the course of microbial infection // J. Immunol. – 2008. – 181. – P. 2292–302.
11. Coquet J.M., Kyriakoudis K., Pellicci D.G. et al. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production // J. Immunol. – 2007. – 178. – P. 2827–34.
12. Crowe N.Y., Coquet J.M., Berzins S.P. et al. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo // J. Exp. Med. – 2005. – 202. – P. 1279–88.
13. Crowe N.Y., Smyth M.J., and Godfrey D.I. A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas // J. Exp. Med. – 2002. – 196. – P. 119–27.
14. Dhodapkar M.V., Geller M.D., Chang D.H. et al. A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma // J. Exp. Med. – 2003. – 197. – P. 1667–76.
15. Fujii S., Shimizu K., Kronenberg M., Steinman R.M. Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs // Nat Immunol. – 2002. – 3. – P. 867–74.
16. Fujii S., Shimizu K., Smith C. et al. Activation of natural killer T Cells by α-Galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein // J. Exp. Med. – 2003. – 198. – P. 267–79.
17. Fujio M., Wu D., Garcia-Navarro R. et al. Structure-based discovery of glycolipids for CD1d-mediated NKT cell activation: tuning the adjuvant versus immunosuppression activity // J. Am. Chem. Soc. – 2006. – 128. – P. 9022–3.
18. Godfrey D.I., Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells // J. Clin. Invest. – 2004. – 114. – P. 1379–88.
19. Godfrey D.I., MacDonald H.R., Kronenberg M. et al. NKT cells: what's in a name? // Nat. Rev. Immunol. – 2004. – 4. – P. 231–7.

20. Gonzalez V.D., Björkström N.K., Malmberg K-J. et al. Application of nine-color flow cytometry for detailed studies of the phenotypic complexity and functional heterogeneity of human lymphocyte subsets // *J. Immunol. Methods.* – 2008. – 330. – P. 64–74.
21. Gumperz J.E., Miyake S., Yamamura T., Brenner M.B. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining // *J. Exp. Med.* – 2002. – 195. – P. 625–36.
22. Halder R.C., Aguilera C., Maricic I., Kumar V. Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease // *J. Clin. Invest.* – 2007. – 117. – P. 2302–12.
23. Haraguchi K., Takahashi T., Nakahara F. et al. CD1d expression level in tumor cells is an important determinant for anti-tumor immunity by natural killer T cells // *Leuk. Lymphoma* – 2006. – 47. – P. 2218–23.
24. Hayakawa Y., Rovero S., Fornì G., Smyth M.J. α -Galactosylceramide (KRN7000) suppression of chemical- and oncogene-dependent carcinogenesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – 100. – P. 9464–9.
25. Hayakawa Y., Takeda K., Yagita H. et al. IFN- γ -mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, α -galactosylceramide // *Blood.* – 2002. – 100. – P. 1728–33.
26. Hermans I.F., Silk J.D., Gileadi U. et al. NKT cells enhance CD4⁺ and CD8⁺T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells // *J. Immunol.* – 2003. – 171. – P. 5140–7.
27. Ho L-P., Urban B.C., Jones L. et al. CD4⁻CD8 $\alpha\alpha$ subset of CD1d-restricted NKT cells controls T cell expansion // *J. Immunol.* – 2004. – 172. – P. 7350–8.
28. Im J.S., Arora P., Bricard G. et al. Kinetics and cellular site of glycolipid loading control the outcome of natural killer T cell activation // *Immunity.* – 2009. – 30. – P.888–98.
29. Jahng A., Maricic I., Aguilera C. et al. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide // *J. Exp. Med.* – 2004 – 199. – P. 947–57.
30. Kenna T., Golden-Mason L., Porcelli S.A. et al. NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells // *J. Immunol.* – 2003. – 171. – P. 1775–9.
31. Konishi J., Yamazaki K., Yokouchi H. et al. The characteristics of human NKT cells in lung cancer--CD1d independent cytotoxicity against lung cancer cells by NKT cells and decreased human NKT cell response in lung cancer patients. // *Hum. Immunol.* – 2004. – 65. – P. 1377–88.
32. Lee P.T., Benlagha K., Teyton L., and Bendelac A. Distinct functional lineages of human V α 24 natural killer T cells // *J. Exp. Med.* – 2002. – 195. – P. 637–41.
33. Lin H., Nieda M., Rozenkov V., and Nicol A.J. Analysis of the effect of different NKT cell subpopulations on the activation of CD4 and CD8 T cells, NK cells, and B cells // *Exp. Hematol.* – 2006. – 34. – P. 289–95.
34. Makino Y., Kanno R., Ito T. et al. Predominant expression of invariant V α 14⁺ TCR α chain in NK1.1⁺ T cell populations // *Int. Immunol.* – 1995. – 7. – P. 1157–61.
35. Matsuda J.L., Gapin L., Baron J.L. et al. Mouse V α 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – 100. – P. 8395–400.
36. Matsuda J.L., Naidenko O.V., Gapin L. et al. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers // *J. Exp. Med.* – 2000. – 192. – P. 741–53.
37. Metelitsa L.S., Naidenko O.V., Kant A. et al. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells // *J. Immunol.* – 2001. – 167. – P. 3114–22.
38. Mittag A., Lenz D., Gerstner A.O.H. et al. Polychromatic (eight-color) slide-based cytometry for the phenotyping of leukocyte, NK, and NKT subsets // *Cytometry A.* – 2005. – 65. – P. 103–15.
39. Molling J.W., Kølgen W., van der Vliet H.J.J. et al. Peripheral blood IFN- γ -secreting V α 24⁺V β 11⁺ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load // *Int. J. Cancer.* – 2005. – 116. – P. 87–93.
40. Molling J.W., Langius J.A.E., Langendijk J.A. et al. Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – 25. – P. 862–8.
41. Molling J.W., Moreno M., de Groot J. Chronically stimulated mouse invariant NKT cell lines have a preserved capacity to enhance protection against experimental tumor metastases // *Immunol. Lett.* – 2008. – 118. – P. 36–43.
42. Moreno M., Molling J.W., von Mensdorff-Pouilly S. et al. IFN- γ -producing human invariant NKT cells promote tumor-associated antigen-specific cytotoxic T cell responses // *J. Immunol.* – 2008. – 181. – P. 2446–54.
43. Motohashi S., Nagato K., Kunii N. et al. A Phase I-II study of α -Galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer // *J. Immunol.* – 2009. – 182. – P. 2492–501.
44. Motohashi S., Nakayama T. Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer // *Cancer Sci.* – 2008. – 99. – P. 638–45.
45. Nagarajan N.A., Kronenberg M. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide // *J. Immunol.* – 2007. – 178. – P. 2706–13.
46. Nieda M., Okai M., Tazbirikova A. et al. Therapeutic activation of V α 24⁺V β 11⁺ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity // *Blood.* – 2004. – 103. – P. 383–9.
47. Nishikawa H., Kato T., Tanida K. et al. CD4⁺ CD25⁺ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – 100. – P. 10902–6.
48. Osada T., Morse M.A., Lyerly H.K., Clay T.M. Ex vivo expanded human CD4⁺ regulatory NKT cells suppress expansion of tumor antigen-specific CTLs // *Intern. Immunol.* – 2005. – 17. – P. 1143–55.
49. Paget Ch., Mallevaey T., Speak A.O. et al. Activation of invariant NKT cells by Toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids // *Immunity.* – 2007. – 27. – P. 597–609.
50. Parekh V.V., Wilson M.T., Olivares-Villagomez D. et al. Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice // *J. Clin. Invest.* – 2005. – 115. – P. 2572–83.

51. Petersen T.R., Sika-Paotonu D., Knight D.A. et al. Potent anti-tumor responses to immunization with dendritic cells loaded with tumor tissue and an NKT cell ligand // *Immunol. Cell Biol.* – 2010. – 88. – P. 596–604.
52. Pilonis K.A., Kawashima N., Yang A.M. et al. Invariant natural killer T cells regulate breast cancer response to radiation and CTLA-4 blockade // *Clin. Cancer Res.* – 2009. – 15. – P. 597–606.
53. Renukaradhya G.J., Khan M.A., Vieira M. et al. Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma // *Blood.* – 2008. – 111. – P. 5637–45.
54. Renukaradhya G.J., Sriram V., Du W. et al. Inhibition of antitumor immunity by invariant natural killer T cells in a T-cell lymphoma model in vivo // *Int. J. Cancer.* – 2006. – 118. – P. 3045–53.
55. Salio M., Silk J.D., Cerundolo V. Recent advances in processing and presentation of CD1 bound lipid antigens // *Curr. Opin. Immunol.* – 2010. – 22. – P. 81–8.
56. Schmiege J., Yang G., Franck R.W. et al. Glycolipid presentation to natural killer T cells differs in an organ-dependent fashion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – 102. – P. 1127–32.
57. Seino K., Taniguchi M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes // *J. Exp. Med.* – 2005 – 202. – P. 1623–6.
58. Slifka M.K., Pagarigan R.R., Whitton J.L. NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells // *J. Immunol.* – 2000. – 164. – P. 2009–15.
59. Smyth M.J., Crowe N.Y., Pellicci D.G. et al. Sequential production of interferon- γ by NK1.1⁺ T cells and natural killer essential for the antimetastatic effect of α -galactosylceramide // *Blood.* – 2002. – 99. – P. 1259–66.
60. Smyth M.J., Thia K.Y.T., Street S.E.A. et al. Differential tumor surveillance by Natural Killer (NK) and NKT cells // *J. Exp. Med.* – 2000. – 191. – P. 661–8.
61. Smyth M.J., Wallace M.E., Nutt S.L. et al. Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer // *J. Exp. Med.* – 2005. – 201. – P. 1973–85.
62. Song L., Asgharzadeh S., Salo J. et al. V α 24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages // *J. Clin. Invest.* – 2009. – 119. – P. 1524–36.
63. Spanoudakis E., Hu M., Naresh K. et al. Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d // *Blood.* – 2009. – 113. – P. 2498–507.
64. Swann J., Crowe N.Y., Hayakawa Y. et al. Regulation of antitumor immunity by CD1d-restricted NKT cells // *Immunol. Cell Biol.* – 2004. – 82. – P. 323–31.
65. Tachibana T., Onodera H., Tsuruyama T. et al. Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – 11. – P. 7322–7.
66. Terabe M., Khanna C., Bose S. et al. CD1d-restricted natural killer T cells can down-regulate tumor immunosurveillance independent of interleukin-4 receptor-signal transducer and activator of transcription 6 or transforming growth factor- β // *Cancer Res.* – 2006. – 66. – P. 3869–75.
67. Terabe M., Matsui S., Park J.M. et al. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: Abrogation prevents tumor recurrence // *J. Exp. Med.* – 2003. – 198. – P. 1741–52.
68. Terabe M., Swann J., Ambrosino E. et al. A nonclassical non-V α 14J α 18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for downregulation of tumor immunosurveillance // *J. Exp. Med.* – 2005. – 202. – P. 1627–33.
69. Van der Vliet H.J., Molling J.W., von Blumberg B.M.E. et al. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease // *Clin. Immunol.* – 2004. – 112. – P. 8–23.
70. Van der Vliet H.J.J., Wang R., Yue S.C. et al. Circulating myeloid dendritic cells of advanced cancer patients result in reduced activation and a biased cytokine profile in invariant NKT cells // *J. Immunol.* – 2008. – 180. – P. 7287–93.
71. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions // *Curr. Opin. Immunol.* – 2007. – 19. – P. 354–64.
72. Webb T.J., Giuntoli R.L., Rogers O. et al. Ascites specific inhibition of CD1d-mediated activation of NKT cells // *Clin. Cancer Res.* – 2008. – 14. – P. 7652–8.
73. Wingender G., Krebs P., Beutler B., Kronenberg M. Antigen-specific cytotoxicity by invariant NKT cells in vivo is CD95/CD178-dependent and is correlated with antigenic potency // *J. Immunol.* – 2010. – 185. – P. 2721–9.
74. Yanagisawa K., Seino K., Ishikawa Y. et al. Impaired proliferative response of V α 24 NKT cells from cancer patients against α -Galactosylceramide // *J. Immunol.* – 2002. – 168. – P. 6494–9.
75. Yu K.O.A., Porcelli S.A. The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy // *Immunol. Lett.* – 2005. – 100. – P. 42–55.
76. Yuling H., Ruijing X., Xiang J. et al. EBV Promotes Human CD8⁺ NKT Cell Development // *PLoS Pathog.* – 2010. – 6. – P. e1000915.
77. Zheng X., Zhang H., Yin L. et al. Modulation of NKT cell development by B7-CD28 interaction: an expanding horizon for costimulation // *PLoS ONE* – 2008. – 3. – Issue. 7 – P. e2703.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 615.277.3.015.44:576.367:576.385.5

*Д.Ю. Блохин, Е.Ф. Чмутин, П.К. Иванов***МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ:
ФАКТОРЫ РОСТА, АНГИОГЕНЕЗА И АПОПТОЗА***РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Блохин Дмитрий Юрьевич, д-р мед. наук, заведующий лабораторией фармакоцитокинетики НИИ ЭДнТО***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24; **тел.:** +7(495)324-22-64; **факс:** +7(495)323-53-33**e-mail:** blokhin@yandex.ru

Статья поступила 19.04.2011., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Обзор дает общее представление о новых молекулярных мишенях для противоопухолевой терапии, включая факторы роста, ангиогенеза и апоптоза. Эпидермальный и инсулиноподобный факторы роста, фактор роста гепатоцитов, эндотелиальный фактор роста сосудов и их рецепторы, рецепторы интегрина и средства, разрушающие уже имеющиеся сосуды, а также антиапоптозные белки Bcl-2 и сурвивин, проапоптозные лиганды семейства фактора некроза опухоли – новые данные об этих группах мишеней являются темой настоящего обзора. Рассмотрены воздействующие на эти факторы препараты, разрешенные к применению или находящиеся на разных стадиях клинических испытаний.

Ключевые слова: факторы роста, ангиогенез, апоптоз, противоопухолевая терапия.*D.Y. Blokhin, E.F. Chmutin, P.K. Ivanov***MOLECULAR TARGETS FOR ANTICANCER THERAPY:
GROWTH FACTORS, ANGIOGENESIS AND APOPTOSIS***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

The review provides a general outlook of the promising molecular targets for anticancer therapy with focus on growth factors and factors regulating angiogenesis and apoptosis. Particularly, the following factors are discussed: epidermal growth factor, insulin-like growth factor, hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and their receptors, integrin receptors and vascular disrupting agents, as well as anti-apoptotic proteins Bcl-2 and survivin, and pro-apoptotic tumor necrosis factor-related ligand. A brief description of agents targeting these factors is given with particular emphasis on those approved for clinical use or undergoing late-stage clinical trials.

Key words: growth factors, angiogenesis, apoptosis, anticancer therapy.**Введение**

Химиотерапия злокачественных опухолей как самостоятельный метод клинической онкологии ведет свою историю с 1946 г., когда впервые для лечения человека был использован эмбихин, производное азотистого иприта – БОВ Первой мировой войны. За прошедшие полвека арсенал онкологов существенно пополнился противоопухолевыми препаратами, обладающими различными механизмами молекулярного действия на опухолевые клетки-мишени.

В современной онкологической клинике широко применяются лекарственные препараты алкилирующего типа (хлорэтиламины, нитрозопроизводные, эфиры дисульфоновых кислот) и близкие к ним по механизму действия триазины и комплексные соединения платины. Поражающее действие этих соединений связано с химической модификацией биомакромолекул путем ковалентного присоединения алкильных группировок к нуклеофильным участкам ДНК, РНК и белков, в результате чего нарушаются функции последних, приводя в итоге к замедлению роста, остановке деления и гибели клеток-мишеней. Другим классом противоопухолевых лекарств являются антиметаболиты – синтетические аналоги природных субстратов (фолиевой кислоты, пуриновых и пиримидиновых оснований и нуклеозидов).

Широко используются противоопухолевые антибиотики (антрациклины и их синтетические аналоги, флеомицины), вещества растительного происхождения (алкалоиды барвинка, таксаны, эпиподофиллотоксины), гормоны и блокаторы рецепторов гормонов, что позволяет комбинировать лекарственные средства разных классов для повышения эффективности проводимой терапии и снижения ее побочных эффектов.

При всем многообразии этих классических средств они условно делятся на две группы: цитостатики и цитотоксины. Подавляющее большинство отобраны в результате массового эмпирического скрининга природных и синтетических химических соединений. Характер поражающего действия и природа поражаемых мишеней изучались уже после доказательства противоопухолевой эффективности. Подробно молекулярные механизмы действия различных противоопухолевых лекарств описаны в [2]. Вместе с тем, на закате XX столетия в процессе создания новых потенциальных противоопухолевых лекарств возобладали тенденции к рациональному синтезу соединений с заранее прогнозируемыми свойствами. Их действие в опухолевой ткани направлено (и, в большинстве случаев, ограничено) на поражение совершенно определенной молекулярной мишени, наличие которой в клетках является абсолютно необходимым показанием к применению таких средств.

Созданные в результате этого подхода лекарственные препараты нового поколения получили название «таргетных» (англ. *target* – мишень), которое, на наш взгляд, является не вполне удачным, но широко используется в мировой научной литературе для обозначения молекулярно-нацеленных лекарств. В отличие от классических цитостатиков и цитотоксинов, «таргетные» препараты воздействуют на молекулярные мишени, осуществляющие внутриклеточную передачу сигналов «смерти» и «выживания», роль которых в индивидуальной судьбе опухолевой клетки описана ранее [1].

В этом обзоре приведены сведения о некоторых молекулярных мишенях противоопухолевой терапии и о «таргетных» препаратах, часть которых уже применяется в клинической практике, а другие проходят доклинические исследования или разные фазы клинических испытаний (см. табл.). Внимание уделено ростовым факторам, факторам регуляции ангиогенеза и апоптоза. Рассматриваются эпидермальный и инсулиноподобный факторы роста, фактор роста гепатоцитов, эндотелиальный фактор роста сосудов и их рецепторы, средства, разрушающие уже имеющиеся сосуды, интегрины, а также антиапоптозные белки Vcl-2 и сурвивин, и проапоптозные белки семейства фактора некроза опухоли.

Факторы роста и их рецепторы

ФР – естественные вещества полипептидной природы, стимулирующие рост и пролиферацию клеток путем активации специфических рецепторов на их поверхности, что приводит к генерированию рецептором митогенного сигнала. К настоящему времени обнаружено и охарактеризовано большое количество ФР, действующих на разные типы клеток, и значительное количество рецепторов, лигандами которых они являются.

Установлено, что в неопластических тканях часто наблюдается заметное повышение экспрессии рецепторов ФР, которое сопровождается усилением генерируемых ими митогенных и антиапоптогенных сигналов.

Медикаментозное подавление такой сигнальной активности рецепторов ФР может оказать цитостатическое действие на опухолевые клетки, что позволяет рассматривать эти рецепторы как потенциальные мишени для противоопухолевой терапии. Основная стратегия воздействия на эти мишени – предотвращение связывания ФР с рецепторами и/или блокада генерации и передачи митогенного сигнала от рецепторов к исполнительным механизмам, в связи с чем, помимо собственно рецепторов, в качестве мишеней рассматриваются многочисленные участники нижней цепи каскадной передачи сигналов, поражение которых блокирует сигнальную трансдукцию.

Семейство рецепторов

эпидермального фактора роста (EGFR)

Семейство EGFR (иначе ErbB или HER) состоит из 4 структурно родственных трансмембранных белков: EGFR1 (HER1, erbB1), HER2/neu (erbB2), HER3 (erbB3) и HER4 (erbB4) [7].

Связывание лиганда с внеклеточным доменом EGFR (кроме HER2/neu, лиганд для которого не обнаружен) вызывает образование гомо- и гетеродимеров рецептора, что повышает тирозинкиназную активность его внутриклеточного домена и вызывает каскад последовательных реакций передачи митогенного сигнала по нескольким сигнальным путям, в том числе – через митоген-активируемые протеин-

киназы (МАРК) и путь PI3K/Akt/mTOR, что приводит к стимуляции пролиферации, повышению выживаемости клеток, усилению клеточной адгезии и подвижности [48].

Экспрессия EGFR1 и HER2/neu усилена в клетках многих типов злокачественных опухолей эпителиального происхождения, поэтому данные рецепторы как мишени для терапевтического воздействия привлекают большое внимание исследователей и изучены лучше других.

Являясь трансмембранным белком, EGFR содержит по крайней мере две принципиально различные потенциальные мишени для воздействия на его функции: внеклеточный рецепторный и внутриклеточный тирозинкиназные домены. С первым способны связываться специфичные моноклональные антитела (МКА), а со вторым – низкомолекулярные ингибиторы протеинкиназ.

Опыт терапевтического использования МКА к поверхностным рецепторам клеток начался в 1980-е гг. с создания **муромонаба (Ортоклон ОКТ3¹)** – мышинового МКА к CD3 Т-лимфоцитов человека, оказывающего иммуносупрессорное действие на клеточное звено иммунитета и по сей день применяющееся для купирования острой реакции отторжения трансплантата.

Следующим препаратом на основе МКА к клеточным рецепторам стал **ритуксимаб (Мабте-ра)**, химерное антитело, специфичное к антигену CD20 В-лимфоцитов, который с 1997 г. разрешен для лечения В-клеточных НХЛ. Этот опыт был использован при разработке терапевтических МКА к рецепторам ФР.

Связывание МКА с рецептором ФР сопровождается блокадой связывания с ним естественных лигандов, препятствует димеризации рецепторов, а также, возможно, активизирует процесс антителозависимой и комплементзависимой цитотоксичности [46]. Благодаря широкому поиску средств, подавляющих активность EGFR1 и HER2/neu, сегодня ряд таких препаратов уже рутинно используются в клинике. Так, МКА к HER2/neu **трастузумаб (Герцептин)** более 10 лет применяется для лечения HER2⁺ РМЖ; за этот период во всем мире лечение препаратом прошли более 750 000 пациентов; в январе 2010 г. Европейская комиссия утвердила **трастузумаб** в комбинации с химиотерапией (фторпиримидины, цисплатин) для применения у больных раком желудка с гиперэкспрессией HER2/neu (частота составляет 16–22 % всех случаев заболевания). В 2004 г. разрешено применение химерных МКА против EGFR1 **цетуксимаба (Эрбитукса)** для лечения колоректального рака (КРР), а в 2006 г. – препаратом полностью человеческих МКА против EGFR1 **панитумумаба (Вектибикса)** по этому же показанию.

Низкомолекулярные ингибиторы протеинкиназ могут связываться с каталитическим участком внутриклеточного домена, ингибируя его ферментативную активность, или с иным участком, вызывая изменение конформации белка и его инактивацию [36].

Ингибиторы тирозинкиназного домена дублируют действие МКА, реализуя альтернативный способ блокирования активности нативной формы EGFR.

¹Здесь и далее по тексту: международное непатентованное наименование препарата выделено **полужирным шрифтом**, в скобках приведено торговое название (или шифр при испытаниях – *выделено полужирным курсивом*)

Таблица

Противоопухолевые препараты, разрешенные для клинического применения, или проходящие поздние стадии клинических испытаний

Препарат	Мишень	Показания к применению
Разрешены к применению:		
Цетуксимаб (Эрбитукс)	EGFR1	КРП (без мутации <i>K-RAS</i>), рак органов головы и шеи
Панитумумаб (Вектибикс)	EGFR1	КРП (без мутации <i>K-RAS</i>)
Гефитиниб (Иресса)	EGFR1	НМРЛ (с мутацией в гене <i>ErbB1</i>), рак поджелудочной железы
Эрлотиниб (Тарцева)		
Трастузумаб (Герцептин)	HER2	HER2 ⁺ -РМЖ, HER2 ⁺ , рак желудка
Лапатиниб (Тайверб)	HER2	HER2 ⁺ , РМЖ
Бевацизумаб (Авастин)	VEGF	РМЖ, КРП, НМРЛ, рак почки
Сорафениб (Нексавар)	VEGFR/PDGFR/Raf	Рак почки, рак печени
Сунитиниб (Сутент)	VEGFR/PDGFR/c-Kit	Рак почки, GIST
Пазопаниб (Votrient)	VEGFR/PDGFR	Рак почки
Иматиниб (Гливек)	Bcr/Abl, c-Kit, PDGFR	Ph ⁺ -ХМЛ, Ph ⁺ -ОЛЛ, GIST, дерматофибросаркома, системный мастоцитоз (без мутации D816V)
III фаза испытаний		
Фигитумумаб (CH-721,571)	IGF-R	НМРЛ
Ваталаниб (PTK-87)	VEGFR/PDGFR/c-Kit	КРП
Афлиберцепт®	VEGF	Рак яичника, КРП
Вадимезан (ASA404)	Индукция апоптоза эндотелиоцитов по неясному механизму	НМРЛ
Облимерсен (Genasense)©	Bcl-2	Рецидивирующий резистентный ХЛЛ, меланома, ММ

Серым фоном обозначены препараты терапевтических МКА, белым – низкомолекулярные ингибиторы ферментов. ® – растворимый рецептор VEGF; © – антисмысловый олигонуклеотид.

Однако при неопластическом росте часто возникают так называемые активирующие мутации *ErbB1*, в результате чего синтезируются конформационно измененные «мутантные» формы рецепторов EGFR1, постоянная активность которых никак не связана с присутствием лиганда. В отношении таких активных рецепторов ингибиторы тирозинкиназы являются единственным инструментом подавления их активности.

Ингибитор протеинкиназы EGFR **гефитиниб (Иресса)** используется в клинической практике с 2003 г. как препарат 2–3 линий при лечении НМРЛ, а в 2007 г. продемонстрировано, что по достижимым результатам общей выживаемости он не уступает стандартной химиотерапии, значительно превосходя последнюю по безопасности и показателям качества жизни.

Другой ингибитор EGFR1 **эрлотиниб (Тарцева)** разрешен для лечения НМРЛ и рака поджелудочной железы (в комбинации с гемцитабином), а неселективный ингибитор протеинкиназ EGFR1/HER2 **лапатиниб (Тайверб, Тайкерб)** – для лечения HER2⁺-РМЖ (в комбинации с капецитабином у больных, ранее получавших Герцептин).

Позднее было установлено, что близкие по структуре и механизму действия **гефитиниб (Иресса)** и **эрлотиниб (Тарцева)** значительно эффективнее подавляют активность «мутантной» формы рецептора EGFR1, чем его «дикий тип», в связи с чем сегодня определена категория больных НМРЛ, для которых **гефитиниб (Иресса)** показан в 1-й линии лечения: делеция в 19 экзоне или точечная мутация в 21 экзоне *ErbB1*, приводящая к замене L858R (замена лейцина на аргинин в положении 858) тирозинкиназного домена, значительно повышают чувствительность рецептора к ингибитору.

Исследователи отмечают, что к обратимым ингибиторам протеинкиназы, к которым относятся указанные препараты, достаточно быстро развивается резистентность, связанная с нестабильностью *ErbB1*. Предполагается, что проблему удастся решить применением необратимых ингибиторов [3]. Перспективным подходом представляется воздействие одновременно на несколько протеинкиназ, опосредующих передачу сигнала по разным путям. Так, **BIBW-2992** – ингибитор протеинкиназ EGFR1/HER2 – проходит II фазу клинических испытаний для лечения НМРЛ, а полифункциональный ингибитор **XL-647** протеинкиназ EGFR1/HER2/HER4/VEGFR2/EphB4 находится на той же стадии разработки для лечения ряда других солидных опухолей [26]. Несколько подобных препаратов также проходят I фазу клинического изучения.

Рецептор

инсулиноподобного фактора роста IGF-1R

Семейство инсулиноподобных ростовых факторов включает сам инсулин и инсулиноподобные факторы роста (IGF) –1 и –2, которые имеют соответствующие рецепторы. При разработке противоопухолевых средств основное внимание уделяется IGF-1 и его рецептору, для которых показано участие в развитии и прогрессировании разных типов опухолей [38]. Рецептор IGF-1R – это гетеротетрамер, состоящий из двух α-субъединиц (внеклеточных доменов) и двух β-субъединиц (внутриклеточных доменов с тирозинкиназной активностью) [35]. После связывания лиганда рецептор претерпевает конформационное изменение и фосфорилируется, что приводит к трансактивации белков Src и Shc с последующей передачей пролиферативного, митогенного и антиапоптогенного сигналов по уже упоминавшимся сигнальным путям через MAPK и PI3K/Akt/mTOR.

Нарушение передачи сигнала через IGF-1R в моделях *in vitro* и *in vivo* тормозит рост и метастазирование опухолей, а гиперэкспрессия IGF-1R сопровождается негативным прогнозом при многих типах опухолей, включая множественную миелому, рак предстательной железы, НМРЛ и рак почки [32].

Среди средств, влияющих на передачу сигнала через IGF-1R, дальше всего продвинулась разработка МКА. Так, полностью человеческие МКА против IGF-1R **фигитумумаб (CP-751,871)** проходят III фазу клинических испытаний для лечения поздних стадий НМРЛ [14]. На II фазе изучения было показано, что добавление этих МКА к комбинации карбоплатин + доцетаксел улучшает частоту эффекта и выживаемость без прогрессирования [23]. Также в рамках II фазы клинических испытаний изучается возможность применения **фигитумумаба** при ряде других солидных опухолей [47]. Однако эти исследования показали, что недостаточная селективность **фигитумумаба** в отношении рецептора IGF-1R может сопровождаться в качестве побочного эффекта нарушением функций инсулина и метаболизма глюкозы, в связи с чем продолжают работу по созданию более селективных МКА против IGF-1R, а также поиск ингибиторов тирозинкиназы этого рецептора. Эти препараты пока находятся на ранних стадиях доклинического изучения и клинических испытаний [18].

Рецепторы *c-Met*, *c-Kit* и *PDGFR*

Рецептор *c-Met* – трансмембранный белок с тирозинкиназной активностью, который выделяют по его способности связывать фактор роста гепатоцитов (HGF), являющийся его единственным известным лигандом. Этот рецептор участвует в передаче сигналов, регулирующих пролиферацию, выживаемость и метастазирование опухолевых клеток [4]. После связывания HGF рецептор *c-Met* подвергается аутофосфорилированию, что сопровождается передачей сигнала по путям Ras-Raf-МАРК, через белки Grb2, Gab1 и далее на PI3K, фосфолипазу C-γ, Shc, Src, Shp2, Ship1 и STAT3. Ген *c-Met* является прото-онкогеном и его мутации, вызывающие перманентную активность рецептора, обнаружены в клетках рака желудка и почки [10; 50]. Гиперэкспрессия *c-Met*, вызванная транслокацией t(7;1), при которой ген попадает под контроль мощного промотора *Trp*, часто наблюдается при карциноме желудка, а также выявлена в клетках разных типов опухолей, в том числе эпителиального и мезенхимального происхождения, и в клетках гемобластозов [33]. Функция рецептора *c-Met* изучена недостаточно, однако его экспрессия в неопластических тканях позволяет рассматривать *c-Met* как потенциальную мишень для терапевтического воздействия. На начальных стадиях клинических испытаний находятся МКА **AMG-102** против HGF и ряд других МКА и ингибиторов протеинкиназы *c-Met*, которые предполагается применять при раке почки и злокачественной глиоме [9].

c-Kit (CD117) – рецептор фактора стволовых клеток SCF (stem cell factor) – в норме высоко экспрессирован на гемопоэтических стволовых клетках, мультипотентных и миелоидных предшественниках; на общих лимфоидных предшественниках, клетках эндотелия, меланоцитах, герминальных клетках половых желез и интерстициальных клетках рецептор экспрессирован слабо. Высокий уровень экспрессии *c-Kit* часто сопровождает малигнизацию: при лейкозах, меланоме, семиноме, GIST

оверэкспрессия *c-Kit* нередко сопровождается активирующими мутациями в 9; 11; 13 и 17 экзонах.

Рецепторы тромбоцитарного ФР PDGFR существуют в виде двух мономерных изоформ (PDGFR-α и PDGFR-β), их лигандами являются го-мо- и гетеродимеры семейства PDGF: PDGF-A, -B, -C и -D, не активные в мономерном состоянии. После связывания рецептора с лигандом формируется го-мо- или гетеродимер рецептора (PDGFR-αα, -αβ или -ββ), состав которого зависит от состава димера лиганда (-AA, -AB, -BB, -CC или -DD). Димеризация сопровождается фосфорилированием молекулы рецептора, приводящим к появлению ее собственной тирозинкиназной активности. Подобно рецепторам EGFR, рецепторы PDGFR регулируют множество клеточных функций, генерируемые ими сигналы передаются по тем же сигнальным путям и активируют сходные исполнительные механизмы; общий вектор их действия направлен на активацию деления и подавление программы клеточной гибели.

Как и в отношении рецептора *c-Met*, пригодные для терапевтического использования МКА к рецепторам PDGFR и *c-Kit*, так же как их специфические ингибиторы, пока не созданы. Но мультиспецифический ингибитор тирозинкиназы **иматиниб (Гли-век)**, подавляющий в ряду прочих активность и этих рецепторов, показал клиническую эффективность при лечении ранее считавшихся инкурабельными GIST. На II фазу клинических испытаний перешел другой неселективный ингибитор протеинкиназы **XL-880**, подавляющий тирозинкиназную активность рецепторов *c-Met*, PDGFR-β, *c-Kit*, VEGF-R2, FLT3, Tie-2 и Ron. Препарат испытывается для лечения рака почки, желудка и органов головы и шеи [47].

Ангиогенные/антиангиогенные факторы и их рецепторы

Еще в 1970-х гг. было обнаружено, что опухоль не вырастает размером более 2 мм³ без формирования новых кровеносных сосудов, питающих опухолевую ткань [12]. Это послужило толчком для активного исследования факторов, регулирующих процесс ангиогенеза, с целью разработки новых противоопухолевых средств. Был обнаружен эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) и его рецептор VEGF-R, который также передает в клетку стимулирующие сигналы фактора роста фибробластов (FGF) и фактора роста гепатоцитов (HGF). Важную роль в адгезии новых эндотелиальных клеток к базальной мембране и друг к другу, необходимой для роста сосудов, играют рецепторы молекул клеточной адгезии – интегрин $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha v\beta 3$ (*альфа-ню бета-три*). Поиск ингибиторов указанных факторов привел к созданию нескольких противоопухолевых лекарств. Помимо препаратов, воздействующих на факторы регуляции ангиогенеза, были разработаны средства, разрушающие уже сформировавшиеся сосуды.

Ингибиторы VEGF/VEGF-R

Как и описанные выше рецепторы EGFR, VEGF-R имеют несколько подтипов (-1, -2, -3) и содержат внеклеточный домен, связывающий лиганд, и внутриклеточный домен, обладающий тирозинкиназной активностью. Для блокады функций этих рецепторов разрабатываются низкомолекулярные ингибиторы протеинкиназ: на фармацевтический рынок уже выведено несколько лекарственных средств, другие проходят последние стадии клинических испытаний.

Так, неселективный ингибитор протеинкиназ **сорафениб (Нексавар)** подавляет активность рецепторных тирозинкиназ VEGF-R и PDGFR, а также нерецепторной киназы Raf. Препарат разрешен для клинического применения при поздних стадиях рака почки и при неоперабельном раке печени. Решение об одобрении препарата принято на основании весьма скромных результатов его клинической эффективности [24], но она касается опухолей, ранее считавшихся абсолютно рефрактерными к лекарственному лечению. Аналогичный ингибитор VEGF-R/PDGFR/c-Kit **сунитиниб (Сутент)** разрешен для лечения рака почки и GIST's. Недавно для лечения распространенного почечно-клеточного рака разрешен еще один ингибитор VEGF-R/PDGFR – **пазопаниб (Votrient)** [6], который также проходит исследования в рамках II и III фаз клинических испытаний для лечения различных солидных опухолей [37]. Ингибитор VEGF-R/PDGFR/c-Kit **ваталаниб (PTK-87)** находится на III фазе клинических испытаний для лечения КРП, а в рамках II фазы изучается возможность его применения при других типах солидных опухолей [45]. II фазу клинических исследований проходит ряд неселективных ингибиторов протеинкиназ, активных в отношении VEGF-R [47].

Терапевтические МКА против VEGF-R пока находятся на ранних стадиях изучения, но эффективным оказался противоположный подход – не блокада рецептора, а «ловушка» циркулирующего лиганда, VEGF, активно продуцируемого многими опухолями, что снижает концентрацию свободного ростового фактора и конкурентно ингибирует его связывание с рецептором. Препарат МКА к VEGF **бевацизумаб (Авастин)** разрешен для лечения РМЖ (в комбинации с паклитакселом), КРП (в комбинации с фторпиримидинами), НМРЛ (в комбинации с препаратами платины) и светлоклеточного рака почки (в комбинации с интерфероном альфа-2а), а аналогичный по механизму действия препарат на основе химерного белка **афлиберцепт**, представляющий собой растворимую форму рецептора и имеющий значительно большее средство к VEGF, чем МКА, проходит III фазу клинических испытаний для лечения рака яичника [27] и КРП. Другие МКА против VEGF находятся на ранних стадиях клинической разработки [20].

Блокаторы интегрин

Интегрины – обширное семейство трансмембранных гликопротеинов, общее название которых произведено от выполняемой ими функции клеточной интеграции – обеспечении межклеточной и клеточно-матриксной адгезии. Структурно интегрины являются облигатными гетеродимерами, состоящими из одной α - и одной β -субъединицы одной из нескольких форм каждой: $\alpha 1-6$ (CD49a-f); $\alpha L, -M, -X$ (CD11a, b, c); αv (CD51); $\beta 1$ (CD29), $\beta 2$ (CD18), $\beta 3$ (CD61) и др. Конкретная субъединичная композиция димера определяет его специфичность. Всего у человека известно 24 вида интегринов, экстрацеллюлярные домены которых могут выполнять двойную функцию: с одной стороны, они являются рецепторами компонентов внеклеточного матрикса (фибронектина, витронектина, коллагена, ламинина), сывороточных адгезионных белков (компонентов системы комплемента, фибриногена) или молекул клеточной адгезии (ICAM – intracellular adhesion molecules: CD50, CD54 и др.), а с другой – формируют функционально-ассоциированные антигены (например, LFA-1), являющиеся лигандами для иных молекул межклеточного взаимодействия.

Являясь рецепторами молекул клеточной адгезии, интегрины лишены собственной протеинкиназной активности [22], они выполняют роль молекулярного посредника между вне- и внутриклеточными белками. Так, экстрацеллюлярные N-концевые домены интегринов связываются с RGD-сайтами (трипептид Arg-Gly-Asp) лиганда, после чего C-концевые внутриклеточные участки формируют кластеры с цитозольными киназами, белками-адапторами и компонентами цитоскелета. Таким образом интегрины обеспечивают проведение сигналов в обе стороны клеточной мембраны: от внешнего окружения в клетку (инициируемое киназами фокальной адгезии деление фибробластов происходит только после их прикрепления к внеклеточному матриксу; напротив, утрата эпителиоцитом контакта с клеточным окружением активирует программу его гибели – апоптоза (см. ниже) сопровождается разрушением адгезионных взаимодействий клетки с матриксом.

Таким образом интегрины участвуют в регуляции пролиферации, выживания, миграции клеток; их блокада подавляет метастазирование опухолей и ангиогенез, активирует клеточную гибель. Блокаду интегринов можно осуществить экранированием их центров связывания с RGD-сайтами лиганда путем применения соответствующих МКА или пептидных/псевдопептидных блокаторов рецепторов – неактивных RGD-содержащих структурных аналогов природных лигандов. Критичными для васкуляризации опухоли мишенями являются экспрессированные на поверхности эндотелиоцитов интегрины $\alpha 5\beta 1$ и $\alpha v\beta 3$. Препарат МКА против интегрин $\alpha 5\beta 1$ **волоциксимаб** прошел II фазу клинических испытаний для лечения метастатического светлоклеточного рака почки [49] и в настоящее время в рамках той же фазы изучается возможность его применения для лечения поздних стадий рака яичника и метастатического рака поджелудочной железы (в комбинации с гемцитабином) [47]. На этой же фазе испытаний находится препарат МКА против интегрин $\alpha v\beta 3$ **этарацизумаб (Vitaxin)** для лечения метастатической меланомы [17] и пептидный блокатор интегрин $\alpha v\beta 3$ – циклический пентапептид **циленгитид** для лечения глиобластомы и рака предстательной железы [5; 42]. В целом антиинтегриновая терапия является относительно новым направлением в лекарственном лечении опухолей, оценивать клиническую эффективность и перспективу которого в настоящий момент преждевременно.

Средства, разрушающие сосуды (СРС)

СРС действуют путем нарушения кровоснабжения опухоли через уже существующие кровеносные сосуды. В предклинических исследованиях было показано, что эти препараты вызывают некроз ядра опухолевого очага, но при этом сохраняется жизнеспособное периферическое кольцо опухолевых клеток, которое, однако, доступно для воздействия высокомолекулярных противоопухолевых средств, например, цитостатиков и МКА [19; 43]. Большинство СРС действуют путем нарушения стабильности тубулинового цитоскелета эндотелиоцитов, в результате чего нарушается способность эндотелиальных клеток к пролиферации, подвижности и межклеточному взаимодействию. В итоге между эндотелиальными клетками образуются щели, в которые выходит плазма крови. Локальная вязкость крови увеличивается, и при контакте тромбоцитов с обнаженной базальной мембраной запускается процесс свертывания с образованием тромбов и развитием некроза ткани.

Среди СРС наибольшее развитие получили препараты группы комбретастинов – производные колхицина, которые вызывают деполимеризацию микротрубочек. Кроме того, они разрушают комплекс VE-кадгерин/ β -катенин, необходимый для поддержания межклеточного контакта. Первый препарат этой группы – **комбретастин А4 фосфат (СА4Р)** проходит II фазу клинических испытаний для применения в комбинации с цитостатиками при раке щитовидной железы, НМРЛ и некоторых других солидных опухолях [40]. На той же фазе находится еще несколько производных комбретастина.

II фазу клинических исследований проходит препарат **соблидотин (TZT-1027)** – синтетическое производное токсина доластатина, выделенного из обитающего в Индийском океане моллюска *Dolabella auricularia*. Этот препарат предполагается применять для лечения НМРЛ и сарком [41]. Кроме того, производное флавоноидов **вадимезан (АSА404, 5,6-диметилксантенон-4-уксусная кислота)**, в доклинических исследованиях вызывавший апоптоз эндотелиальных клеток по неясному механизму с участием транскрипционного фактора NF- κ B, фактора некроза опухоли TNF α и сигнальной молекулы оксида азота [8], в настоящее время проходит III фазу клинических испытаний в комбинации с карбоплатином/доцетакселом во 2-й линии терапии поздних стадий НМРЛ [25]. В рамках II фазы изучается эффективность этого препарата при раке яичника и гормонрезистентном раке предстательной железы [16].

Про-/антиапоптозные факторы и их рецепторы

Апоптоз или запрограммированная гибель клеток – процесс, имеющий ключевое значение не только для развития организма в периоды эмбрио- и онтогенеза, но и для обеспечения его нормальной жизнедеятельности. Некоторые авторы полагают, что одним из признаков опухолевой трансформации является способность клеток избегать апоптоза [15]. Это утверждение спорное, но экспериментально доказано: снижение способности опухолевых клеток к апоптозу приводит к повышению их химио- и радиорезистентности.

Программа апоптоза представляет собой каскад последовательных биохимических реакций, приводящий в действие механизм планомерного разрушения клеточной архитектуры с последующей утилизацией остатков соседствующими макрофагами. Программа запускается различными факторами, действующими как внутри клетки, так и приходящими из внеклеточной среды. К первым относятся **факторы внутриклеточного неблагополучия**, в том числе несправимые повреждения биомолекул – ДНК и белков – которые возникают при действии цитотоксических соединений, окислительном стрессе, ионизирующем облучении и др. Ко вторым – **опосредованные трансмембранными рецепторами сигналы цитокинов** суперсемейства фактора некроза опухоли (TNFSF), **нарушение адгезии и межклеточного взаимодействия, недостатков ростовых факторов**. Оба пути передачи апоптозного сигнала конвергируют в единый исполнительный механизм – каскадную активацию эффекторных каспаз – семейства цистеиновых протеиназ, ключевыми субстратами которых являются белки ядерной ламинаы, поли-(АДФ-рибозо)-полимеразы, белки цитоскелета, транскрипционный фактор NF κ B, гистон H1 и ингибитор ДНК-фрагментирующего фактора DFF (другое название – каспаза-активируемая ДНКаза САД). В результате протеолиза этих субстратов разрушается ядерная

стенка, прекращаются репаративные процессы в ядре, дезинтегрируется цитоскелет и активированный DFF производит межнуклеосомную фрагментацию ДНК. На финальной стадии процесса погибающая клетка распадается на «апоптозные тела», фагоцитируемые ее соседями [1].

Однако начальные события формирования апоптозного сигнала для альтернативных сигнальных путей принципиально различаются. Активированные TNF-подобные рецепторы непосредственно трансактивируют каспазный каскад, а сигналы внутреннего неблагополучия, исходящие от многочисленных и разнообразных внутриклеточных сенсоров, изменяют свойства мембран митохондрий, в результате чего происходит падение их трансмембранного потенциала и открытие транзитных пор, сквозь которые в цитозоль выходит ряд митохондриальных белков, в том числе белок дыхательной цепи цитохром *c*, флавопротеид AIF и белок SMAC/Diablo, каждый из которых является самостоятельным эффектором в выполнении программы апоптоза. Проницаемость мембраны митохондрий контролируется балансом про- и антиапоптозных белков соответственно семейств Bax (Bax, Bad, Bid, Bcl-2, Bcl-X_s, Noxa, Puma, BNip1) и Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Bfl-1).

Наличие альтернативных путей активации апоптоза определило два направления поиска средств, перспективных таргетной терапии.

Проапоптозные факторы

Экспрессия на поверхности опухолевых клеток специальных рецепторов смерти (DR – death receptors), запускающих программу гибели клетки по сигналу цитокинов суперсемейства TNFSF, может быть использована для медикаментозной активации апоптоза. Однако уже начальные клинические исследования TNF α и Fas-лиганда показали их высокую токсичность [39], связанную с широкой распространенностью рецепторов смерти TNFR-1 и Fas/Apo-1/CD95 на клетках большинства нормальных тканей. Впоследствии внимание было сконцентрировано на рецепторах группы Apo-2 другого цитокина суперсемейства TNFSF – лиганда TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), включающей функционально активные рецепторы DR4 и DR5, а также «рецепторы-обманки» DcR1 и DcR2, связывающие лиганд, но не генерирующие сигнал смерти. Первые два экспрессируются преимущественно в опухолевых клетках, в то время как на поверхности нормальных преобладают «обманки», в связи с чем для нормальных тканей TRAIL малоактивен [51]. Изучается противоопухолевая эффективность рекомбинантного TRAIL, а имитирующие действие природного лиганда активирующие МКА к DR4 (**мапатумумаб, HGS-ETR1**) и к DR5 (**АМG-655** и **лесагумумаб, HGS-ETR2**) проходят II фазу клинических испытаний: первые – по показанию резистентного КРР [44] и НХЛ, а вторые – для лечения НМРЛ, КРР, рака поджелудочной железы и сарком [47].

Антиапоптозные факторы

Ген *Bcl-2* – прото-онкоген, гиперэкспрессия которого является частой причиной развития резистентности опухолей к химиотерапии [11]. Степень экспрессии гена коррелирует со стадией прогрессии опухоли, а подавление биосинтеза его белкового продукта – митохондриального белка Bcl-2 – с помощью антикомплементарных олигонуклеотидов оказывает самостоятельное цитотоксическое действие на клетки лейкоза и лимфомы *in vitro*, а также усиливает эффект цитостатиков.

В исследованиях по III фазе добавление **облимерсена (Genasense)**, препарата антикомплементарных олигонуклеотидов против мРНК Bcl-2, к комбинации флюдарабин + циклофосфан увеличивало частоту и длительность эффекта у больных рецидивирующим/резистентным ХЛЛ, а также увеличивало 3- и 5-летнюю безрецидивную выживаемость [29]. В рамках II фазы изучается его эффективность при ряде солидных опухолей и гемобластозов [47]. На I/II фазах клинических испытаний находится неселективный ингибитор белков семейства Bcl-2 **обатоклакс (GX015-070)**, который предполагается применять при НМРЛ, лимфомах, множественной миеломе, миелодисплазии [30]. В последнее время привлекает внимание другой эндогенный ингибитор апоптоза – белок сурвивин, кодируемый геном *Birc5*. Он экспрессирован в клетках самых разных опухолей, но отсутствует в нормальных, дифференцированных тканях [28]. Его высокая экспрессия является фактором прогрессирования опухоли, рецидива и негативного прогноза [31], а подавление экспрессии антикомплементарными олигонуклеотидами тормозит пролиферацию опухолевых клеток и вызывает их апоптоз [21]. Препарат **LY2181308**, антикомплементарных олигонуклеотидов против *Birc5*, проходит II фазу клинических испытаний для лечения ХЛЛ и рака предстательной железы [34], а ингибитор сурвивина **YM-155** на той же фазе изучается для лечения поздних стадий НМРЛ [13].

Литература

1. Блохин Д.Ю. Программированная гибель клеток в механизмах циторедуктивной терапии опухолевых заболеваний: В кн. «Клиническая онкогематология» под ред. проф. М.А. Волковой. – М.: Медицина, 2007. – С.200–16.
2. Герасимова Г.К. Механизм действия противоопухолевых препаратов (ibidem). – С.217–45.
3. Belani C.P. The role of irreversible EGFR inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer: overcoming resistance to reversible EGFR inhibitors // Cancer Invest. – 2010. – 28(4). – P. 413–23.
4. Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E., Vande Woude G.F. Met, metastasis, motility and more // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2003. – 4. – P. 915–25.
5. Bradley D.A., Daignault S., Ryan C.J. et al. Cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in asymptomatic metastatic castration resistant prostate cancer patients: a randomized phase II trial by the prostate cancer clinical trials consortium // Invest New Drugs. – 2010 March 25, [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20336348.
6. Bukowski R.M. Pazopanib: a multikinase inhibitor with activity in advanced renal cell carcinoma // Expert Rev Anticancer Ther. – 2010. – 10(5). – P. 635–45.
7. Carpenter G., Cohen S. Epidermal growth factor // J Biol Chem. – 1990. – 265. – P. 7709–12.
8. Ching L.M., Cao Z., Kieda C. et al. Induction of endothelial cell apoptosis by the antivascular agent 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid // Br J Cancer – 2002. – 86. – P. 1937–42.
9. Davis I.J., McFadden A.W., Zhang Y. et al. Identification of the receptor tyrosine kinase c-Met and its ligand, hepatocyte growth factor, as therapeutic targets in clear cell sarcoma // Cancer Res. – 2010. – 70(2). – P. 639–45.
10. Dharmawardana P.G., Giubellino A., Bottaro D.P. Hereditary papillary renal carcinoma type I // Curr Mol Med. – 2004. – 4. – P. 855–68.
11. Fesik S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery // Nat Rev Cancer. – 2005. – 5. – P. 876–85.
12. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications // N Engl J Med. – 1971. – 285. – P. 1182–6.
13. Giaccone G., Zatloukal P., Roubec J. et al. Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer // J Clin Oncol. – 2009. – 27(27). – P. 4481–6.
14. Gridelli C., Rossi A., Bareschino M.A. et al. The potential role of insulin-like growth factor receptor inhibitors in the treatment of advanced non-small cell lung cancer // Expert Opin Investig Drugs. – 2010. – 19(5). – P. 631–9.
15. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // Cell. – 2000. – 100. – P. 57–70.
16. Head M., Jameson M.B. The development of the tumor vascular-disrupting agent ASA404 (vadimezan, DMXAA): current status and future opportunities // Expert Opin Investig Drugs. – 2010. – 19(2). – P. 295–304.
17. Hersey P., Sosman J., O'Day S. et al. A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin alpha(v)beta(3), + or – dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma // Cancer – 2010. – 116(6). – P. 1526–34.
18. Hewish M., Chau I., Cunningham D. Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics: novel compounds and novel treatment strategies for cancer medicine // Recent Pat Anticancer Drug Discov. – 2009. – 4(1). – P. 54–72.

Заключение

Благодаря накопленной информации о молекулярных механизмах опухолевого роста и закономерностях прогрессии опухолей, за два последних десятилетия создан и внедрен в клиническую практику целый ряд новых противоопухолевых лекарств патогенетического действия, существенно преобразивший арсенал химиотерапевтических средств.

Вместе с тем, о каких-либо революционных находках для лекарственного лечения опухолей говорить пока рано.

Доклинические исследования и клинические испытания новых лекарственных препаратов сталкиваются с теми же проблемами, какие существовали в химиотерапии ранее: невысокая эффективность, недостаточная избирательность действия, развитие лекарственной устойчивости сопровождают применение «таргетных» препаратов так же, как это наблюдается при использовании классических цитостатиков и цитотоксинов.

Тем не менее, выбранное направление поиска новых средств борьбы с опухолями следует считать перспективным, поскольку расширение арсенала лекарственных средств повышает свободу выбора для наиболее эффективных схем комбинированного лечения.

19. Hinnen P., Eskens F.A. Vascular disrupting agents in clinical development // *Br J Cancer*. – 2007. – 96. – P. 1159–65.
20. Hsu J.Y., Wakelee H.A. Monoclonal antibodies targeting vascular endothelial growth factor: current status and future challenges in cancer therapy // *BioDrugs*. – 2009. – 23(5). – P. 289–304.
21. Hunter A.M., LaCasse E.C., Korneluk R.G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets//*Apoptosis*. – 2007. – 12. – P. 1543–68.
22. Jin H., Varner J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets // *Br J Cancer*. – 2004. – 90. – P. 561–5.
23. Karp D.D., Paz-Ares L.G., Novello S. et al. High activity of the anti-IGF-IR antibody CP-751,871 in combination with paclitaxel and carboplatin in squamous NSCLC [abstract] // *J Clin Oncol*. – 2008. – 26(suppl). – P. 8015.
24. Llovet J.M., Ricci S., Mazzaferro V. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma // *N Engl. J Med*. – 2008. – 359. – P. 378–90.
25. McKeage M.J., Reck M., Jameson M.B. et al. Phase II study of ASA404 (vadimezan, 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid/DMXAA) 1800mg/m(2) combined with carboplatin and paclitaxel in previously untreated advanced non-small cell lung cancer // *Lung Cancer* – 2009. – 65(2). – P. 192–7.
26. Minkovsky N., Berezov A. BIBW-2992, a dual receptor tyrosine kinase inhibitor for the treatment of solid tumors // *Curr Opin Investig Drugs*. – 2008. – 9(12). – P. 1336–46.
27. Moroney J.W., Sood A.K., Coleman R.L. Aflibercept in epithelial ovarian carcinoma // *Future Oncol*. – 2009. – 5(5). – P. 591–600.
28. Nachmias B., Ashhab Y., Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer // *Semin Cancer Biol*. – 2004. – 14. – P. 231–43.
29. O'Brien S., Moore J.O., Boyd T.E. et al. 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen // *J Clin Oncol*. – 2009. – 27(31). – P. 5208–12.
30. Paik P.K., Rudin C.M., Brown A. et al. A phase I study of obatoclox mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in solid tumor malignancies // *Cancer Chemother Pharmacol*. – 2010 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20165849.
31. Paik S., Shak S., Tang G. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen treated, node-negative breast cancer // *N Engl J Med*. – 2004. – 351. – P. 2817–26.
32. Pollak M. Insulin-like growth factor-related signaling and cancer development // *Recent Results Cancer Res*. – 2007. – 174. – P. 49–53.
33. Rosario M., Birchmeier W. How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosinekinase // *Trends Cell Biol*. – 2003. – 13. – P. 328–35.
34. Ryan B.M., O'Donovan N., Duffy M.J. Survivin: a new target for anti-cancer therapy // *Cancer Treat Rev*. – 2009. – 35(7). – P. 553–62
35. Sachdev D., Yee D. Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy // *Mol Cancer Ther*. – 2007. – 6. – P. 1–12.
36. Sawyer T.K. Novel oncogenic protein kinase inhibitors for cancer therapy // *Curr Med Chem Anticancer Agents* – 2004. – 4. – P. 449–55.
37. Schutz F.A., Choueiri T.K., Sternberg C.N. Pazopanib: Clinical development of a potent anti-angiogenic drug // *Crit Rev Oncol Hematol*. – 2010 Apr 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20456972.
38. Sciacca L., Costantino A., Pandini G. et al. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism // *Oncogene* – 1999. – 18. – P. 2471–9.
39. Sherman M.L., Spriggs D.R., Arthur K.A. et al. Recombinant human tumor necrosis factor administered as a 5-day continuous infusion in cancer patients: phase I toxicity and effects on lipid metabolism // *J Clin Oncol*. – 1988. – 6. – P. 344–50.
40. Siemann D.W., Chaplin D.J., Walicke P.A. A review and update of the current status of the vasculature-disabling agent combretastatin-A4 phosphate (CA4P) // *Expert Opin Investig Drugs* – 2009. – 18(2). – P. 189–97.
41. Singh R., Sharma M., Joshi P., Rawat D.S. Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources // *Anticancer Agents Med Chem*. – 2008. – 8(6). – P. 603–17.
42. Stupp R., Hegi M.E., Neyns B. et al. Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide With Concomitant Radiotherapy Followed by Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma // *J Clin Oncol*. – 2010 May 3. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20439646.
43. Tozer G.M., Kanthou C., Baguley B.C. Disrupting tumour blood vessels // *Nat Rev Cancer*. – 2005. – 5. – P. 423–35.
44. Trarbach T., Moehler M., Heinemann V. et al. Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer // *Br J Cancer*. – 2010. – 102(3). – P. 506–12.
45. Wagner A.D., Arnold D., Grothey A.A. et al. Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2009. – 3. – CD005392
46. Weiner G.J. Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer // *Immunol Res*. – 2007. – 39. – P. 271–8.
47. Wen W. Ma and Alex A. Adjei. Novel Agents on the Horizon for Cancer Therapy // *CA Cancer J Clin*. – 2009. – 59. – P. 111–37.
48. Yarden Y., Sliwkowski M.X. Untangling the ErbB signalling network // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2001. – 2. – P. 127–37.
49. Yazji S., Bokowski R., Kondagunta V., Figlin R. Final results from phase II study of volociximab, an 5 1 anti-integrin antibody, in refractory or relapsed metastatic clear cell renal cell carcinoma (mCCRCC) [abstract] // *J Clin Oncol*. – 2007. – 18S(suppl). – P. 5094.
50. Yu J., Miehlke S., Ebert M.P. et al. Frequency of TPR-MET rearrangement in patients with gastric carcinoma and in first-degree relatives // *Cancer* – 2000. – 88. – P. 1801–6.
51. Ziegler D.S., Kung A.L. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer // *Curr Opin Oncol*. – 2008. – 20. – P. 97–103.

УДК 616-006-092:611.13/16-018

*И.Н. Григорьева, Т.К. Харатишвили, А.Ю. Барышников***ВАСКУЛОГЕННАЯ МИМИКРИЯ:
АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕХАНИЗМ КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ ОПУХОЛИ?**
*РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация:***Григорьева Ирина Николаевна, научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО*

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(495)324-10-65

e-mail: i.n.grigorieva@gmail.com

Статья поступила 19.04.2011., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Роль васкулогенной мимикрии в качестве альтернативного механизма кровоснабжения злокачественных опухолей пока еще не определена. ВМ представляет собой процесс формирования опухолевыми клетками в отсутствие эндотелиальных клеток васкулярных каналов, ограниченных базальной мембраной. *In vitro* высокоагрессивные опухолевые клетки формируют сосудистоподобные и тубулярные структуры, схожие со структурами ВМ, присутствующими на гистологических срезах злокачественных опухолей. Структуры ВМ определяются с помощью метода PAS-окрашивания.

Ключевые слова: васкулогенная мимикрия, васкуляризация, PAS-окрашивание.*I.N. Grigorieva, T.K. Kharatishvili, A.Yu. Baryshnikov***AN ALTERNATIVE MECHANISM IN TUMOR VASCULARIZATION:
VASCULOGENIC MIMICRY***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

The role of vasculogenic mimicry as an alternative tumor vascularization mechanism is still unclear. VM is a unique process when tumor cells form matrix-rich vessel-like channels without endothelial cells. Highly aggressive tumor cells are able to form capillary-like and vessel-like structures *in vitro* on Matrigel. Three-dimensional vessel-like structures are similar to VM channels visualized by PAS-staining.

Key words: vasculogenic mimicry, vascularization, PAS-staining.**Введение**

Васкулогенная мимикрия – процесс формирования опухолевыми клетками в отсутствие ЭК каналов, ограниченных базальной мембраной. Базальный ламинарный матрикс был выявлен методом PAS-окрашивания. ВМ впервые была показана R. Folberg на срезах меланомы глаза в 1999 г. [11] и была случайной находкой патолога.

Однако, еще до открытия феномена васкулогенной мимикрии, в 1940-х гг. были обнаружены структуры, отличные от кровеносных сосудов, выстланных эндотелиальными клетками. Первоначально были выявлены петли и арки, окружающие скопления опухолевых клеток на моделях опухолей мышей и на срезах высокоагрессивной меланомы. Обнаруженные на срезах петли и арки формировали сети, также выстланные опухолевыми клетками и богатые ламинином. Исследования срезов опухолей, в которых встречались такие структуры показали, что скопления опухолевых клеток сферической формы могли содержать небольшое пространство между собой, в котором видны форменные элементы крови [37; 39; 41]. Превалирующей ранее гипотезой являлась предположение, что данные каналы являлись результатом слабости стенок кровеносных сосудов. Однако некоторые ученые предположили возможную взаимосвязь этих структур с доставкой крови в растущую опухоль. Было и другое предположение: возможно, эти каналы участвуют в диссеминации опухоли [18].

До настоящего времени не оценена роль васкулярных каналов в развитии кровоснабжения опухоли. Существуют противоречивые мнения. Некоторые авторы [30] не рассматривают данные структуры, как имеющие функциональное значение в качестве каналов, участвующих в кровотоке. Появление в этих каналах эритроцитов объясняется выходом форменных элементов крови в соединительную ткань [30].

R. Folberg приводит исследования других авторов, которые свидетельствуют о возможном участии петлевых структур в кровоснабжении опухоли. Так, при проведении ангиографического исследования кровотока в ткани меланомы глаза были найдены петлевые структуры, которые в последующем [32; 33; 36] были подтверждены исследованием гистологических срезов опухолей с помощью PAS-реакции.

PAS-положительные структуры

PAS-реакция – это неспецифический индикатор полисахаридов. Они содержатся в базальной мембране, включая базальную мембрану кровеносных сосудов.

PAS-реакция основана на окислении 1 %-ной периодической (периодной) кислотой, которая разрывает С-С связи 1,2-гликоля и превращает его в диальдегиды без дальнейшего окисления в карбоновые кислоты. Эти диальдегиды впоследствии могут сформировать циклическое окрашенное соединение с фуксин-сульфуровой кислотой (реактив Шиффа).

Установлено, что только 1% возможных мест окисляется под воздействием кислоты. Для улучшения окисления использовали усиленную PAS-реакцию. Она выглядела несколько размытой по сравнению со стандартно проведенной PAS-реакцией, что было вызвано сверхокислением. При меланоме кожи и глаза усиленная реакция была предпочтительнее.

С реактивом PAS часто реагируют протеогликаны стромы, в связи с этим некоторые PAS-положительные структуры не представляют собой кровеносные сосуды и не имеют связи с кровеносными сосудами. Ранее в офтальмологии PAS-окрашивание использовали для выявления интраокулярных базальных мембран. Постановку реакции осуществляли без последующего докрасивания гематоксилин-эозином, визуализирующего ядра клеток. С применением такой модификации метода PAS-положительные структуры были заметнее.

В результате исследований с использованием PAS-окрашивания R. Folberg et al. [11] описали 7 типов структур, найденных на гистологических срезах первичной меланомы глаза:

- прямые каналы, представляющие собой структуры, случайным образом распределенные в опухолевой ткани с отсутствием ответвлений и не соединенные между собой;
- параллельные прямые каналы, представляющие собой каналы, идущие параллельно друг другу без ответвлений и пересечений;
- прямые параллельные каналы с пересечением, связанные между собой;
- арки, представляющие собой не полностью замкнутые петли;
- арки с ветвлением, по типу ветвления деревьев;
- петли, представляющие собой полностью замкнутые, округлые каналы (наличие хотя бы одной такой замкнутой петли позволяет считать эти структуры присутствующими в ткани опухоли);
- сети, которые представляют собой как минимум три замкнутые петли, прилегающие одна к другой.

По виду преобладающих PAS⁺ структур опухоли условно могут быть разделены на 2 иерархические группы [11]:

1. Опухоли, которые содержат параллельные с пересечением каналы, параллельные и изолированные прямые каналы.
2. Опухоли, которые содержат сети, петли, арки с ветвлениями или арки без ветвления.

Для меланомы кожи характерен дополнительный тип PAS-структур – «дермальные гнезда» [42]. Он представляет собой скопление пакетов меланомных клеток, которые окружены, хотя бы частично, дермой. Из-за своей округлой формы эти дермальные пакеты можно спутать с петлями, которые часто встречаются в ткани меланомы глаза.

Многие авторы подвергали сомнению факт участия PAS-структур в васкуляризации. Так, например, A.J.E. Foss et al. [12–14] считали, что петлевые структуры, определяемые PAS-окрашиванием в ткани меланомы глаза, не могут участвовать в васкуляризации из-за их топологического разнообразия. Их аргументом было наблюдение, что кровеносные сосуды практически не формируют петлевые структуры на двухслойных гистологических срезах. Несмотря на это, предположение о том, что анастомозы или соединения между сетями, окруженными опу-

холевыми клетками, и кровеносными сосудами из эндотелиальных клеток могут играть роль в сохранении эритроцитов в микроциркуляторном русле не отвергалось. Отдифференцировать ангиогенные сосуды от структур ВМ можно при проведении окрашивания на маркеры эндотелиальных клеток.

Отличие структур васкулогенной мимикрии от сосудов, состоящих из эндотелиальных клеток

Первоначально проводили PAS-окрашивания и иммуногистохимический анализ маркеров васкуляризации как два отдельных метода исследования.

В качестве маркеров васкуляризации использовали UEA-1, CD31 и фактор Фон Виллебранда (VIII as.ag.). UEA-1 считался надежным маркером для определения структур, участвующих в кровоснабжении [4; 8; 9; 29], и использовался наиболее часто. Но для получения парафиновых блоков опухоли при применении UEA-1 в качестве маркера васкуляризации фиксировали стандартно с применением формалина, который усиливал естественную аутофлуоресценцию тканей [10] и желтую флуоресценцию в меланоцитах [31]. В связи с этим, несмотря на большую эффективность этого окрашивания, от дальнейшего использования UEA-1 пришлось отказаться. Предпочтение было отдано использованию VIII as.ag и CD31.

R. Folberg et al. при сравнении результатов PAS-реакции и окрашивания на маркеры васкуляризации, следуя протоколу, описанному N. Weidner et al. [12; 13; 43], пришли к выводу, что каждый участок, окрашенный маркером эндотелиальных клеток, представляет собой отдельный кровеносный сосуд, а соединения между ними – структуры васкулогенной мимикрии. В дальнейшем для выявления каналов, состоящих только из опухолевых клеток, был разработан специальный метод исследования, включающий в себя проведение окрашивания на маркеры эндотелиальных клеток и последующей PAS-реакции [11]. Поскольку эндотелиальные сосуды также окрашиваются положительно при проведении PAS-реакции, то этот метод является альтернативой при дифференцировании сосудов, образованных эндотелиальными и опухолевыми клетками. Было проведено исследование, посвященное сравнительной эффективности использования таких маркеров васкуляризации, как von Willebrand factor (VIII as.ag), CD34 и CD31 для определения ангиогенных сосудов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что более четкое определение сосудов достигается при использовании CD34 [44]. Сосуды, состоящие только из эндотелиальных клеток, обладают двойным CD34⁺/PAS⁺ окрашиванием. В то время как структуры васкулогенной мимикрии являются CD34⁻/PAS⁺-каналами.

Для проведения двойного окрашивания парафиновые блоки исследуемого материала нарезаются стандартным методом, подготавливаются к иммуногистохимическому исследованию, наносятся первичные антитела в необходимом уже известном разведении, используемом для окрашивания сосудов в опухоли. После окончания иммуногистохимической реакции проводится PAS-окрашивание.

После разработки методики двойного окрашивания стало понятно, что этот метод можно использовать как стандартный для определения структур васкулогенной мимикрии. В зависимости от задач поставленного исследования и типа опухоли, можно комбинировать маркеры для проведения иммуногистохимической реакции.

Так, можно, например, проводить двойное окрашивание с использованием CD105. Нами было проведено изучение васкуляризации меланомы кожи с использованием комбинированного метода исследования. В качестве маркеров васкуляризации были выбраны CD31 и CD34. Были выявлены CD31⁺/CD34⁺/PAS⁺-структуры, которые представляют собой ВМ-структуры. Было также показано, что ВМ-структуры соединяются с сосудами крови (рис. 1; см. вклейку). На основании исследования сосудистой плотности опухоли нами отмечено достоверное уменьшение количества ангиогенных сосудов с 35±4 штук в поле зрения в зоне максимальной сосудистой плотности до 10±2 штук в поле зрения в зоне ВМ (p=0,05) (рис. 2 А, Б). Несмотря на значительное снижение числа микрососудов в зоне ВМ, некрозов не было выявлено, что косвенно свидетельствует о возможном участии каналов, состоящих из опухолевых клеток, в васкуляризации.

Способность формировать СПС

Открытие способности высокоагрессивных клеток метастатической меланомы формировать сосудистоподобные структуры привело к сравнению сформированных *in vitro* структур с каналами, выявляемыми на гистологических срезах первичной высокоагрессивной и метастатической меланомы глаза и кожи [40]. Показано, что данные структуры являются морфологически идентичными.

Исследование способности клеточных линий меланомы глаза формировать структуры ВМ проводили по аналогии с исследованием эндотелиальных клеток на ингибиторы и активаторы ангиогенеза [7]. ЭК, прикрепляясь к гелю, имитировали процесс формирования капилляров *in vivo*.

С помощью оптимизированной методики [3] показано, что клеточные линии метастатической меланомы кожи человека способны формировать СПС *in vitro*, когда в качестве матрикса использовался Матригель (компонент базальных мембран). Высокоагрессивные клетки меланомы при инкубации на Матригеле способны формировать не только СПС (при культивировании опухолевых клеток в низкой плотности в течение 8–24 ч), но и тубулярные структуры (при культивировании клеток в высокой плотности в течение 2–3 нед).

Способность формировать СПС клетками метастатической меланомы кожи была различной, что было обусловлено способностью экспрессировать белки, участвующие в процессе ВМ. Вовлечение VE-кадгерина в формирование васкулярных каналов было выявлено одним из первых [34]. Этот белок принадлежит к семейству трансмембранных протеинов, способствует гомотипическому межклеточному взаимодействию [17; 21; 23; 25]. Его роль в васкуляризации была подтверждена с использованием нокаута гена в эксперименте на мышах, что приводило к смерти в эмбриональном периоде из-за недостаточности кровообращения и отсутствия функциональных кровеносных сосудов [16]. Экспрессия VE-кадгерина и EphA2 требуются для формирования и поддержания кровеносных сосудов. Зарубежными исследователями продемонстрировано, что моноклональные антитела к VE-кадгерину ингибируют ангиогенез в карциноме легкого Льюис и эпидермоидных опухолях. [5; 22; 26; 35; 42]. Другие исследования показали, что уменьшение экспрессии VE-кадгерина коррелирует с уменьшением способности формировать СПС *in vitro* [19].

В 2006 г. A.R. Hess et al. выявили, что при формировании ВМ VE-кадгерин колокализован с EphA2 в области межклеточных контактов и что в

процессе формирования васкулярных каналов происходит взаимодействие этих двух молекул [20].

Молекулярные механизмы ВМ

Гомотипическое связывание молекул VE-кадгерина близлежащих клеток приводит к транслокации EphA2 на плазматическую мембрану, где он связывается с мембранной формой субстрата – эфринном A1. Происходит фосфорилирование EphA2. Фосфорилированный EphA2 колокализован с VE-кадхерином так же как и с фосфорилированной FAK на мембране высокоагрессивных меланомных клеток. Сигнальные пути, запускаемые VE-кадхерином и EphA2, замыкаются на PI3K. Активация PI3K приводит к повышению активности металлопротеиназ MMP-1 и MMP-2, участвующих в расщеплении ламинина.

Ламинины являются важными компонентами базальной мембраны, которые участвуют в регуляции роста, опухолевого метастазирования, прикрепления клеток к матриксу и миграции [6; 27; 38]. Протеолитическое расщепление металлопротеиназами MMP-1 и MMP-2 ламининов на фрагменты, в частности на ламинин 5γ2 может провоцировать интегрин-опосредованную миграцию клеток, что является триггером прогрессии меланомы [15; 24; 28; 38].

Проведенное нами иммуноцитохимическое исследование клеток линий метастатической меланомы кожи, формирующих стабильные сосудистоподобные структуры, показало, что они экспрессируют VE-кадгерин и ламинин5γ2 неодинаково (см. табл.). Это позволило выделить клеточную линию метастатической меланомы кожи *mel Cher* в качестве положительной модели васкулогенной мимикрии. Линия клеток получена из опухолевого образца метастатического лимфатического узла. Клеточная линия адаптирована к росту *in vitro*, особенностью клеточной линии является ее способность стабильно воспроизводить процесс ВМ *in vitro* на внеклеточных матриксах и *in vivo* на иммунодефицитных мышах [1]. Формирование СПС клеточной линией метастатической меланомы кожи *mel Cher* схоже со структурами, формируемыми клеточной линией эндотелиальных клеток SVEC-4-10 [2]. Ранее нами было показано, что методика постановки исследования в случае эндотелиальных клеток SVEC-4-10 и опухолевых клеток метастатической меланомы кожи не имеет существенных отличий. Холодный Матригель наносим на дно лунки 48-луночного планшета, полимеризуем гель при 37 °C в течение 20 мин. Клетки наносим в количестве 100 000 на лунку в полной среде RPMI-1640. В случае эндотелиальных клеток SVEC-4-10 результат оцениваем через 4–5 ч. При исследовании опухолевых клеток метастатической меланомы кожи человека *mel Cher* результат можно оценивать через 4 ч.

Проведенное нами исследование васкуляризации меланомы кожи на парафиновых срезах опухолей показало наличие соединений между каналами из опухолевых клеток (CD31⁺/CD34⁺/PAS⁺-структурами) и кровеносными сосудами (CD31⁺/CD34⁺/PAS⁺-структурами). После создания положительной модели васкулогенной мимикрии клеточной линии метастатической меланомы кожи *mel Cher* нами проанализирована возможность образования соединений между эндотелиальными и опухолевыми клетками в процессе формирования СПС на внеклеточном матриксе Матригеле *in vitro*. Опухолевые клетки клеточной линии метастатической меланомы кожи *mel Cher* предварительно окрашивались витальным флуоресцентным красителем флуоресцеином (CFSE), связывающимся с внутриклеточными белками.

Таблица

Экспрессия клеточными линиями, стабильно формирующими СПС, сопряженных с VM белков

Клеточные линии	Ламинин 5 γ 2	VE-кадгерин	Формирование СПС
mel Cher	Окрашивание средней интенсивности цитоплазмы и мембраны 90 % опухолевых клеток	Окрашивается цитоплазма 100 % опухолевых клеток со средней интенсивностью	Формирование стабильных СПС
mel P	Окрашивание средней интенсивности цитоплазмы и мембраны 60 % опухолевых клеток	Окрашивается цитоплазма 90 % опухолевых клеток со слабой интенсивностью	Формирование стабильных СПС
mel Ch	Окрашивание средней интенсивности цитоплазмы и мембраны 40–50 % опухолевых клеток	Отсутствует окрашивание опухолевых клеток	Формирование стабильных СПС

Матригель наносили на предметное стекло тонким слоем, после полимеризации геля эндотелиальные клетки линии SVEC-4-10 и опухолевые клетки линии *mel Cher* инкубировали на подготовленном матриксе в течение 4–5 ч. Результат оценивали под световым микроскопом. Подтверждение соединения эндотелиальных клеток и опухолевых клеток проводили с помощью иммунофлуоресценции. Ядра клеток окрашивали бисбензимином (Hoechst 33342). Результат исследования представлен на рис. 3. Нами было выявлено, что действительно происходит формирование СПС, состоящих из комбинации эндотелиальных и опухолевых клеток. Совместное формирование СПС свидетельствует о возможности формирования единой васкулярной сети с участие компонента васкулогенной мимикрии.

Заключение

Альтернативные механизмы кровоснабжения могут играть существенную роль в васкуляризации опухоли. Ангиографическое подтверждение наличия петлевых структур в ткани меланомы глаза свидетельствуют в пользу участия VM в кровоснабжении.

Результаты нашего исследования, описывающие формирование комбинированных сосудистоподобных структур на внеклеточном матриксе и уменьшение CD31⁺/CD34⁺ сосудов в зоне васкулогенной мимикрии при отсутствии некрозов в этой области, также косвенно свидетельствует о значении VM для сохранения кровотока в опухоли.

Литература

1. Григорьева И.Н., Степанова Е.В., Вартамян А.А. и др. Применение клеточной линии меланомы кожи человека *mel Cher* в качестве положительной модели васкулогенной мимикрии, заявка 09115731/10(021559), срок действия патента с 27.04.2009.
2. Григорьева И.Н., Бурова Е.В., Степанова Е.В. и др. Способность клеточных линий метастатической меланомы кожи к васкулогенной мимикрии // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 97–102.
3. Степанова Е.В., Вартамян А.А., Личиницер М.Р. Васкулярная мимикрия при злокачественных образованиях // Молекулярная медицина. – 2006. – № 1. – С. 23–30.
4. Bissell M.J. Tumor plasticity allows vasculogenic mimicry, a novel form of angiogenic switch: A rose by any other name? Commentary // Am. J. Pathol. – 1999. – 155. – P. 675–679.
5. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis // Nat. Med. – 2000. – 6. – P. 389–95.
6. Cognato H., Yurchenco P.D. Form and function: the laminin family of heterotrimers // Dev. Dynamics – 2000. – 218. – P. 213–34.
7. Donovan D., Brown N.J., Bishop E.T., Lewis C.E. Comparison of three in vivo human angiogenesis assays with capillaries formed in vivo // Angiogenesis. – 2001. – 4. – P. 113–21.
8. Folberg R. The morphologic characteristics of tumor blood vessels as a marker of tumor progression in primary human uveal melanoma: a matched case-control study // Hum. Pathol. – 1992. – 23. – P. 1298–305.
9. Folberg R. The prognostic value of tumor bloodvessel morphology in primary uveal melanoma // Ophthalmology. – 1993. – 100. – P.1389–98.
10. Folberg R. Tumor progression in ocular melanomas // J. Invest. Dermatol. – 1993. – 100. – P. 326S–331S.
11. Folberg R., Hendrix M.J.C., Maniatis A.J. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis // Am J Pathol. – 2000. – 156 – P. 361–81.
12. Foss A.J.E., Alexander RA, Jefferies LW, et al. Microvessel count predicts survival in uveal melanoma // Cancer Res. – 1996. – 56. – P. 2900–3.
13. Foss A.J.E., Alexander R.A., Hungerford J. et al. Re-assessment of the PAS patterns in uveal melanoma // Br J Ophthalmol. – 1997. – 81. – P. 240–6.
14. Foss A.E., Cree I.A. Reassessment of the PAS patterns in uveal melanoma – reply // Br J Ophthalmol. – 1998. – 82. – P.101–2.
15. Giannelli G., Jutta Falk-Marzillier, Oronzo Schiraldi et al. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5 // Science. – 1997. – 277. – P. 225–8.
16. Gory-Faure S., Prandini MH, Pointu H et al. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis // Development. – 1999. – 126. – P.2093–102.
17. Gumbiner B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis // Cell. – 1996. – 4. – P. 345–57.
18. Hashizume, H, Peter Baluk, Shunichi Morikawa et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness //Am. J.Pathol. – 2000. – 156. – P.1363–80.
19. Hendrix M.J., Seftor EA, Meltzer PS et al. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2001. – 98. – P. 8018–23.

20. Hess A.R., Seftor EA, Gruman LM et al. VE-cadherin regulates EphA2 in aggressive melanoma cells through a novel signaling pathway: implications for vasculogenic mimicry // *Cancer Biol. Ther.* – 2006. – 5. – P. 228–33.
21. Hynes R.O. Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 1992. – 2. – P. 621–4.
22. Hynes R.O., Bader B.L., Hodivala-Diike K. Integrins in vascular development // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 1999. – 32. – P. 501–10.
23. Kemler R. Classical cadherins // *Semin. Cell Biol.* – 1992. – 3. – P. 149–55.
24. Koshikawa N., Giannelli G, Cirulli V et al. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5 // *J. Cell Biol.* – 2000. – 148. – P. 615–24.
25. Lampugnani M.G. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell–cell contacts // *J. Cell Biol.* – 1992. – 118. – P. 1511–22.
26. Liao F., Li Y, O'Connor W, et al. Monoclonal antibody to vascular endothelial cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis // *Cancer Res.* – 2000. – 60. – P.6805–10.
27. Malinda K.M., Kleinman H.K. The laminins // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 1996. – 28. – P. 957–9.
28. Malinda K.M., Nomizu M, Chung M et al. Identification of laminin α 1 and β 1 chain peptides active for endothelial cell adhesion, tube formation, and aortic sprouting // *FASEB J.* – 1999. – 13. – P. 53–62.
29. Maniotis A.J., Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry // *Am. J. Pathology.* – 1999. – 155. – P. 739–52.
30. McDonald D.M., Lance Munn, Rakesh K.J. Vasculogenic Mimicry: How Convincing, How Novel, and How Significant? // *American Journal of Pathology* – 2000. – 156(2). – P. 383–8.
31. McLean I.W. The biology of haematogenous metastasis in human uveal malignant melanoma // *Virchows Arch A. Pathol. Anat.* – 1993. – 422. – P. 433–7.
32. Mueller A.J., Bartsch DU, Folberg R et al. Imaging the microvasculature of choroidal melanomas with confocal indocyanine green scanning laser ophthalmoscopy // *Arch Ophthalmol.* – 1998. – 116. – P. 31–9.
33. Mueller A.J., Freeman WR, Folberg R, et al. Evaluation of microvascularization pattern visibility in human choroidal melanomas: comparison of confocal fluorescein with indocyanine green angiography. // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* – 1999. – 237. – P. 448–56.
34. Paulis Y.W.J., Soetekouw P.M.M.B., Tjan-Heijnen V.C.G. et al. Signalling pathways in vasculogenic mimicry // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – P. 11. doi:10.1016/j.bbcan.2010.01.001.
35. Rummelt V., M G Mehaffey, R J Campbell et al. Microcirculation architecture of metastases from primary ciliary body and choroidal melanomas // *Am. J. Ophthalmol.* – 1998. – 126. – P. 303–5.
36. Schneider U., Gelisken F., Inhoffen W., Kreissig I. Indocyanine-green videoangiography of malignant melanomas of the choroid using the scanning laser ophthalmoscope // *Ger J Ophthalmol.* – 1996. – 5. – P. 6–11.
37. Shubik P., Warren B.A. Additional literature on 'vasculogenic mimicry' not cited // *Am. J. Pathol.* – 2000. – 156. – P. 736.
38. Straume O., Akslen, L.A. Importance of vascular phenotype by basic fibroblast growth factor, and influence of the angiogenic factors basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor-1 and Ephrin-A1/EphA2 on melanoma progression // *Am. J. Pathol.* – 2001. – 160. – P. 1009–19.
39. Tímár, J., Tóth, J. Tumor sinuses – vascular channels // *Pathol. Oncol. Res.* – 2000. – 6. – P. 83–6.
40. Vailhe B., Vittet D., Fiege J. In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis // *Lab. Invest.* – 2001. – 7. – P. 473–7.
41. Warren B.A., Shubik P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch // *Lab. Invest.* – 1966. – 15. – P. 464–78.
42. Warso M.A., Maniotis A J; Chen X et al. Prognostic significance of periodic acid-Schiff-positive patterns in primary cutaneous melanoma // *Clin. Cancer Res.* – 2001. – 7. – P. 473–77.
43. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma // *N. Engl. J. Med.* – 1991. – 324(1). – P. 1–8.
44. Wei-Ying Y., Zhong-Ping C. Does Vasculogenic Mimicry Exist in Astrocytoma? // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* – 2005. – 53(8). – P. 997–1002.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ
РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 617.51/.53-006.61-033.2:575.113

*Г.В. Какурина, И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзон***ПОСТГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПРОГНОЗЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМ ГОЛОВЫ И ШЕИ***НИИ онкологии СО РАМН, Томск***Контактная информация***Какурина Гелена Валерьевна, старший научный сотрудник лаборатории биохимии опухолей*

Адрес: 634050, Томск, пер. Кооперативный, д.5; тел. +7(3822)51-25-29

e-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru

Статья поступила 19.04.2011., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Злокачественные опухоли головы и шеи в общей структуре онкологической заболеваемости составляют в среднем 18–20 % и занимают шестое ранговое место. В 90–98 % морфологическим вариантом опухолей головы и шеи является плоскоклеточный рак. Наиболее часто поражаются гортань, гортаноглотка, ротоглотка, носоглотка и полость рта. Многочисленные клинические данные убедительно свидетельствуют о том, что одной из главных непосредственных причин гибели больных плоскоклеточными карциномами головы и шеи является локорегионарное метастазирование. Имеющиеся на сегодняшний день методы обнаружения метастазов на ранних этапах прогрессии опухоли до их клинического проявления недостаточно эффективны и надежны. Современное развитие постгеномных технологий привело к созданию новых методологий, позволяющих комплексно оценивать изменения, происходящие при злокачественной трансформации клеток и при приобретении опухолевыми клетками новых биологических свойств. С помощью транскриптомного и протеомного анализов тканей и биологических жидкостей ведется активный поиск диагностических маркеров, факторов прогноза метастазирования и рецидивирования, предикторов ответа на терапию. Однако даже при использовании современных технологий до сих пор нельзя уверенно прогнозировать метастатический потенциал и биологическое поведение опухоли. Анализ протеома и транскриптома позволит выявить значимые показатели для создания скрининговых систем и выявления больных с высоким риском метастазирования и рецидивирования, что будет способствовать оптимизации тактики лечения плоскоклеточного рака головы и шеи.

Ключевые слова: протеомика, транскриптомика, плоскоклеточные карциномы, метастазирование.*G.V. Kakurina, I.V. Kondakova, E.L. Choyznov***POSTGENOME TECHNOLOGIES IN PREDICTION OF SQUAMOUS CELL HEAD AND NECK CANCER METASTASIS***Cancer Research Institute, Siberian Branch of RAMS***Abstract**

Head and neck cancer is the 6-th most common cancer accounting for about 18–20 % of all malignancies. Most head and neck cancers are squamous cell carcinomas including laryngeal, oropharyngeal, nasopharyngeal and oral cancers. Numerous clinical data give evidence of the fact that distant and regional metastases are the leading causes of death in patients with squamous cell head and neck cancer. Currently available methods for early detection of metastases are not sufficiently effective and reliable. The modern development of postgenome technologies has resulted in creation of new techniques allowing to follow the changes occurring in cells during malignant transformation. The active search for diagnostic markers, prognostic factors for metastasis and recurrence and predictors of response to therapy is carried out using transcriptome and proteome analyses. Numerous studies have been conducted to facilitate the understanding the processes of tumor invasion and metastasis, however, the metastatic potential and biological behavior of tumors can not be surely predicted. The proteome and transcriptome analyses allow one to detect valuable criteria for development of screening schemes to define groups of patients being at high risk for cancer metastasis and recurrence.

Key words: proteomics, transcriptomics, squamous cell carcinomas, metastatic spread.**Введение**

Злокачественные опухоли головы и шеи, которые в общей структуре онкологической заболеваемости занимают шестое ранговое место и составляют в среднем 18–20 % от числа зарегистрированных, относятся к числу наиболее социально-значимых онкологических заболеваний [3; 4]. Ежегодно в мире регистрируется 540 000 новых случаев заболевания опухолями данной локализации и 271 000 летальных исходов [25; 46]. Основным морфологическим вариантом опухолей головы и шеи является плоскоклеточный рак, причем рак органов полости рта – 44 %, рак гортани – 31 %, карцином различных отделов полости рта – 25 % [2; 3]. Около

90 % больных являются людьми работоспособного возраста (30–60 лет), однако, несмотря на визуальную локализацию этих новообразований, 60–70 % пациентов поступают на лечение с местнораспространенным опухолевым процессом (III–IV стадии), что значительно снижает возможность благоприятного исхода лечения [1; 4]. Многочисленные клинические данные убедительно свидетельствуют о том, что главной непосредственной причиной гибели онкологических пациентов, в том числе больных опухолями головы и шеи, является отдаленное и регионарное метастазирование [2; 14; 15; 40], около 50 % лиц с опухолями данной локализации погибают на втором году постановки диагноза, у 5 % в течение года наблюдаются рецидивы [20].

Биологическое поведение ПКГШ и их чувствительность к терапевтическим воздействиям значительно варьируют – как в пределах выборки, так и в пределах одной локализации, что обусловлено большой гетерогенностью опухолей и высоким метастатическим потенциалом клеток [17; 18]. Проблема индивидуального подхода к лечению онкологических больных имеет огромное научное и практическое значение. В связи с этим важно прогнозировать течение конкретного онкологического процесса. В значительной мере неудовлетворительная точность прогнозирования обусловлена тем, что использование стандартных прогностических и предсказательных критериев далеко не всегда позволяет с высокой степенью вероятности оценить индивидуальный риск прогрессирования заболевания у больных и, следовательно, определить адекватный план персонифицированной терапии. Известно, что наличие метастазов в лимфатические узлы является практически единственным неблагоприятным независимым прогностическим критерием у больных ПКГШ [18; 20; 32; 55], поэтому поиск метастазов на диагностическом этапе является необходимым условием выбора тактики лечения больных. Однако имеющиеся на сегодняшний день методы обнаружения метастазов на ранних этапах прогрессии опухоли до их клинического проявления недостаточно эффективны и надежны. Большинство белковых маркеров и маркерных генов, идентифицированных на этапе фундаментальных исследований для диагностики ПКГШ, недоступны для прогноза течения заболевания.

В настоящее время в России и в мире для мониторинга пациентов со злокачественными опухолями головы и шеи рекомендован один тканеспецифичный онкомаркер – SCCA. Определение этого опухолевого маркера используется для диагностики и мониторинга плоскоклеточных карцином различных локализаций (в том числе – рака шейки матки) и отражает стадию, размер опухоли и степень их гистологической дифференцировки. Этот маркер не отвечает полностью требованиям современной онкологии ввиду низкой чувствительности и невозможности его использования для прогноза метастазов и рецидивов. В связи с этим поиск новых маркеров метастазирования и рецидивирования плоскоклеточных карцином, в том числе головы и шеи, весьма актуален.

Различные технологические подходы, используемые при поиске биомаркеров, не могут гарантировать полноценное использование кандидатных маркеров в клинической практике [57]. Поэтому в последнее время ведется активный поиск высокочувствительных и высокоспецифичных онкомаркеров, которые позволили бы прогнозировать биологическое поведение опухоли на ранних стадиях и предсказать с высокой степенью вероятности появление метастазов. В частности, показано, что папилломавирусная инфекция, матриксные металлопротеиназы, экспрессия E-кадхеринов и фактора роста сосудистого эндотелия в опухолевой ткани могут влиять на возникновение метастазов и прогноз течения заболевания у больных ПКГШ [7; 24; 31; 46; 66]. На наш взгляд, эти биомаркеры имеют определенное прогностическое значение. Современное развитие молекулярных технологий привело к созданию новых методологий, позволяющих комплексно оценивать изменения транскриптома и протеома, происходящие как при злокачественной трансформации клеток, так и при приобретении опухолевыми клетками новых биологических свойств, а именно способности к метастазированию.

Транскриптомный анализ потенциальных маркеров ПКГШ

Идентификация новых биомаркеров, понимание сложного процесса злокачественной трансформации клетки требует всестороннего описания экспрессии генома, которое может быть достигнуто только при использовании комбинации различных технологий. Анализ транскриптома (набора всех РНК, находящихся в исследуемом образце), определение качественного и количественного профиля всех РНК отражает уровень синтеза кодируемых ими белков, а также синтез рибосомальных, транспортных и других РНК. Сравнение транскриптомов нормальных и патологических образцов позволяет идентифицировать новые маркеры, проследить изменение уровней генной экспрессии во времени, судить о динамике развития патологии, об эффективности проводимого лечения и прогнозировать его результат [62]. Известно, что каждый патологический процесс характеризуется так называемым «штрих-кодом» или транскриптомным профилем – уникальным паттерном уровней транскрипции генов, характерных именно для данного заболевания. Для создания транскриптомного профиля используются современные методологические подходы: анализ кДНК на микрочипах (*cDNA microarray*), ПЦР в режиме реального времени, метод Нозерн-блоттинг, методы биоинформатики и т.д. [6; 38; 47; 48].

С помощью транскриптомного анализа тканей и биологических жидкостей ведется активный поиск диагностических маркеров, факторов прогноза метастазирования и рецидивирования, предикторов ответа на терапию. Проводятся исследования по поиску маркеров ранней диагностики опухолей головы и шеи.

Так, для поиска новых маркеров ранней диагностики рака ротовой полости было проведено исследование слюны больных ПК полости рта с помощью транскриптомного анализа *cDNA microarray*. Показано, что есть значительные различия в уровнях экспрессии 1 679 генов в группах больных и здоровых ($p < 0,05$). Были выделены мРНК – возможные биомаркеры, уровень которых в слюне больных с ПК полости рта был в 3,5 раза выше по сравнению с таковым в группе контроля ($p < 0,01$): IL8, IL1B, DUSP1, HA3, OAZ1, S100P, и SAT. В комбинации эти предполагаемые маркеры показали чувствительность и специфичность около 90 % при определении различий между здоровыми донорами и больными раком полости рта.

Авторы предлагают использование транскриптомного анализа слюны для ранней диагностики ПК полости рта [37]. Ранее с помощью *cDNA microarray* было отмечено различие в экспрессионном профиле по 128 генам между клеточными линиями нормальных и человеческих трансформированных кератиноцитов, включающих гены, связанные с пролиферацией, а также *IGFBP6*, *EGFR* и *VEGFC*; опухолевые супрессоры и гены, связанные с апоптозом – *Trp53*, *Trp63*; регуляторы клеточного цикла – *CCND1* и *CCND2* (циклины D1 и D2) [27]. На клеточных линиях Tu-138, Tu-167, Tu-177, Tu-159, Tu-404, Tu-409, MDA-1986 и NOE (нормальный клеточный эпителий полости рта) и тканях опухоли ПКГШ с помощью анализа *cDNA microarray* и относительного ПЦР в реальном времени были идентифицированы и подтверждены иммуногистохимическим анализом различия в экспрессии 9 генов злокачественной и доброкачественной опухоли слизистой оболочки той же локализации [21].

При сравнении профиля генной экспрессии в нормальных эпителиальных клетках и первичных раковых клетках ПКГШ с использованием *cDNA microarray* (12 530 человеческих генов) показаны существенные изменения в экспрессии 213 генов (91 ген с высокоуровневой регуляцией и 122 – с низкоуровневой). Список идентифицированных генов включает гены, кодирующие белки, связанные с трансдукцией сигнала (факторы роста), структурой клетки, регуляцией цикла клетки, транскрипции, апоптоза, адгезивными свойствами клеток. Дальнейший анализ с помощью Вестерн-блоттинга и *real time PCR* подтвердил результаты кДНК анализа для 9 генов, вовлеченных в межклеточное взаимодействие. Достоверно отмечено, что клаудин-7 и коннексин 31.1 имели низкоуровневую регуляцию в клетках ПКГШ по сравнению с нормальными клетками [42]. Экспрессионный анализ показал, что высокие уровни экспрессии мРНК PTTG (*proto-oncogene pituitary tumor-transforming gene*) в опухолевой ткани могут быть прогностическим маркером развития рецидивов у больных с ПКГШ, особенно на ранних стадиях развития опухоли [50].

Таким образом, в настоящее время определены основные подходы к ранней диагностике ПКГШ с использованием транскриптомных технологий. Однако молекулярные основы процесса метастазирования до конца не изучены. Метастатический фенотип раковой клетки достаточно трудно установить, используя традиционные подходы, в связи с большим числом факторов, вовлеченных в процесс метастазирования. До сих пор лечение метастатического рака остается в значительной степени эмпирическим и малоэффективным.

Большое количество работ посвящено изучению транскриптома метастазирующих опухолей других локализаций, что говорит о перспективности использования транскриптомного анализа для поиска маркеров метастазирования. Эксперименты, проведенные на клеточных линиях метастазирующего РМЖ MDA-MB-231, показали, что транскриптомный профиль содержит определенный набор генов, который коррелирует с общим метастатическим потенциалом, включающим такие характеристики как способность к миграции и инвазии опухолевых клеток [44]. Исследование транскриптома рака почки показало, что опухоли, обладающие высоким метастатическим потенциалом, имеют свой характерный профиль – так называемая "метастатическая подпись" [9; 28].

Использование транскриптомного анализа для сравнения карт генной экспрессии метастазирующих и не метастазирующих опухолей головы и шеи является многообещающим методом [19; 38]. Сравнение профилей экспрессии генов клеток не метастазирующей карциномы полости рта и метастазирующей в лимфоузлы шеи показало различия в экспрессии 160 генов (в том числе для трансглутаминазы-3 и кератина-16) [41]. Исследование экспрессионного профиля клеточных линий, полученных из первичных опухолей и метастатических лимфоузлов, выявило 28 генов с высокой экспрессией, среди них гены, ассоциированные с метастазированием, такие как рецептор ламинина, тимозин β -4 и β -10 и металлопептидаза [59]. Следует отметить, что работ посвященных использованию полномасштабных исследований транскриптома для поиска маркеров метастазирования ПКГШ, в литературе представлено мало. В основном литературные данные содержат анализ результатов ПЦР в режиме реального времени. С помощью этого метода были выявлены мРНК, канди-

датные маркеры метастазирования: SCCA1/2, PVA, TACSTD1 и PTNRP. Авторы считают, что это чрезвычайно надежные маркеры, каждый из которых или в комбинации может быть использован для прогноза метастазирования. Отмечено, что экспрессия SCCA2 была связана с агрессивным фенотипом плоскоклеточного рака в лимфатические узлы [29]. TACSTD1 также известный как EPCAM, по мнению авторов может быть использован для выявления микрометастазов в лимфатические узлы в различных опухолях, в том числе ПКГШ [56]. PVA, также известный как десмоглеин 3 (DSG-3), представляет собой гликопротеин массой 130-кДа, член подсемейства десмосомальных кадгеринов. По данным R.L. Ferris et al. [15] изменение экспрессии генов PVA и TACSTD1 явились наилучшими показателями для дифференциальной диагностики ПКГШ между интактными лимфоузлами и пораженными метастазами.

Отмечено, что PVA как кандидатный маркер имел 100% точность для прогноза метастазирования в шейные лимфатические узлы при ПКГШ [15]. Позже с помощью *real time PCR* была показана связь уровня экспрессии гена PVA с наличием метастазов в лимфоузлах у больных ПКГШ [54], однако авторы указывают на необходимость продолжения исследования на большей выборке.

При исследовании с помощью *cDNA microarray* анализа формалиновых и замороженных срезов тканей ПКГШ и интерпретации данных с помощью аналитического метода GSEA авторы получили набор из 75 генов для выявления риска рецидива. В списке предлагаемых объектов были гены, кодирующие белки, участвующие в ЕМТ, активации ядерного фактора NF- κ B и адгезии клетки. По мнению авторов, полученная панель с 75 генами может использоваться как набор маркеров предикторов рецидива данного заболевания [10; 11].

Таким образом, несмотря на активно проводимые исследования, до сих пор окончательно не установлены гены, определение уровня экспрессии которых могло быть использовано для создания тест-систем для прогнозирования развития метастазов, а также нет единогласного мнения об участии описываемых различными авторами генов в процессах метастазирования и рецидивирования. Крупномасштабный анализ генной экспрессии позволит идентифицировать высокочувствительные и специфичные молекулярные маркеры для ранней диагностики ПК, прогнозирования метастазирования, рецидивирования и чувствительности к противоопухолевой терапии. Нужно отметить, что, несмотря на достигнутые успехи в изучении экспрессионного профиля, характерно для клеток ПКГШ, полученные данные не дают полной информации о биологическом поведении опухоли [43; 51], так как экспрессия белков, их активность, пост-трансляционные модификации, в конечном счете, ответственны за агрессивное поведение опухоли этого типа. Поэтому выявление новых белковых маркеров метастазирования возможно с использованием протеомных исследований.

Использование протеомных технологий для поиска потенциальных маркеров метастазирования ПКГШ

С развитием новых высокоэффективных постгеномных технологий, в частности – протеомных, таких как двумерный гель электрофорез (2DE), масс-спектрометрия (MALDI-TOF-MS, SELDI и другие), ProteinChip, появилась возможность поиска маркеров заболевания с необходимыми характеристиками.

Использование протеомных технологий в онкологии позволяет при исследовании большой совокупности белков выявить характерные для опухолевого процесса белки, сравнить протеомный состав нормальных и злокачественных тканей, а также сыворотки крови здоровых и больных лиц для выявления потенциальных маркеров, позволяющих прогнозировать риск развития метастазов или рецидивов.

Для выяснения молекулярных механизмов канцерогенеза и идентификации потенциальных диагностических биомаркеров ПКГШ многими исследователями используется метод сравнения протеомного профиля нормальных клеток плоского эпителия и трансформированных клеточных линий. С помощью анализа MALDI-масс-спектрометрии протеомов клеточных линий нормальных кератиноцитов и ПК человека (HSC-2 и HSC-3) идентифицированы различия по 22 белкам: аннексин А1 [66], HPS27, ламин А/С, антагонист рецептора IL-1, ингибитор сериновых протеиназ clade B5, статмин 1, и SOD 2 и другие [30].

Работы, проведенные на клеточных линиях рака носоглотки, обозначили другие потенциальные маркеры для диагностики ПКГШ – фибронектин, Мас-2 BP, и PAI-1 [63]. При сравнительном анализе с помощью 2D-электрофореза, масс-спектрометрии, Вестерн-блоттинга тканей рака носоглотки, нормальной ткани и клеточных линий было идентифицировано 3 белка: статмин, белок 14-3-3σ и аннексин I, которые, по мнению авторов, могут быть потенциальными маркерами носоглоточного рака [12].

В тканях рака полости рта с помощью протеомного анализа была отмечена сверхэкспрессия нескольких белков: альфа В-кристаллин, тропомиозин 2, легкие цепи миозина 1, HSP27, стратифин, тиреодоксин-зависимая пероксидаза, виментин, глутатион-S-трансфераза Pi (GST-pi) и супероксиддисмутаза (MnSOD) по сравнению с тканью нормальной слизистой [39].

В субклеточных фракциях плоскоклеточной карциномы полости рта с помощью 2-DE и MALDI-TOF-MS показано изменение уровня экспрессии 20 белков, из них 14 (кофилин, предшественник СРБ, m-цепь креатинкиназы, кератин II типа, легкие цепи миозина и др.) могут, по мнению авторов, представлять интерес как потенциальные диагностические маркеры [58].

Большое число исследований по поиску маркеров заболевания проведено с использованием биологических жидкостей организма [22; 26; 34; 52; 60; 64]. Предполагается, что протеомный профиль биологических жидкостей здоровых доноров и онкологических больных должны различаться, что может являться полезным инструментом в поиске маркеров ранней диагностики опухолей. Анализ белковых спектров сыворотки крови (молекулярной массой до 100 kDa), взятой у больных ПКГШ и здоровых лиц, достоверно различался в группах с 82 %-ной чувствительностью и 76 %-ной специфичностью [23]. С помощью 2-DIGE/MALDI-TOF-MS сыворотки крови этих больных до и после лечения показано различие в экспрессии 16 белков [22]. С помощью технологий SELDI-TOF ProteinChip выявлено несколько белков (2778 – 20800 Da), которые обозначили разницу протеомов сыворотки крови у пациентов с ПКГШ и группы контроля. Пик со средней массой 10 068 Da [60] был идентифицирован как металлопанстимулин-1 (MPS-1). В этом же году другие авторы методами радиоиммунного анализа и Вестерн-блоттинга показали, что MPS-1 может быть маркером ранней диагностики ПКГШ и

ответа опухоли на лечение [5; 13; 16; 33; 49; 53]. Таким образом, поиск новых диагностических маркеров с помощью протеомного анализа позволяет существенно расширить возможности для раннего выявления рака [5; 13; 16; 49]. Однако для их внедрения необходимо провести ряд дополнительных исследований, которые окончательно подтвердят возможность клинического применения.

Работы, посвященные поиску белковых маркеров метастазирования ПКГШ, малочисленны. Процесс метастазирования зависит от многих факторов: способности клеток первичной опухоли к миграции, процесса деструкции межклеточных барьеров, неоангиогенеза, наличия лимфатических сосудов и фенотипических особенностей опухолевых клеток, которые включают пролиферацию, выживание, устойчивость к апоптотическим сигналам и способность к уклонению от иммунного надзора. Для описания молекулярных изменений при приобретении опухолевыми клетками метастатических свойств потребуется оценка многих белковых маркеров и использование различных методологий [7].

На клеточных линиях ПК полости рта (UM1/UM2, 1386Tu/1386Ln, 686Tu/686Ln) с различным метастатическим потенциалом с помощью 2D-PAGE/MS были идентифицированы 2 белка, SOD 2 и HPS27. Отмечено, что высокий уровень СОД2 коррелирует с метастазированием в лимфоузлы, что подтвердилось иммуногистохимическим окрашиванием [65]. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии плазмы крови больных с плоскоклеточными карциномами полости рта было выявлено 6 белков с молекулярными массами 2664 Da, 2850 Da, 3250 Da, 7735 Da, 7927 Da, и 9240 Da.

Белок с массой 2664 Da, идентифицированный как фрагмент α-цепи фибриногена, показал самую высокую чувствительность (100 %) и специфичность (97 %) в отношении определения метастазов [8].

У пациентов с назофарингеальной карциномой анализ кривых выживания показал, что при увеличении уровня экспрессии цитокератина 18 был плохой прогноз, обусловленный появлением метастазов (p=0,000). Эти данные позволили предположить, что цитокератин 18 является потенциальным маркером прогноза опухоли этой локализации [35].

Известно, что протеиназы и их ингибиторы играют существенную роль в процессах инвазии и метастазирования раковых клеток [24; 31; 61]. С помощью лазерной микродиссекции с последующей тандемной масс-спектрометрией было показано увеличение экспрессии белков семейства протеаз ADAMTS [14]. Эти протеазы участвуют в процессах деградация внеклеточного матрикса, клеточной адгезии, пролиферации и миграции, а также процессинге цитокинов и факторов роста, и изменение их экспрессии способствует прогрессии опухоли и неоангиогенезу. В умеренно-дифференцированных опухолевых клетках ПКГШ наряду с ADAMTS было обнаружено увеличение содержания катепсина D, экспрессия которого увеличивает рост и метастатический потенциал различных раковых клеток *in vivo* [36; 45].

Следует отметить, что меж- и внутрииндивидуальные вариации белкового состава сыворотки крови достаточно высоки, кроме того, концентрация потенциальных маркеров в крови на ранних стадиях неопластического процесса мала, и в основном детектироваться могут мажорные белки, что может крайне осложнить получение адекватных результатов. Анализ тканей является более трудоёмким, но найденный таким образом опухолевый маркер будет более надежным.

Таким образом, на настоящий момент в литературе достаточно широко представлены исследования, проводимые на клеточных линиях ПКГШ и с использованием биологических жидкостей пациента, что затрудняет экстраполяцию данных на клиническую ситуацию. В то же время недостаточно работ, посвященных исследованию сыворотки крови больных и тканевого материала, взятого у пациентов во время операции или путем биопсии.

В целом следует отметить, что поиск маркеров метастазирования ПКГШ методами протеомного анализа начал сравнительно недавно, поэтому картина изменения протеома при развитии метастазов остается малоизученной.

Заключение

На сегодняшний день проведено большое количество исследований и накоплено достаточно данных для понимания процессов инвазии и метастазирования.

Литература

1. Айдарбекова А. А., Любаев В. Л. К вопросу о регионарном метастазировании рака гортани, слизистой полости рта и гортаноглотки // Вестник Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина. – 2006. – № 2. – С. 9–16.
2. Любаев В.Л., Айдарбекова А.А. Эффективность хирургических вмешательств при лечении регионарных метастазов у больных раком слизистой оболочки полости рта и ротоглотки // Сибирский онкологический журнал. – 2006. – № 2 (18). – С. 11–5.
3. Пачес А.И. Опухоли головы и шеи. – М.: «Медицина», 2000. – 480 с.
4. Чойнзонов Е.Л., Балацкая Л.Н., Кицманюк З.Д. и др. Реабилитация больных опухолями головы и шеи. – Томск: Изд-во НТЛ, 2003. – 296 с.
5. Atsuta Y., Aoki N., Sato K. et al. Identification of metalloproteinase-1 as a member of a tumor associated antigen in patients with breast cancer // Cancer Lett. – 2002. – 182 (1). – P. 101–7.
6. Carles A., Millon R., Cromer A. et al. Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display // Oncogene. – 2006. – 25. – P. 821–31.
7. Cortesina G. and Martone T. Molecular metastases markers in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature // Acta Otorhinolaryngol Ital. – 2006. – 26(6). – P. 317–25.
8. Cheng A.-J., Chen L.-C., Chien K.-Y. et al. Oral cancer plasma tumor marker identified with bead-based affinity-fractionated proteomic technology // Clin. Chem. – 2005. – 51(12). – P. 2236–44.
9. Chen Y.T., Tu J.J., Kao J. et al. Messenger RNA expression ratios among four genes predict subtypes of renal cell carcinoma and distinguish oncocytoma from carcinoma // Clin Cancer Res. – 2005. – 11(18). – P. 6558–66.
10. Chung C.H., Parker J.S., Ely K. et al. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma // Cancer Research. – 2006. – 66. – P. 8210–8.
11. Chung C.H., Aulino J. et al. Nuclear factor-kappa B pathway and response in a phase II trial of bortezomib and docetaxel in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma // Annals of Oncology. – 2010. – 21(4). – P. 864–70.
12. Cheng A.L., Huang W.G., Chen Z.C. et al. Identification of novel nasopharyngeal carcinoma biomarkers by laser capture microdissection and proteomic analysis // Clinical Cancer Research. – 2008. – 14. – P. 435–45.
13. Dai Y., Pierson S.E., Dudney W.C., Stack B.C. Extraribosomal function of metalloproteinase-1: reducing paxillin in head and neck squamous cell carcinoma and inhibiting tumor growth // Jr. Int. J. Cancer. – 2010. – 126. – P. 611–9.
14. Demircan K., Gunduz E., Gunduz M. et al. Increased mRNA expression of ADAMTS metalloproteinases in metastatic foci of head and neck cancer // Head & Neck. – 2009. – 31(6). – P. 793–801.
15. Ferris R. L., Xi L., Raja S. et al. Molecular staging of cervical lymph nodes in squamous cell carcinoma of the head and neck // Cancer Research. – 2005. – 65. – P. 2147–56.
16. Fernandez-Pol J.A. Fernandez-Pol J.A. Metalloproteinase as a novel tumor marker in sera of patients with various types of common cancers: implications for prevention and therapy // Anticancer Res. – 1996. – 16(4B). – P. 2177–85.
17. Garavello W., Ciardo A., Spreafico R. et al. Risk Factors for Distant Metastases in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 2006. – 132. – P. 762–6.
18. Gendena E.M., Ferlito A., Bradley P.J. et al. Neck disease and distant metastases // Oral Oncology. – 2003. – 39. – P. 207–12.
19. Ginos M.A., Page G.P., Michalowicz B.S. et al. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck // Cancer Res. – 2004. – 64(1). – P. 55–63.
20. Grandis J.R., Pietenpol J.A., Greenberger J.S. et al. Head and Neck Cancer // Cancer Research. – 2004. – 64. – P. 8126–9.
21. Gonzalez H.E., Gujrati M., Frederick M. et al. Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma // Arch. Otolaryngol Head Neck Surg. – 2003. – 129(7). – P. 754–62.
22. Gourin C.G., Zhi W., Adam B.L. Proteomic identification of serum biomarkers for head and neck cancer surveillance. Laryngoscope // Laryngoscope. – 2009. – 119(7). – P. 1291–302.
23. Gourin C.G., Xia Z.S., Han Y. et al. Serum protein profile analysis in patients with head and neck squamous cell carcinoma // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 2006. – 132(4). – P. 390–7.
24. Görögh T., Beier U.H., Büumken J. et al. Metalloproteinases and their inhibitors: influence on... // Head Neck. – 2006. – 28(1). – P. 31–9.
25. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. // Eur Arch Otorhinolaryngol. – 2003. – 260(9). – P. 502–8.
26. Hu S., Yu T., Xie Y. et al. Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry // Cancer Genomics and Proteomics. – 2007. – 4(2). – P. 55–64.
27. Jeon G.A., Lee J.S., Patel V. et al. Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines // Int. J. Cancer. – 2004. – 112(2). – P. 249–58.

28. Jones J., Otu H., et al. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer//Clin Cancer Res. – 2005. – 11(16). – P. 5730–9.
29. Kano M., Shimada Y., Kaganoi J. et al. Detection of lymph node metastasis of oesophageal cancer by RT-nested PCR for SCC antigen gene mRNA // British Journal of Cancer. – 2000. – 82 – P. 429–35.
30. Koike H., Uzawa K., Nakashima D. et al. Identification of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma using a global proteomic approach // Int. J. Oncol. – 2005. – 27(1). – P. 59–67.
31. Kondakova I.V., Klisho E.V., Savenkova O.V. et al. Matrix metalloproteinase 2 and 9 as the factor of head and neck tumor metastasis // Biomed Khim. – 2008. – 54(5). – P. 555–60.
32. Kruse A.L.D. and Grötz K. W. Evaluation of metastases in the submandibular gland in head and neck malignancy // Head & Neck Oncology. – 2009. – 1. – P. 28–33.
33. Lee W.J., Keefer K., Hollenbeak C.S. et al. A new assay to screen for head and neck squamous cell carcinoma using the tumor marker metallopanstimulin (MPS) // Otolaryngol Head Neck Surg. – 2004. – 131. – P. 466–71.
34. Li S.-J., Peng M., Li H. et al. Sys-BodyFluid: a systematical database for human body fluid proteome research // Nucleic Acids Research. – 2009. – 37. – P. 907–12.
35. Li X.M., Huang W.G., Yi H. et al. Proteomic analysis to identify cytokeratin 18 as a novel biomarker of nasopharyngeal carcinoma // J Cancer Res Clin Oncol. – 2009. – 135(12). – P. 1763–75.
36. Liaudet-Coopman E., Beaujouis M., Derocq D. et al. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis // Cancer Lett. – 2006. – 237. – P. 167–79.
37. Li Y., John M.A.R., Zhou X. et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection//Clin. Cancer Res. – 2004. – 10. – P. 8442–50.
38. Lunde M.L., Warnakulasuriya S., Sand L. et al. Gene expression analysis by cDNA microarray in oral cancers from two Western populations // Anticancer Res. – 2010. – 30(4). – P. 1083–91.
39. Lo W.Y., Tsai M.H., Tsai Y. et al. Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis // Clin Chim Acta. – 2007. – 376(1–2). – P. 101–7.
40. Melle C., Ernst G., et al. Biomarker Discovery and Identification in Laser Microdissected Head and Neck Squamous Cell Carcinoma with ProteinChip® Technology, Two-dimensional Gel Electrophoresis, Tandem Mass Spectrometry, and Immunohistochemistry // Molecular&Cellular Proteomics. – 2003. – 32. – P. 443–52.
41. Méndez E., Fan W., Choi P. et al. Tumor-specific genetic expression profile of metastatic oral squamous cell carcinoma // Head Neck. – 2007. – 29(9). – P. 803–14.
42. Moustafa A.-E.A.I., Alaoui-Jamali M.A., Batist G. et al. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells // Oncogene. – 2002. – 21(17). – P. 2634–40.
43. Mlynarek A.M., Balys R.L., Su J. et al. A cell proteomic approach for the detection of secretable biomarkers of invasiveness in oral squamous cell carcinoma // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 2007. – 33(9). – P. 910–8.
44. Nagaraja G.M., Othman M., Fox B.P. et al. Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics // Oncogene. – 2006. – 25(16). – P. 2328–38.
45. Patel V., Hood B.L., Molinolo A.A. et al. Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression // Clinical Cancer Research. – 2008. – 14(4). – P. 1002–14.
46. Perez-Ordoez B., Beauchemin M., Jordan R.C.K. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck // J Clin Pathol. – 2006. – 59. – P. 445–53.
47. Sen S., Ateeq B., Sharma H. et al. Molecular profiling of genes in squamous cell lung carcinoma in Asian Indians // Life Sci. – 2008. – 82(13–14). – P. 772–9.
48. Silveira N.J.F., Varuzza L., Machado-Lima A. et al. Searching for molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) by statistical and bioinformatic analysis of larynx-derived SAGE libraries//BMC Medical Genomics. – 2008. – 1. – P. 56–73.
49. Scurry W.C., Stack B.C. Role of metalloproteins in the clinical management of head and neck squamous cell carcinoma // Head Neck. – 2007. – 29(12). – P. 1144–55.
50. Solbach C., Roller M., Eckerdt F. et al. Pituitary tumor-transforming gene expression is a prognostic marker for tumor recurrence in squamous cell carcinoma of the head and neck // BMC Cancer. – 2006. – 6. – P. 242–9.
51. Sudha R., Kawachi N., Du P. et al. Global proteomic analysis distinguishes biologic differences in head and neck squamous carcinoma // Laboratory Investigation. – 2007. – 87. – P. 755–66.
52. Sun G., Sun G., He H. et al. Proteomic Diagnosis Models from Serum for Early Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma // Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology. – 2009. – 37(3). – P. 125–9.
53. Stack B.C. Jr., Hollenbeak C.S., Lee C.M. et al. Metallopanstimulin as a marker for head and neck cancer // World J Surg Oncol. – 2004. – 2. – P. 45–53.
54. Solassol J., Burcia V., Costes V. et al. PempHigus vulgaris antigen mRNA quantification for the staging of sentinel lymph nodes in head and neck cancer // British Journal of Cancer. – 2010. – 102. – P. 181–7.
55. Rodrigo J.P., Suarez C., Ferlito A. et al. Potential Molecular Prognostic Markers for Lymph Node Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // Acta Oto-Laryngologica. – 2003. – 123(1). – P. 100–5.
56. Takes R.P., Baatenburg de J. R.J., Wiffels K. et al. Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer // J. Pathol. – 2001. – 194(3). – P. 298–302.
57. Thomas G.R., Nadiminti H. and Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma // International Journal of Experimental Pathology. – 2005. – 86(6). – P. 347–63.
58. Turhani D., Krapfenbauer K., Thurnher D. et al. Identification of differentially expressed, tumor-associated proteins in oral squamous cell carcinoma by proteomic analysis // Electrophoresis. – 2006. – 27(7). – P. 1417–23.
59. Vigneswaran N., Wu J., Sacks P. et al. Microarray gene expression profiling of cell lines from primary and metastatic tongue squamous cell carcinoma: Possible insights from emerging technology // J Oral Pathol Med. – 2005. – 34(2). – P. 77–86.
60. Wadsworth J.T., Somers K.D., Cazares L.H. et al. Serum protein profiles to identify head and neck cancer // Clinical Cancer Research. – 2004. – 10. – P. 1625–32.
61. Werner J.A., Rathcke I.O., Mandic R. The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck // Clin Exp Metastasis. – 2002. – 19(4). – P. 275–82.
62. William C.S., Timothy T.C., Ngan R. K.C. et al. ProteinChip Array Profiling for Identification of Disease- and Chemotherapy-Associated Biomarkers of Nasopharyngeal Carcinoma // Clinical Chemistry. – 2007. – 53. – P. 241–50.
63. Wu C.C., Chien K.Y., Tsang N.M. et al. Cancer cell-secreted proteomes as a basis for searching potential tumor markers: nasopharyngeal carcinoma as a model // Proteomics. – 2005. – 5(12). – P. 3173–82.
64. Xie H., Onsongo G., Popko J. et al. Proteomics analysis of cells in whole saliva from oral cancer patients via value-added three-dimensional peptide fractionation and tandem mass spectrometry // Molecular & Cellular Proteomics. – 2008. – 7. – P. 486–98.
65. Ye H., Wang A., Lee B.-S. et al. Proteomic Based Identification of Manganese Superoxide Dismutase 2 (SOD2) as a Metastasis Marker for Oral Squamous Cell Carcinoma // Cancer Genomics and Proteomics. – 2008. – 5(2). – P. 85–93.
66. Zhang L., Yang X., Zhong L.P. et al. Decreased expression of Annexin A1 correlates with pathologic differentiation grade in oral squamous cell carcinoma // J. Oral Pathol Med. – 2009. – 38(4). – P. 362–70.

УДК 615.277.3.015:546-022.53

*П.М. Бычковский, А.А. Кладиев, С.О. Соломевич, С.Ю. Щеголев***ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ:
СИНТЕЗ, СВОЙСТВА, БИМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ***Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск**ООО «Биотехнологическая компания ТНК», Москва**Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов***Контактная информация***Бычковский Павел Михайлович, канд. хим. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории лекарственных средств на основе модифицированных полисахаридов***Адрес:** 220030, Минск, ул. Ленинградская, 14; **тел.:** +375(17)209-55-86**e-mail:** bychkovsky@tut.by

Статья поступила 19.04.2011., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

В работе дан краткий обзор получения и стабилизации биомолекулами золотых наночастиц различной формы и размеров, сделан обзор биомедицинского применения препаратов на основе КЗ.

Ключевые слова: коллоидное золото, проспидин, сурфактанты, наносферы, наностержни,*P.M. Bychkovskiy, A.A. Kladiyev, S.O. Solomevich, S.Yu. Schegolev***GOLD NANOPARTICLES:
SYNTHESIS, PROPERTIES, BIOMEDICAL APPLICATIONS***The establishment of the Belarusian State University, "Research Institute of Physical and Chemical Problems", Minsk
LLC "TNK Biotechnology Company", Moscow**Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov***Summary**

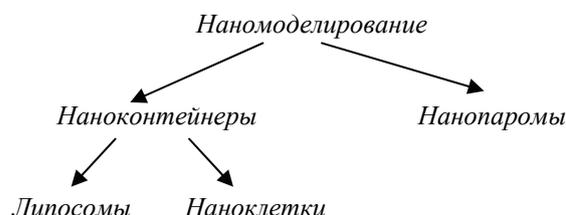
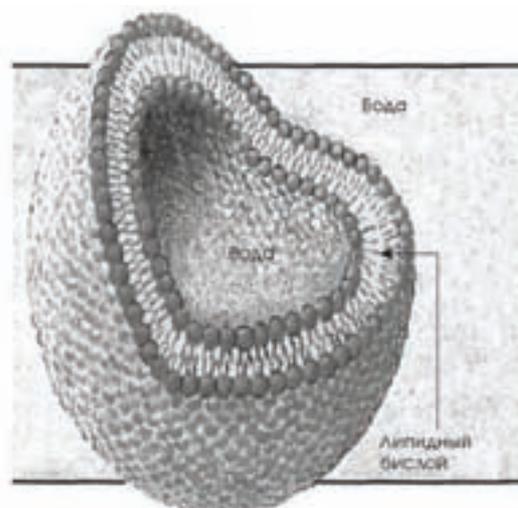
The paper presents an overview of obtaining and stabilizing biomolecules gold nanoparticles of different form or size, an overview of the biomedical applications of drugs based on fault.

Key words: colloidal gold, prospidinum, surfactants, nanospheres, drift-terzhni.**Введение**

Многочисленные опухоли остаются одними из самых коварных и непредсказуемых заболеваний. Для большинства из них до сих пор не предложено эффективных схем терапевтического воздействия. Типичные недостатки существующих методов лекарственной терапии опухолей – высокая стоимость препаратов, ограниченная эффективность, выраженные побочные эффекты. Положение усугубляется все более широким распространением мутантных штаммов опухолевых клеток, устойчивых к традиционным химиотерапевтическим средствам. Вместе с тем, колоссальные усилия ученых и врачей во всем мире привели к существенному прогрессу в выяснении механизмов развития опухолей, а также к выработке новых эффективных методов противодействия этим процессам.

Для того, чтобы увеличить терапевтический эффект препарата, необходимо разработать методы его целенаправленной доставки в пораженный орган. Перспективной представляется доставка лекарственного вещества с помощью биологически совместимых наночастиц (рис. 1). Так, инкапсулирование в «наноконтейнер» позволяет создавать инъекционные препараты пролонгированного действия, характерная особенность которых – накопление нанокапсул в зоне опухоли.

В качестве корпускулярных носителей для биологически активных веществ используются следующие структуры: фуллерены, липосомы (рис. 2), полиакрилатные частицы, мицеллы, КЗ и др.

**Рис. 1.** Наномоделирование.**Рис. 2.** Строение фосфолипидной липосомы.

Лекарственные препараты могут быть как инкапсулированы в наночастицы, так и сами приготовлены в виде наночастиц. Существует множество предложений, которые могут быть реализованы либо на основе неких свойств, присущих наночастицам изначально, либо посредством их соответствующей функционализации.

Поверхность наночастиц может быть модифицирована покрытиями, слоями или связками для обеспечения/улучшения их характеристик (таких как, например, биосовместимость, направляемость, способность распознавания формы и участие в биологическом взаимодействии).

Использование наночастиц в качестве своеобразных «нанопаромов» обещает многочисленные преимущества:

- «нерастворимые» препараты могут стать «растворимыми», если они доставляются «нанопаромами»;
- лекарства могут быть защищены от деградации во время переноса к месту назначения;
- наночастицы могут активно или пассивно накапливаться в органе-мишени и контролируемо высвобождать переносимые лекарства – как по дозе, так и по времени.

Увеличение отношения площади поверхности препаратов к объему при уменьшении их размеров может привести к увеличению их терапевтической активности, а поведение определенных типов наночастиц в магнитном поле и/или при повышении температуры среды вкуче с другими их специфическими свойствами открывает более широкий спектр терапевтических методик.

Нанотехнологии рассматриваются как общая платформа возможностей для направленной доставки препаратов, которая дает много преимуществ:

- создает новые способы доставки лекарств;
- служит основой индивидуальных методов лечения, делая их более эффективными;
- уменьшает эффективную дозу препарата и его токсичность.

Из всего многообразия наночастиц, используемых в медицине, отдельного внимания заслуживают золотые наночастицы как одни из наиболее перспективных носителей лекарственных веществ. Например, прикрепленную антителами к раковой клетке наночастицу можно нагреть до температуры выше 100 °С, уничтожив саму клетку. Также нагрев может заставить открыться капсулу с противораковым препаратом, который будет доставлен точно к месту назначения. Технология производства лекарственных препаратов с использованием КЗ недостаточно изучена, но, очевидно, не требует сверхзатрат или недоступного, «заоблачного» оборудования. Также следует отметить, что все зарегистрированные препараты КЗ производятся зарубежными фармацевтическими компаниями. В свете вышеизложенных фактов абсолютно целесообразным является изыскание возможностей разработки и внедрения в производство противоопухолевых препаратов на основе КЗ.

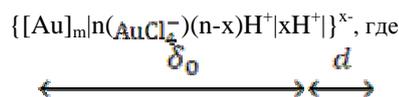
Состав золотых наночастиц

Научное исследование проблем получения и использования КЗ началось в середине XIX в. К этому моменту Томас Грэм и Энрико Сельми ввели в научную литературу термин «коллоидный раствор», описали свойства подобных растворов и их

отличия от истинных растворов. В 1857 г. вышла статья Майкла Фарадея [33], которая стала основополагающей научной работой, посвященной изучению способов синтеза и свойствам КЗ. В ней описана агрегация КЗ в присутствии электролитов, защитный эффект желатины и других высокомолекулярных соединений, свойства тонких пленок КЗ.

В конце XIX – начале XX веков результаты работ, посвященных изучению свойств КЗ, опубликовал Рихард Жигмонди [5]. Он впервые описал способы синтеза КЗ с различными размерами частиц при использовании в качестве восстановителей перекиси водорода, формалина, белого фосфора, а также при НЛ важнейшие физико-химические свойства золотых зольей. Зная, что частицы золота в коллоидном растворе заряжены отрицательно, он предположил: возникающее в результате взаимное отталкивание между этими одинаково заряженными частицами служит причиной устойчивости золя. При добавлении в коллоидный раствор соли, образующиеся катионы отчасти нейтрализуют суммарный заряд поверхности частиц, что способствует их агрегации и, в конечном итоге, осаждению коллоидной суспензии. В сотрудничестве с физиком-теоретиком Марианом Смолуховским Жигмонди рассчитал, на каком расстоянии должны находиться в коллоидном растворе частицы золота, чтобы происходила их агрегация.

Коллоидная частица золота состоит из кристаллического ядра $[Au]_m$, на поверхности которого адсорбированы ионы $AuCl_4^-$, определяющие отрицательный заряд коллоидной частицы золота. Ионы $AuCl_4^-$ составляют внутренний слой двойного ионного (электрического) слоя и определяют величину потенциала адсорбции. Ионы H^+ находятся в интермицеллярном растворе (одна часть располагается в адсорбционной области, а другая – в диффузной области двойного электрического слоя). Условно мицеллу КЗ можно представить следующим образом (рис. 3):



$[Au]_m$ – ядро мицеллы (m – число атомов золота, которое может меняться от нескольких сотен до миллионов);

n – количество адсорбированных ионов $AuCl_4^-$ ($n \ll m$);

δ_0 – толщина адсорбционного слоя;

d – толщина диффузной части двойного электрического слоя [88].

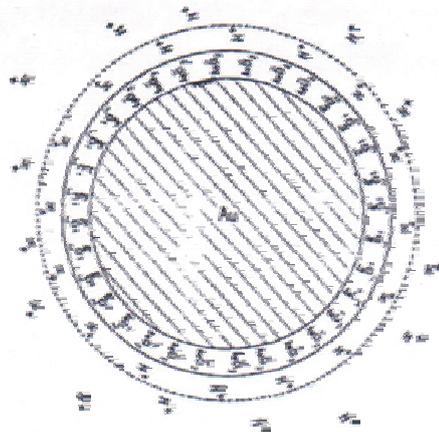


Рис. 3. Схематическое представление золотой коллоидной частицы.

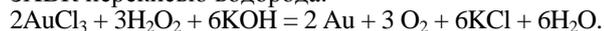
Высокая электронная плотность, способность рассеивать и излучать вторичные электроны, характерное поглощение и рассеяние в видимой области спектра электромагнитных излучений, интенсивная красная окраска золотосодержащего маркера позволяют легко обнаруживать частицы золота с помощью различных физико-химических методов (микроскопия, фотометрия, проточная цитометрия и др.). Возможность [49] получения золей золота с различными размерами частиц и их узким распределением обеспечивает высокое разрешение этих методов, а кроме того, позволяет вводить метку одновременно по двум и более антигенам (или иным лигандам). Размеры частиц КЗ после проведения соответствующей иммунохимической реакции можно увеличить с помощью реакции усиления солями серебра или золота (автометаллография), что существенно раздвигает границы применимости описанных методов [54].

Методы получения золотых наночастиц Обзор методик синтеза

Методы синтеза металлических коллоидов можно условно разделить на две большие группы в зависимости от способа получения. Это группа дисперсионных методов, основанных на диспергировании металлов, и конденсационных, где наночастицы восстановленного металла образуются из ионов соответствующих солей [61]. Первый способ приготовления КЗ основан на разрушении металлического золота под действием электрического тока высокого напряжения. Но применение постоянного тока приводит к получению золей, неоднородных по величине частиц золота, поэтому более распространён второй способ – синтез коллоидных частиц из галогенидов золота (например, золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК)) с использованием химических восстановителей и/или облучения (ультразвук, ультрафиолет или лазерный радиолит) [24].

В качестве восстановителей, применимых для синтеза золотых золей, известны около ста различных органических и неорганических соединений [2]. В 1951 г. для синтеза золей в качестве восстановителя был предложен цитрат натрия [86] (для получения КЗ со средним диаметром частиц 20 нм), в 1958 г. – аскорбиновая кислота [79] (12 нм), в 1963 – ЭДТА [32] (20 нм). С 1982 г. для получения частиц диаметром около 5 нм активно используют борогидрид натрия [21], цианоборогидрид [26].

Все перечисленные выше методы получения КЗ химическим восстановлением основаны на реакции конденсации из перенасыщенного раствора ЗХВК. Р. Жигмонди и Т. Сведберг [5; 10] изучили кинетику процесса восстановления и сформулировали основные представления о механизме формирования частиц золота на примере восстановления ЗХВК перекисью водорода:



В результате реакции образуется только один электролит, следовательно, за её ходом можно наблюдать кондуктометрически.

В интерпретации Р. Жигмонди и Т. Сведберга, кинетика изменения электропроводности отражает следующие процессы (рис. 4):

1. Вначале происходит восстановление около 30 % ЗХВК. При этом образуется высокоперенасыщенный раствор золота, что соответствует отрезку АБ на кинетической кривой электропроводности.
2. Затем восстановление резко замедляется, и происходит конденсация золота с обра-

зованием очень мелких частиц (зародышей новой фазы размерами порядка 2 нм) – отрезок БВ, после чего первоначально сформированные частицы становятся ядрами конденсации для дальнейшего восстановления ионов золота.

3. На третьем этапе (отрезок ВГ) процесс восстановления ускоряется, и по его завершении суспензия приобретает ярко-красную окраску.

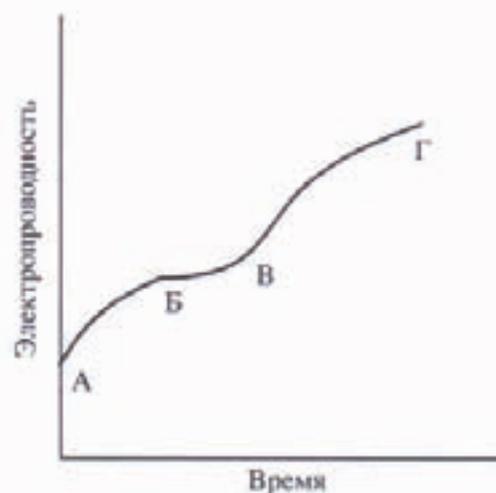


Рис. 4. Кинетическая кривая восстановления водорода в ЗХВК перекисью.

Исходя из конденсационного механизма формирования коллоидной фазы, можно выделить ряд управляющих параметров, определяющих степень дисперсности золотых суспензий закономерным и воспроизводимым образом. Очевидно, что скорость образования зародышей новой фазы зависит от степени пересыщенности раствора, т.е., главным образом, от концентрации реагирующих веществ и химической природы восстановителя.

При низкой скорости возникновения зародышей и достаточно высокой скорости конденсации частиц образуется относительно малое количество сравнительно крупных частиц. При более высокой скорости возникновения зародышей и сравнительно малой скорости конденсации частиц увеличивается вероятность образования большого количества частиц относительно малого размера. Однако увеличение концентрации восстановителя лимитируется агрегативной устойчивостью КЗ, достаточно высокие показатели которой достижимы лишь в средах с низкой ионной силой.

Наиболее широко распространенным методом получения золотых частиц с размерами 8–120 нм для медико-биологических приложений остается цитратное восстановление ЗХВК. Биологи при этом ссылаются на G. Frense [35], а материаловеды чаще упоминают работу J. Turkevich [86] по изучению процессов нуклеации и роста при синтезе КЗ.

Суть метода заключается в том, что к кипящему 0,01%-ному водному раствору ЗХВК добавляют 1%-ный водный раствор цитрата натрия в количестве, варьирующем в зависимости от требуемого размера частиц.

Методические подробности различных модификаций метода можно найти в статье [8]. В основном эти модификации заключаются в последовательности добавления реагентов, либо изменении их концентраций при сохранении соотношения.

Еще один вариант конденсационного метода предложен в работе D.V. Goia [39]. Суть его заключается в восстановлении концентрированного раствора ЗХВК изоаскорбиновой кислоты в присутствии защитного коллоида – гуммиарабика. В этих условиях кроме конденсационного реализуется агрегационный механизм восстановления, в результате чего образуется практически монодисперсная система сферических частиц ϕ 80 нм – 5 мкм в зависимости от кислотности среды и концентрации восстановителя.

Кроме того, для получения золотых наночастиц используют двухфазный метод. На первой стадии металлсодержащие реагенты переводят из водной фазы в органическую, к которой затем добавляют растворы ПАВ и восстановителя. Было обнаружено, что при этом процессе образуются практически монодисперсные золи [46]. Позже был разработан однофазный метод, согласно которому в металлосодержащий органический раствор одновременно добавляли ПАВ и восстановитель [42].

Гораздо менее популярны физические методы восстановления, основанные на использовании ультразвука, ультрафиолетового, инфракрасного или ионизирующего излучений, лазерного фотолиза [36; 56; 63] и электрохимические методы [55]. К достоинствам этих методов следует отнести отсутствие в образующихся золях (собственно на поверхности металлических частиц) примесных остатков химических соединений [4].

Новым направлением в нанобиотехнологии может стать использование для синтеза КЗ клеток растений, микроорганизмов и даже человека [18; 37].

Определение среднего диаметра

Контроль качества золотых зелей требует, прежде всего, оперативного определения среднего размера частиц. Традиционно для этого используют метод электронной микроскопии (ЭМ) [25]. Полученные микрофотографии обрабатываются по обычной процедуре, измеряя наибольший и наименьший размер частиц, определяя таким образом средний радиус сферы эквивалентного объема и среднее осевое соотношение. Для каждого образца КЗ обрабатывается не менее 300 изображений частиц.

Однако ЭМ-метод препаративно весьма сложен. Поэтому часто используется спектрофотометрический метод, основанный на известной зависимости максимума поглощения света металлическими золями от размера частиц [61; 87]. В работе [13] приведена калибровочная кривая, основанная на наилучшей гладкости полиномиальной аппроксимации спектрофотометрических и ЭМ данных, для определения размера сферических золотых частиц диаметром 5–50 нм, полученных цитратным методом Френса. Надежность этой калибровки подтверждена другими авторами в независимых экспериментах [27; 64; 73]. Для некоторых размеров частиц данные о максимуме поглощения образующихся зелей представлены в таблице.

Таблица
Максимумы поглощения для зелей с различными размерами частиц

Средний ϕ частиц	5	10	15	20	25	30	40
λ_{\max} , нм	513	516	519	522	524	526	536

Для определения размеров частиц применяется также метод ДРС [7; 20]. Свет слабо воздействует на исследуемый образец, метод применим в широ-

ком диапазоне размеров частиц и позволяет восстанавливать распределение золотых частиц по размерам [71]. Для измерения размеров частиц методом ДРС возможно использование установки [14], работающей в режиме записи аналогового сигнала.

Реже для характеристики частиц и конъюгатов используют дифференциальное центрифугирование, сканирующую и атомно-силовую микроскопию, малоугловое рентгеновское рассеяние, масс-спектрографию, рентгеновскую дифракцию и другие методы [24; 44; 62].

Синтез с участием высокомолекулярных восстановителей

Традиционные методы получения КЗ-маркеров заключаются в синтезе (восстановлении) восстановителем хлорауратов низкомолекулярными веществами) золотых наночастиц с последующей адсорбцией на них биополимеров.

Гораздо реже используют методы синтеза КЗ в присутствие синтетических или природных полимеров – ПЭГ, ПВП, поливинилацетата, полиамидомина, полигидроксибутирата, хитозана и других [31; 68; 72; 84; 91]. Частицы, сформированные таким образом, отличаются большей однородностью размеров и формы [52; 83]. При этом в качестве восстановителей используются борогидрид натрия [85], спирты и эфиры [45], гидразин [78], ультрафиолетовое излучение [30]. Восстановление борогидридом натрия авторы проводили в присутствие полимера, который ковалентно присоединялся к золотым частицам [65].

Siiman O. et al. [77] впервые предложили использовать высокомолекулярное вещество одновременно в качестве восстановителя и стабилизатора. При этом получаемые частицы золота оказывались покрытыми защитным слоем полимера – аминодекстрана, что способствовало более длительному хранению золотых зелей. Затем биоспецифические макромолекулы «пришивали» к покрытым аминодекстраном частицам золота с помощью бифункциональных реагентов (в частности, глутарового альдегида). По наблюдению авторов, в ходе восстановления ЗХВК аминодекстранами реакционная смесь сначала приобретала бледно-розовую окраску, которая затем становилась ярко-красной (т.е. не наблюдалось посинения раствора, соответствующего обратимой агрегации мелких частиц). Следовательно, механизм формирования золя золота отличался от предложенного Р. Жигмонди и Т. Сведбергом. Возможно, это связано с тем, что на начальных этапах происходит адсорбция ионов золота на полимерных цепях с их последующим восстановлением на функциональных группах полимера (например, альдегидных и гидроксильных). Агрегации частиц золота не происходит, очевидно, из-за стабилизирующего действия полимера.

Получение золотых наностержней

Все описанные выше способы получения зелей коллоидных металлов предполагают получение коллоидных систем с частицами преимущественно сферической формы.

Образование сфероидальных и цилиндрических частиц в изотропной среде – редкое явление, которое может быть, например, связано со спонтанной агрегацией электростатически стабилизированных почти сферических частиц. Чтобы целенаправленно получить несферические коллоидные металлические наночастицы, необходимо создать искусственно анизотропные условия роста.

Для создания таких условий были предложены методы синтеза золей металлов в пористых материалах (жестких матрицах), таких как оксиды кремния или алюминия [22; 90]. Восстановление золота из хлораурата в этих методах осуществляется электрохимическим или сонохимическим способом в присутствии детергентов.

Другим вариантом получения НСт является восстановление на так называемых мягких матрицах, представляющих собой мицеллярный раствор ПАВ. Известно [9; 11], что в определенных условиях водные растворы ионных ПАВ способны образовывать мицеллы различного вида (сферические, цилиндрические и пластинчатые). Чаще всего в качестве ПАВ, применяемого в методах мягких матриц, используется широко распространенный в биохимии и микробиологии ионный детергент ЦТАБ [3].

Процедура получения золотых НСт по всей видимости не может быть одношаговой и протекает по механизму роста, опосредованного частицами золота. В качестве частиц используют ультрадисперсные золи золота (средний размер около 3 нм), полученные восстановлением ЗХВК борогидридом натрия в присутствии цитрата натрия либо ЦТАБ. Следующий этап заключается в объединении ростового раствора (ЗХВК, аскорбиновая кислота, ЦТАБ) и суспензии зародышей. При этом раствор сначала обесцвечивается, что, по мнению авторов [50], свидетельствует о восстановлении Au^{3+} или $AuCl^-$ до ионов Au^- аскорбиновой кислотой. После внесения частиц раствор постепенно приобретает синюю, фиолетовую или красно-бурую окраску в зависимости от осевого отношения образующихся наночастиц.

Получение золотых наноболочек

Сферические золотые НО представляют собой тонкий (десятки нм) слой золота на диэлектрическом ядре диаметром 100 нм. По своим физико-химическим свойствам они занимают промежуточное положение между НСт и НСф. Оптические свойства таких частиц могут быть настроены путем варьирования диаметра ядер и толщины оболочек. Благодаря тому, что в технологии приготовления НО не применяются ПАВ, процедуры функционализации НО существенно проще чем для НСт.

Золотые НО обладают поглощением света типично в красной и ближней инфракрасной области спектра, а также очень высоким светорассеянием. Эти свойства делают их весьма перспективными в качестве диагностических и терапевтических инструментов в медико-биологических исследованиях [16].

Способ получения наноболочек, предложенный S.J. Oldenburg et al. [66], состоит из 4 основных этапов, схематически представленных на рис. 5.

- 1) сначала получают сферические силикатные ядра,
- 2) затем их поверхность функционализируют аминными группами,
- 3) на этих группах адсорбируются золотые частицы,
- 4) которые являются центрами конденсации, при дальнейшем восстановлении золота.

Детальное описание протоколов синтеза золотых НО и особенностей различных этапов можно в работах различных авторов [15; 69]. На первом этапе осуществляется синтез наночастиц SiO_2 путем гидролиза и последующей конденсации ТЭОС в среде этанола в присутствии аммиака (W. Stöber [82]). Оптический метод одновременного определения размера и концентрации силикатных наночастиц описан в работе B.N. Khlebtsov et al. [51].

Реакция восстановления двуокиси кремния в данном случае имеет вид:

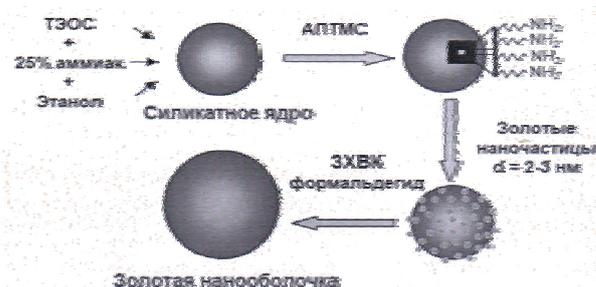
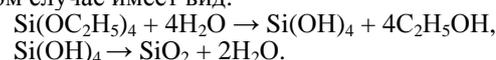


Рис. 5. Схематическое изображение протокола синтеза наноболочек.

При смешении реагентов происходит быстрый гидролиз ортосиликата, при котором этокси-группы ТЭОС замещаются на гидроксигруппы. Далее происходит разложение SiO_2 с образованием двуокиси кремния с конденсацией в коллоидную фазу. Из схемы реакции видна определяющая роль воды в процессе синтеза, поэтому, для получения воспроизводимых технологий получения наночастиц оксида кремния, необходимо использовать только абсолютный (99,99 %-ный) этанол и водный раствор аммиака с наибольшей концентрацией [41].

Стабилизация золотых наночастиц Электростатическая стабилизация золотых мицелл

Гидрозоли металлов – типичные гидрофобные коллоиды, существующие в агрегативно устойчивом состоянии лишь в условиях крайне низкой ионной силы дисперсионной среды. Такие золи называют электростатически стабилизированными, подчеркивая ведущую роль электростатической составляющей в обеспечении агрегативной устойчивости. Очевидно, что структура ДЭС металлической частицы зависит от способа получения коллоида (дисперсионный/конденсационный) и состава инкубационной среды. Очень часто КЗ, применяемое в биоаналитических целях, называют цитратстабилизированным. Это связано с тем, что метод, основанный на цитратном восстановлении хлораурата, остается наиболее удобным и широко используемым. Однако цитратная стабилизация является лишь частным случаем, и соответствующий термин следует употреблять с названными оговорками. В общем случае коионный слой металлической частицы представляет собой слой галогенидов (нитратов) металла или, в зависимости от рН среды, их гидроксидов. В случае восстановления солей металлов комплексообразующими соединениями (цитрат, аскорбат, ЭДТА) в состав ДЭС будут входить соответствующие комплексные ионы. Некоторые анионы из раствора могут замещать соответствующие компоненты коионного слоя.

Процесс образования золотых частиц схематично показан на рис. 3.

- 1) На первом этапе образуются комплексные соединения $[Au(III)-Cit]_x$, из которых в последующем формируются золотые мицеллы.
- 2) Поверхность золотых частиц легирована $Au(I)$ с цитрат-ионами в коионном слое [81].

- 3) Электрокинетический потенциал золотых НЧ сохраняется примерно одинаковым для частиц различных размеров и составляет ~ -50 мВ [76].

На рис. 6 и 7 показаны различные представления о строении золотой мицеллы [58].

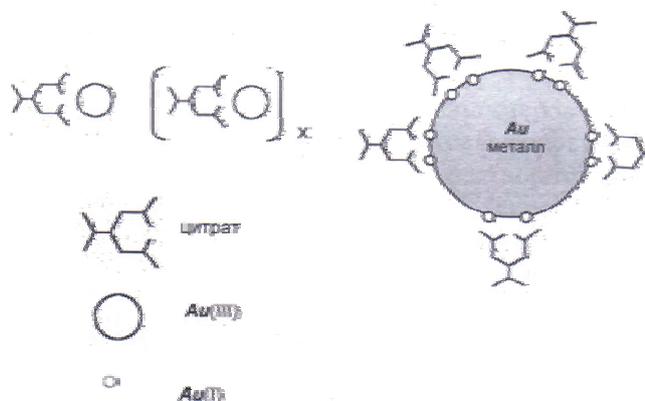


Рис. 6. Механизм формирования частиц КЗ.

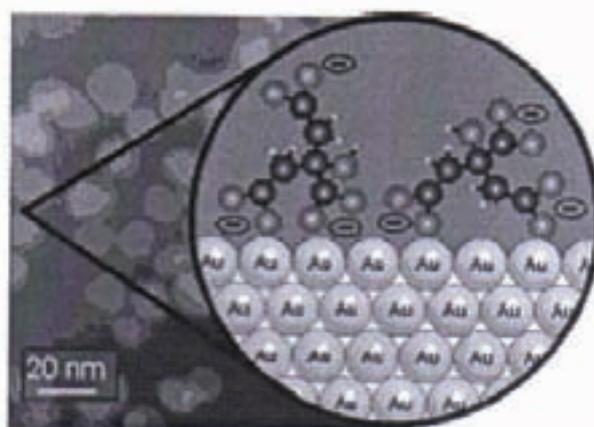


Рис. 7. Структура поверхности наночастицы КЗ.

Общие принципы конъюгации наночастиц с биомолекулами

Под устойчивостью дисперсных систем понимают постоянство их свойств во времени. В первую очередь, степени дисперсности, распределения частиц по объему системы и межчастичного взаимодействия. Наиболее характерный и общий для дисперсных систем тип изменения степени дисперсности связан с коагуляцией, заключающейся в слипании частиц [12]. Движущей силой коагуляции является избыточная поверхностная энергия. Поэтому основными факторами, обеспечивающими устойчивость дисперсных систем (при сохранении площади поверхности), будут те, которые снижают поверхностное натяжение. Их относят к термодинамическим факторам, уменьшающим вероятность результативных соударений между частицами, создающим потенциальные барьеры, замедляющим или практически исключаящим процесс коагуляции. Кинетические факторы, снижающие скорость коагуляции, связаны в основном с гидродинамическими свойствами среды: замедлением сближения частиц, вытеканием прослоек среды между ними.

Для лиофобных систем можно пренебречь адсорбционно-сольватным фактором устойчивости и учитывать только электростатическую составляющую

расклинивающего давления (отталкивание) и его молекулярную составляющую (притяжение). Для водных дисперсных систем расклинивающее давление представляет собой разность гидростатических давлений между двумя межфазными поверхностями (при перекрывании их поверхностных слоев) и окружающей их фазой. Теория Дерягина–Ландау–Фервея–Овербека (ДЛФО) при выводе молекулярной составляющей учитывает наиболее универсальные и существенные лондоновские силы дисперсионного взаимодействия, определяемые суммированием взаимодействий между всеми молекулами или атомами в обеих частицах. В соответствии с теорией ДЛФО, положительная энергия отталкивания с увеличением расстояния уменьшается по экспоненциальному закону, а отрицательная энергия притяжения обратно пропорциональна квадрату расстояния. Таким образом, на малых (непосредственное слипание частиц) и больших (через прослойку среды) расстояниях между частицами преобладают силы притяжения. На средних расстояниях преобладает электростатическое отталкивание (потенциальный барьер препятствует слипанию частиц).

Для зольей золота, как однокомпонентных по дисперсной фазе систем, при малых концентрациях электролита электростатические силы отталкивания преобладают над молекулярными силами притяжения, кроме области малых расстояний. Скорость коагуляции в такой системе определяется вероятностью столкновения частиц, имеющих кинетическую энергию большую, чем энергия потенциального барьера. По теории ДЛФО добавка электролита в дисперсную систему вызывает сжатие двойного электрического слоя на поверхности частиц и снижение потенциального барьера между частицами, что делает возможным их сближение на расстояние, на котором начинают преобладать силы притяжения [23].

Наименьшая концентрация электролита, вызывающая начало медленной коагуляции, называется порогом коагуляции. Для быстрой коагуляции нужно добавить столько электролита к дисперсной системе, чтобы дальнейшее увеличение количества электролита не изменяло скорость коагуляции. Это условие отвечает критическому потенциалу двойного электрического слоя, а не его изоэлектрической точке.

Устойчивость золь можно повысить путем покрытия частиц полимерным слоем (конъюгация с полимером) [38]. Добавка очень малого количества полимера (особенно полиэлектролитов) к лиофобным коллоидам способна сильно повысить их агрегативную устойчивость, то есть стабилизировать лиофобные коллоиды.

Защитный полимер способствует увеличению межфазного взаимодействия, адсорбируясь на поверхности частиц, покрывая ее полностью с образованием адсорбционного слоя и уменьшая поверхностное натяжение, а также способствуя образованию сольватного слоя.

В итоге поверхность частиц приобретает свойства вещества-стабилизатора (лиофилизироваться), и лиофобный золь становится гораздо менее чувствительным к коагуляции электролитами (благодаря электростатическим, гидрофобным взаимодействиям и структурно-механическому фактору устойчивости).

Эффективность стабилизации зависит от растворимости добавляемого защитного полимера в дисперсионной среде, способности лиофобных частиц его адсорбировать на своей поверхности и степени заполнения этой поверхности стабилизатором.

Наличие поверхностного адсорбированного полимерного слоя может свести к минимуму влияние межфазного натяжения благодаря обеспечению достаточного взаимодействия дисперсной фазы с дисперсионной средой. В результате значительно увеличивается энтропийная составляющая за счет участия молекул и ионов поверхностного слоя в тепловом движении вместе с частицами дисперсной фазы, обеспечивая тем самым агрегативную устойчивость систем. Избыток стабилизатора может привести к формированию второго слоя из его молекул, ориентированных противоположным образом, что снижает устойчивость системы. Недостаточное количество добавленного полимера также может снизить устойчивость системы, так как одна макромолекула может сорбироваться несколькими частицами, что инициирует их флокуляцию.

Для защитного действия важен, помимо молекулярной массы полимера, заряд его функциональных групп. Полимеры, содержащие как кислотные, так и основные группы, то есть полиамфолиты или слабоосновные поликатионные макромолекулы с рН-зависимым защитным действием, являются наиболее эффективным средством стабилизации гидрозолей золота [57].

Количественное определение защитного действия полимеров на лиофобные коллоиды (в частности, на гидрозоли золота) было впервые предложено Р. Жигмонди [5]. Данный метод и сейчас наиболее часто используется при проведении исследований в этой области. Жигмонди определял минимальное защитное количество гидрофильного полимера, достаточное для предотвращения коагуляции 10 мл золя золота при добавлении к нему 1 мл 10 %-ного раствора NaCl. Это количество лиофильного полимера, выраженное в миллиграммах, получило название «золотого числа». Золотое число является общей мерой защитного действия, поскольку эмпирически найдено, что сильное защитное действие, предотвращающее коагуляцию золя золота, обычно проявляется в такой же степени и в отношении других подобных ему золей.

Среди способов «посадки» биоспецифических зондов на КЗ метки выделяют два основных: адсорбционный и хемосорбционный. Каждый имеет свои особенности в плане приготовления и использования маркеров. Согласно общепринятому мнению, стабилизация золотых коллоидов узнающими биомолекулами (функционализация) происходит путем пассивной адсорбции полимера на поверхности частицы за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий [25]. Сообщается также [60] о кулоновском взаимодействии между H_2N -группами лизина с цитрат-ионами на поверхности золотых наночастиц, полученных методом Френса. В последнее время появились данные о важной роли в осуществлении процессов связывания белков с поверхностью золотых частиц SH-групп молекул цистеина [74].

К преимуществам простой (физической) адсорбции относят минимальное воздействие на структуру макромолекулы, и как следствие – сохранение ее функциональных свойств. Однако при использовании этого способа всегда следует учитывать возможную десорбцию и конкурирование с местами связывания на молекулах-мишенях. Основной особенностью адсорбции полимеров является то, что высокомолекулярные вещества обычно адсорбируются в количествах, много превосходящих необходимые для образования мономолекулярного слоя. При этом в случае разбавленных рас-

творов полимеров на изотермах адсорбции не наблюдается перегибов, которые свидетельствовали бы о формировании дискретного монослоя, как это наблюдается для низкомолекулярных ПАВ. Адсорбция индивидуальных молекул высокомолекулярных веществ в большинстве случаев носит необратимый характер. Это обусловлено относительно большим числом контактов макромолекул с поверхностью, когда одновременный разрыв всех связанных с ней звеньев является статистически маловероятным [1].

Известно, что между атомами серы и золота возникает семиполярная донорно-акцепторная связь [28]. Этот факт привел исследователей к идее для более прочной посадки биомолекул на золотые частицы использовать алкантиольные линкеры (хемосорбционный способ).

Однако до сих пор самым популярным способом получения золотых маркеров для иммунохимических исследований следует признать нековалентную (адсорбционную) конъюгацию, сохраняющую в наибольшей степени нативную структуру биомолекул и, как следствие, их функциональные качества.

Биомедицинское применение Коллоидное золото

как носитель противоопухолевых препаратов

В последние годы наночастицы КЗ, серебра и их композиты широко используются для преобразования биоспецифических взаимодействий. В частности, резонансные оптические свойства нанометровых металлических частиц успешно применяются для разработки биочипов и биосенсоров, представляющих большой интерес для биологии, медицины и химии.

Частицы золота применяются для изучения транспорта веществ в клетку путем эндоцитоза [17], для доставки генетического материала в клеточное ядро методом баллистической трансфекции [6].

Новая эра в использовании КЗ в биологии и медицине открылась работой [34], в которой конъюгат КЗ с иммуноглобулинами впервые был применен в качестве иммунохимического маркера. В 1973 г. опубликована работа [35], посвященная методам синтеза КЗ с определенным заранее заданным размером частиц. С этого момента началось активнейшее использование биоспецифических маркеров – конъюгатов КЗ в различных областях биологии. С тех пор вышло огромное количество работ, посвященных применению КЗ и его конъюгатов в исследованиях биохимиков, физиологов растений, микробиологов, иммунологов, цитологов и др. специалистов. Кроме традиционной области применения – просвечивающей ТЭМ, КЗ стало широко применяться в методах сканирующей электронной микроскопии, световой микроскопии, твердофазном анализе, анализе на частицах золя, проточной цитометрии, количественном анализе белков и др.

Вместе с тем, давно известно влияние солей золота на иммунную систему [19]. На свойстве золота изменять неспецифические иммунные реакции организма основаны способы лечения ряда аутоиммунных заболеваний, в частности ревматоидного артрита. Наряду с этим в некоторых работах [80] сообщается об успешной терапии КЗ. Эффект [40] КЗ в этом случае заключается в ингибировании моноцит-индуцированной пролиферации лимфоцитов. В работе [59] обсуждается превращение золота (0) в золото(I) в клетках иммунной системы под воздействием некоторых аминокислот.

В конце 2005 г. вышла статья [75] по результатам изучения воздействия на клетки иммунной системы золотых наночастиц. При использовании атомно-адсорбционной и сканирующей микроскопии исследователи обнаруживали золотые наночастицы в лизосомах и перинуклеарном пространстве клеток. В результате проведенных исследований сделан вывод о том, что частицы КЗ являются нецитотоксичным, неиммуногенным и биосовместимым материалом для потенциального использования в различных областях наноиммунологии, наномедицины и нанобиотехнологии, что противоречит данным работы [29], посвященной токсикологии золота.

Кроме того, в последнее время появилось много работ [43; 48; 89], в которых рассматриваются вопросы использования золотых наночастиц для адресной доставки лекарств. В связи с этим необходимо подчеркнуть возможность выработки в организме животного и человека антител на вводимое лекарственное вещество, адсорбированное на частицах КЗ.

После открытия радиоактивных изотопов золота его роль в медицине заметно возросла. Коллоидные растворы изотопа золота ^{198}Au (период полураспада 65 ч) успешно использовались в терапевтических целях в онкологической практике [70]. Создан специальный «радиоактивный пистолет», в обойме которого 15 стерженьков из радиоактивного золота с периодом полураспада в 2,7 суток. Практика показала, что лечение «радиоактивными иглами» дает возможность ликвидировать поверхность расположенную опухоль молочной железы уже на 25 день.

В самое последнее время нерадиоактивное КЗ широко используют для диагностики и лечения раковых заболеваний. В частности, в работе [67] описывается использование коллоидно-золотого вектора для доставки TNF к солидным опухолям у мышей. При внутривенной инъекции, конъюгат КЗ- TNF быстро накапливается в клетках опухолей и не обнаруживается в клетках печени, селезенки и других здоровых органах животных. Накопление КЗ в опухоли доказывается регистрируемым изменением цвета опухоли, поскольку она приобретает яркий красно-фиолетовый цвет (характерный для КЗ и его агрегатов), что совпадает с максимумом опухоль-специфической активности TNF. Вектор КЗ-TNF был менее токсичен и более эффективен в редуцировании опухоли, чем нативный TNF, так как максимальная антиопухолевая реакция достигалась при более низких дозах лекарства.

Изучение свойств золотых наночастиц позволило управлять ими и пришивать к различным биомолекулам, в частности антителам. Известно, что эти частицы отлично нагреваются инфракрасным светом подходящей частоты: это происходит из-за плазмонного резонанса. Частота резонансных колебаний электронов связана с размером наночастицы, и именно у золотых наностержней она может возбуждаться ИК-светом. При этом волны такой длины достаточно свободно проходят сквозь тело человека. Небольшие опухоли трудно определить обычными методами лучевой диагностики. Однако это возможно, если ввести в организм препарат из золотых наночастиц с сорбированными антителами к раковым клеткам. Антитела прочно прикрепляют частицу к мишени, а под импульсами ИК-лазера наночастицы нагреваются и расширяются. Процесс сопровождается появлением ультразвука, который можно легко зафиксировать, т.е. раковую опухоль заставят «звучать» под лазерным лучом. Также этим аспектом использования золо-

тых частиц занимались американские исследователи из технологического института Джорджии и университета Калифорнии под руководством профессора Mostafa El-Sayed. Разработан новый метод простой и надежной диагностики и терапии онкологических заболеваний, с помощью которого можно «картографировать» опухоль с точностью до нескольких клеток [47]. В работе [53] для диагностики и терапии рака предложено использовать золотые наноболочки.

Учёные изучают и другие возможности применения золотых наночастиц. Например, прикрепленную антителами к раковой клетке частицу можно нагреть до температуры выше 100 °С, уничтожив саму клетку, также нагрев может заставить открыться капсулу с противораковым препаратом, который будет доставлен точно к месту назначения.

Заключение

Морфометрические и физико-химические параметры наночастиц благородных металлов, образующихся в процессе нуклеации и роста по механизму химической конденсации, сложным образом зависят от большого количества трудно контролируемых, порой переменных параметров. Сложность управляемого синтеза наночастиц с заданными свойствами связана с влиянием размеров, форм и структуры металлических НЧ и их агрегатов на оптические свойства образуемых ими систем. Состав же поверхностного слоя обуславливает специфику взаимодействия с биомакромолекулами.

Анализ экспериментальных данных относительно механизмов формирования зольей коллоидных благородных металлов, основанных на химическом восстановлении соответствующих солей, позволяет выявить ряд параметров, влияющих на систему закономерным и воспроизводимым образом:

- основным параметром, управляющим дисперсностью образующихся зольей является соотношение окислитель/восстановитель;
- изодисперсность образующихся зольей обусловлена обратимостью процессов нуклеации и роста частиц;
- поверхность металлических наночастиц гидрозоль включает в состав коионного слоя лиганды восстановителя и анионы исходной соли;
- для получения золотых НСф в диапазоне 10-40 нм наиболее подходящим является метод Френса (цитратного восстановления ЗХВК). Для получения изоморфных и изодисперсных зольей с размерами частиц более 40 нм целесообразно использовать методики зародышевого роста;
- формирование несферических стержневых наночастиц происходит в условиях фазовой анизотропии среды, обеспеченной наличием жестких или мягких матриц.

Гидрозоли металлов – это типичные гидрофобные коллоиды, существующие в агрегативно устойчивом состоянии лишь в условиях крайне низкой ионной силы дисперсионной среды. Такие золи называют электростатически стабилизированными. Устойчивость золя можно повысить путем покрытия частиц полимерным слоем. Добавка даже очень малого количества полимера к лиофобным коллоидам способна сильно повысить их агрегативную устойчивость, то есть стабилизировать лиофобные коллоиды.

Эффективность стабилизации зависит от растворимости добавляемого защитного полимера в дисперсионной среде, способности лиофобных частиц его адсорбировать на своей поверхности и степени заполнения этой поверхности стабилизатором.

Наночастицы КЗ представляют большой интерес для биологии (определение нуклеиновых кислот,

белков и метаболитов), медицины (терапия опухолей, ревматоидного артрита, адресная доставка лекарств), химии (мониторинг объектов окружающей среды, количественный анализ растворов и дисперсных систем) и других областей науки (иммунологии, биологии клетки, генетики, геомикробиологии, геобиохимии).

Литература

1. Баран А.А. Полимерсодержащие дисперсные системы. – Киев: Наук. Думка, 1986. – 204 с.
2. Бусев А.И., Иванов В.М. Аналитическая химия золота. – М.: Наука, 1973. – 264 с.
3. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. Пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
4. Еришов Б.Г. Наночастицы металлов в водных растворах: электронные, оптические и каталитические свойства // Рос. хим. журн. – 2001. – 45. – С. 20–30.
5. Жигмонди Р. Коллоидная химия. – Харьков; Киев: НКСнаб УССР, 1933. – 256 с.
6. Зеленин А.В. Генная терапия на границе третьего тысячелетия // Вест. РАН. – 2001. – 71. – С. 387–95.
7. Клюбин В.В., Круглова Л.А., Сахарова Н.А., Таллиер Ю.А. Измерение дисперсного состава латексов с помощью метода динамического рассеяния света // Коллоид. журн. – 1990. – 52. – С. 470–7.
8. Маракушев С.А. Геомикробиология и биохимия золота. – М.: Наука, 1991.
9. Русанов И.А. Мицеллообразование в растворах поверхностно-активных веществ. – СПб.: Химия, 1990. – 280 с.
10. Сведберг Т. Образование коллоидов. – Л.: Науч. хим.-техн. изд-во, 1927. – 111 с.
11. Сонин А.С. Лиотропные нематик // Успехи физических наук. – 1987. – 153. – С. 273–310.
12. Фролов Ю.Г. Курс коллоидной химии: Поверхностные явления и дисперсионные системы. – М.: Химия, 1989. – 464 с.
13. Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Мельников А.Г. Оптические свойства коллоидного золота и его конъюгатов с биоспецифическими макромолекулами // Коллоид. Журн. – 1995. – 57. – С. 412–23.
14. Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Хлебцов Б.Н. и др. Многослойная модель биоконъюгатов золотых наночастиц: исследование адсорбции желатина и иммуноглобулина человека с использованием спектров статического рассеяния и поглощения света и метода динамического светорассеяния // Коллоид. журн. – 2003. – 65. – С. 679–93.
15. Хлебцов Н.Г., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Б.Н. Золотые наноструктуры с плазмонным резонансом для биомедицинских исследований // Российские нанотехнологии. – 2007. – 2. – С. 69–86.
16. Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Богатырев В.А. и др. Использование золотых наночастиц в твердофазном иммуноанализе // Российские нанотехнологии. – 2008. – 3. – С. 50–63.
17. Andreu E.J., de Llano J.J.M., Moreno, Knecht E. A rapid procedure suitable to assess quantitatively the endocytosis of colloidal gold and its conjugates in cultured cells // J. Histochem. Cytochem. – 1998. – 46. – P. 1199–202.
18. Anshup A., Venkataraman J.S., et al. Growth of gold nanoparticles in human cells // Langmuir. – 2005. – 21. – P. 11562–7.
19. Bajaj S., Ahmad I., Fatima M. et al. Immunomodulatory activity of a Unani gold preparation used in Indian system of medicine // Immuno-pharmacol. Immunotoxicol. – 1999. – 21. – P. 151–61.
20. Berne B.J., Pecora R. Dynamic light scattering with application to chemistry, biology, and physics. – N.Y.: Dover, 2002. – 376 p.
21. Birrel G.B., Helbery K.K. Immunogold labeling with small gold particles: Silver enhancement provides increased detectability at low magnifications // J. Electron. Microsc. Technol. – 1987. – 5. – P. 219–20.
22. Chen W., Cai W., Zhang L. et al. Sonochemical processes and formation of gold nanoparticles within pores of mesoporous silica // J. Colloid Interface Sci. – 2001. – 238. – P. 291–5.
23. Churaev N.V. The DLVO theory in Russian colloid science // Adv. Colloid Interface Sci. 1999. – 83. – P. 19–32.
24. Daniel M.C., Astruc D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology // Chem. Rev. – 2004. – 104. – P. 293–346.
25. De Mey J., Moeremans M. The preparation of colloidal gold probes and their use as marker in electron microscopy // Advanced techniques in biological electron microscopy / Ed. J.K. Koehler. B.: Springer, 1986. – Vol. 3. – P. 229–71.
26. Di Scipio R.G. Preparation of colloidal gold particles of various sizes using sodium borohydride and sodium cyanoborohydride // Anal. Biochem. – 1996. – 236. – P. 168–70.
27. Doron A., Joselevich E., Schlittner A., Willner I. AFM characterization of the structure of Au-colloid monolayers and their chemical etching // Thin Solid Films. – 1999. – 340. – P. 183–8.
28. Dubois L.H., Nuzzo R.G. Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces // Annu. Rev. Phys. Chem. – 1992. – 43. P. 437–67.
29. Eisler R. Biogeochemical, health, and ecotoxicological perspectives on gold and gold mining. – Boca Raton: CRC press, 2004. – 376 p.
30. Esumi K., Susuki A., Aihara N. et al. Preparation of gold colloids with UV irradiation using dendrimers as stabilizer // Langmuir. – 1998. – 14. – P. 3157–9.
31. Esumi K., Takei N., Yoshimura T. Antioxidant-potentiality of gold-chitosan nanocomposites // Colloid Surface B. – 2003. – 32. – P. 117–23.
32. Fabrikanos A., Athanassiou S., Lieser K.H. Darstellung stabiler Hydrosole von Gold und Silber durch Reduktion mit Athylen-diamintetraessigsäure // Ztschr. Naturforsch. – 1963. – Bd. 18. – S. 612–7.
33. Faraday M. Experimental relations of gold (and others metals) to light // Philos. Trans. Roy. Soc. London. – 1857. – 147. – P. 145–81.
34. Faulk W., Taylor G. An immunocolloid method for the electron microscope // Immunochemistry. – 1971. – 8. – P. 1081–3.
35. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // Nature. Phys. Sci. – 1973. – 241. – P. 20–2.
36. Gachard E., Remita H., Khatouri J. et al. Radiation-induced and chemical formation of gold clusters // New J. Chem. – 1998. – 22. – P. 1257–65.
37. Gericke M., Pinches A. Microbial production of gold nanoparticles // Gold Bull. – 2006. – 39. – P. 22–8.
38. Goddard E.D., Vincent B. Polymer adsorption and dispersion stability. – Wash. (D.C.), 1984. – 480 p.
39. Goia D.V., Matijević E. tailoring the particle size of monodispersed colloidal gold // Colloids Surface. A. – 1999. – 146. – P. 139–52.
40. Graham G. Medicinal chemistry of gold // Agents Actions Suppl. – 1993. – 44. – P. 209–17.
41. Green D.L., Lin J.S., Lam Y.-F. et al. Size, volume fraction, and nucleation of Stöber silica nanoparticles // J. Colloid Interface Sci. – 2003. – 266. – P. 346–58.
42. Green M., O'Brien P. A simple one phase preparation of organically capped gold nanocrystals // Chem. Commun. – 2000. – 3. – P. 183–4.
43. Gu H., Ho P.L., Tong E. et al. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities // Nano Lett. – 2003. – 3. – P. 1261–3.
44. Helfrich A., Brüchert W., Bettmer J. Size characterisation of Au nanoparticles by ICP-MS coupling techniques // J. Anal. Atom. Spectrom. – 2006. – 21. – P. 431–4.
45. Hirai H., Nakao Y., Toshima N. Preparation of colloidal transition metals in polymers by reduction with alcohols or ethers // J. Macromol. Sci. Chem. – 1979. – 13. – P. 727–50.

46. Hirai H., Aizawa H. Preparation of stable dispersions of colloidal gold in hexanes by phase transfer // *J. Colloid Interface Sci.* – 1993. – 161. – P. 471–4.
47. Huang X., El-Sayed I.E., Qian W., El-Sayed M.A. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods // *J. Amer. Chem. Soc.* – 2006. – 128. – P. 2115–20.
48. Joshi H.M., Bhumkar D.R., Joshi K. et al. Gold nanoparticles as carriers for efficient transnucosal insulin delivery // *Langmuir.* – 2006. – 22. – P. 300–5.
49. Jürgens L., Nichtl A., Werner U. Electron density imaging of protein films on gold-particle surfaces with transmission electron microscopy // *Cytometry.* – 1999. – 37. – P. 87–92.
50. Kang S.K., Chah S., Yun C.Ye., Yi J. Aspect ratio controlled synthesis of gold nanorods // *Korean J. Chem. Eng.* – 2003. – 20. – P. 1145–8.
51. Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Khlebtsov N.G. Determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra // *Langmuir.* – 2008. – 24. – P. 8964–70.
52. Longenberger L., Mills G. Formation of metal particles in aqueous-solutions by reactions of metal-complexes with polymers // *J. Phys. Chem.* – 1995. – 99. – P. 475–8.
53. Loo C., Lin A., Hirsch L. et al. Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer // *Technol. Cancer Res. Treatment.* – 2004. – 3. – P. 33–40.
54. Ma Z.F., Sui S.-F. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 41, 2176 (2002).
55. Ma H., Yin B., Wang S. et al. Synthesis of silver and gold nanoparticles by a novel electrochemical method // *Chemphyschem.* – 2004. – 5. – P. 68–75.
56. Mandal M., Kundu S., Ghosh S.K., Pal T. UV-photoactivation technique for size and shape controlled synthesis and annealing of stable gold nanoparticles in micelle // *Bull. Mater. Sci.* – 2002. – 25. – P. 509–11.
57. Mayer A.B.R., Mark J.E. Colloidal gold nanoparticles protected by cationic polyelectrolytes // *Pure Appl. Chem.* – 1997. – 11. – P. 2151–64.
58. McFarland A.D., Haynes Ch.L., Mirkin C.A. et al. Color my nanoworld // *J. Chem. Educ.* – 2004. – 81. – P. 544A–544B.
59. Merchant B. Gold, the noble metal and the paradoxes of its toxicology // *Biologicals.* – 1998. – 26. – P. 49–59.
60. Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy / Ed. M. Donbrow. – Boca Raton: CRC press, 1992. – 360 p.
61. Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speciell kolloidaler Metallösungen // *Ann. Phys.* 1908. – Bd. 25. – S. 377–445.
62. Murillo L.E., Viera O., Vicuna E. et al. Growth kinetics of gold nanoparticles // *Nanotechnology.* – 2002. – 2. – P. 435–8.
63. Niidome Y., Hori A., Sato T., Yamada S. Enormous size growth of thiol-passivated gold nanoparticles induced by near-IR laser light // *Chem. Lett.* – 2000. – 4. – P. 310–1.
64. Nowicki W. Kinetic behavior of the system composed of nanosized gold particles and very-high-molecular-weight polyacrylamide // *Colloids Surface A.* – 2001.
65. Nuss S., Böttcher H., Wurrn H., Hallensleben M.L. Gold nanoparticles with covalently attached polymer chains // *Angew. Chem. Intern. Ed.* – 2001. – 40. – P. 4016–8.
66. Oldenburg S.J., Averitt R.D., Westcott S.L., Halas N. Nanoengineering of optical resonances // *Chem. Phys. Lett.* – 1998. – 288. – P. 243–7.
67. Paciotti G.F., Myer L., Weinreich D. et al. Colloidal gold: A novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery // *Drug Deliv.* – 2004. – 11. – P. 169–83.
68. Pal A. Preparation of ultrafine colloidal gold particles using a bioactive molecule // *J. Nanoparticle Res.* – 2004. – 6. – P. 27–34.
69. Pham T., Jackson J.B., Halas N.J., Lee T.R. Preparation and characterization of gold nanoshells coated with self-assembled monolayers // *Langmuir.* – 2002. – 18. – P. 4915–20.
70. Rogoff E.E., Romano R., Hahn E.W. The prevention of Ehrlich ascites tumor using intraperitoneal colloidal 198Au // *Radiology.* – 1975. – 114. – P. 225–6.
71. Saraiva S.M., De Oliveira J.F. Control of particle size in the preparation of colloidal gold // *J. Disp. Sci. Technol.* – 2002. – 23. – P. 837–44.
72. Sato S., Toda K., Oniki S. Kinetic study on the formation of colloidal gold in the presence of acetylenic glycol nonionic surfactant // *J. Colloid Interface Sci.* – 1999. – 218. – P. 504–10.
73. Scaffardi L.B., Tocho J.O. Size dependence of refractive index of gold nanoparticles // *Nanotechnology.* – 2006. – 17. – P. 1309–15.
74. Shenton W., Davis S.A., Mann S. Directed self-assembly of nanoparticles into macroscopic materials using antibody-antigen recognition // *Adv. Mater.* – 1999. – 11. – P. 449–52.
75. Shukla R., Bansal V., Chaudhary M. et al. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview // *Langmuir.* – 2005. – 21. – P. 10644–54.
76. Shulepov S.Yu., Frens G. Surface roughness and particle size effect on the rate of perikinetic coagulation: experimental // *J. Colloid Interface Sci.* – 1996. – 182. – P. 388–94.
77. Siiman O., Burshteyn A. Formation of colloidal metal dispersions using aminodextrans as reductants and protective agents. – Pat. 5248772 US, 1993.
78. Spatz J.P., Mossmer S., Moller M. Mineralization of gold nanoparticles in a block copolymer microemulsion // *Chem. Europ. J.* – 1996. – 12. – P. 1552–5.
79. Stathis E.C., Fabricanos A. Preparation of colloidal gold // *Chem. Industr. (London).* – 1958. – 27. – P. 860–1.
80. Stejskal J., Stejskal V.D.M. The role of metals in autoimmunity and the link to neuroendocrinology // *Neuroendocrinol. Lett.* – 1999. – 20. – P. 351–64.
81. Stendroff C.J., Herschbach D.R. Kinetics of displacement and charge transfer reactions probed by SERS: Evidence for distinct donor and acceptor sites on colloidal gold surfaces // *Langmuir.* – 1985. – 1. – P. 131–5.
82. Stöber W., Fink A., Bohn J. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range // *J. Colloid Interface Sci.* – 1968. – 26. – P. 62–9.
83. Sugimoto T. Preparation of monodispersed colloidal particles // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1987. – 28. – P. 65–108.
84. Tan Y., Dai X., Li Y., Zhu D. Preparation of gold, platinum, palladium and silver nanoparticles by the reduction of their salts with a weak reductant-potassium bitartrate // *J. Mater. Chem.* – 2003. – 13. – P. 1069–75.
85. Teranishi T., Miyake M. Size control of metal nanoparticles with aid of surface protection by polymer // *Hyomen.* – 1997. – 35. – P. 439–52.
86. Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold // *Discuss. Faraday Soc.* – 1951. – 11. – P. 55–75.
87. Turkevich J., Garton G., Stevenson P.C. The color of colloidal gold // *J. Colloid Sci.* – 1954. – 9(suppl. 1). – P. 26–35.
88. Weiser H.B. *Inorganic Colloid Chemistry.* – N.Y.: Wiley, 1933.
89. Xu Z.P., Zeng Q.H. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery // *Chem. Eng. Sci.* – 2006. – 61. – P. 1027–40.
90. Zhivkov A., van der Zande B.M.L., Stoylov S. Electro-optics of metal particles: electric birefringence of gold rods // *Coll. Surf. A.* – 2002. – 209. – P. 299–303.
91. Zhou Y., Itoh H., Uemura T. et al. Preparation of 7 π -conjugated polymer-protected gold nanoparticles in stable colloidal form // *Chem. Commun.* – 2001. – 7. – P. 613–4.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616.34/.35-006.6-085.273:577.2.088

*М.В. Антонов¹, А.Х. Сабиров², Т.М. Сабиров², К.В. Уткин², В.В. Решетникова³, А.Ю. Барышников³, О.Д. Мустаев⁴***ЗНАЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ТАРГЕТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ**¹Салехардская окружная клиническая больница, Салехард²ГОУ ВПО ТюмГМА Минздравсоцразвития России, Тюмень³РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва⁴Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург**Контактная информация**

Антонов Максим Владимирович, врач-онколог отделения онкологии

Адрес: 629001, Салехард, ул. Мира, 39; тел.: +7(3492)24-43-66

e-mail: amv77@inbox.ru

Статья поступила 06.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

В исследовании показано прогностическое значение таргетных препаратов в лечении больных КРР. Проведена оценка молекулярно-биологических маркеров и их значимость в оптимизации проводимой терапии.

Ключевые слова: колоректальный рак, цетуксимаб, бевацизумаб, FOLFIRI.*M.A. Antonov¹, A.Kh. Sabirov², T.M. Sabirov², K.V. Utkin², V.V. Reshetnikova³, A.Yu. Barishnikov³***THE SIGNIFICANCE OF BIOMARKERS IDENTIFICATIONS FOR TREATMENT OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER**¹Clinical Hospital, Salekhard²State Medical Academy, Tumen³N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow⁴S.M. Kirov medical corps academy, Sankt-Peterburg**Abstract**

The study shows the prognostic significance of targeted therapies in the treatment of patients with colo-rectal cancer. The estimation of molecular biological markers and their significance in the optimization of therapy.

Key words: colorectal cancer, biomarkers.**Введение**

В России ежегодно регистрируется 40 000 случаев рака толстой кишки. Умирает 31 000 больных. Средний показатель заболеваемости КЛРМ составляет примерно 13,1 на 100 тысяч населения. Прослеживается стойкая тенденция к росту частоты развития опухолей этой локализации во всех развитых странах, в том числе и России. При этом отмечается значительное число случаев с поздней стадией заболевания, когда существенно затрудняется возможность выполнения радикального хирургического вмешательства и оказания полноценной медицинской помощи. Ведущей причиной поздней диагностики новообразований кишечника является разнообразие клинических форм заболевания и скудность их проявлений на ранних стадиях, а как следствие, несвоевременное обращение больных за медицинской помощью [1]. Таким образом, неуклонный рост заболеваемости и чрезвычайно низкая выявляемость ранних форм КРР, а также малоутешительные результаты хирургического вмешательства заставляют искать новые и совершенствовать традиционные методы комбинированного и комплексного лечения с включением в лечебный план ЛТ и ХТ. В столь сложной ситуации только успехи лекарственного лечения могут существенным образом улучшить отдаленные результаты и увеличить продолжительность жизни этой категории пациентов [2].

Задачи исследования

Изучение экспрессии молекулярно-биологических маркеров в опухолях и сыворотке крови больных КРР иммуногистохимическими, молекулярно-генетическими и биохимическими методами с учетом основных клинико-морфологических характеристик опухоли и возможности использования этих показателей для оценки клинического течения болезни и прогноза развития факторов риска КРР с использованием таргетной терапии препаратами бевацизумаб и цетуксимаб.

Материалы и методы

Работа основана на анализе клинических данных и результатов лабораторных методов диагностики 150 больных КРР, подвергшихся хирургическому лечению и получавших специальное противоопухолевое лечение в Салехардской окружной клинической больнице (главный врач Коган М.И.). Данные пациенты были разделены на 3 равные группы, каждая по 50 человек. Предварительно на этапе лечения колоректального рака у всех больных проведен анализ статуса гена *K-Ras* в образцах опухоли. Также проведено молекулярно-генетическое исследование плазмы крови, в результате которого у наблюдаемых больных определена гиперэкспрессия *EGFR* и *VGFR*.

С целью выявления возможной закономерности между агрессивностью течения заболевания и топографическими характеристиками онкологического процесса, в когорте исследуемых отдельно рассматривались пациенты с поражением ободочной кишки – 70% (105 из 150 человек) и больные с раком прямой кишки – 30% (45 из 100 человек). Кроме этого, анализировались симптомы болезни и наличие опухолевых осложнений (перфорация стенки органа, кишечная непроходимость).

Из общего числа рассматриваемых пациентов с КРР у 44% стадия заболевания согласно классификации Dukes соответствовала категории Dukes'C, а у 56% – Dukes'D. У большинства больных – 93,3% (140 из 150) при морфологическом исследовании операционного материала была обнаружена АТК. Минимальное число больных – 6,7% (10 из 150) имело неоплазии кишечника со слизееобразованием. Опухоли по степени дифференцировки распределялись следующим образом: 15,3% (23 из 150) – низко, 76,7% (115 из 150) – умеренно и 8% (12 из 150) – высокодифференцированных новообразований.

Ни одному из больных, включенных в исследование, не проводилось специфическое лечение до операции. В послеоперационном периоде: 50 из 150 пациентов получали адьювантную химиотерапию, 50 пациентов получали адьювантную химиотерапию с таргетным препаратом по схеме – FOLFIRI + цетуксимаб и 50 пациентов – FOLFIRI + бевацизумаб.

Математический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 7.0 for Windows и Microsoft® Office Excel 2003. Рассчитывали среднее значение показателей, стандартную ошибку среднего, а также их медианы. Определение достоверности различий частот признаков в изучаемых группах проводили с использованием критерия χ^2 и непараметрического точного критерия Фишера для малых выборок. Различия между показателями считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследований Имуногистохимическое определение EGFR и VEGFR

Имуногистохимическое исследование выполнено на парафиновых срезах опухолей с помощью биотинстрептавидинового иммунопероксидазного метода с моно- и поликлональными антителами. Для каждого антигена оценивали тип специфического окрашивания, который зависел от локализации продукта реакции в клетке (цитоплазматический, мембранный, ядерный, смешанный).

У всех больных КРР, независимо от степени дифференцировки опухоли, наблюдаются повышенные значения EGFR и VEGFR. При этом, чем выше степень злокачественности, тем больше увеличены показатели факторов роста.

ИГХ определение экспрессии антигена KI-67 в опухолевых клетках

Уровень пролиферативной активности раковых клеток является ключевым фактором, определяющим потенциал злокачественности опухоли и агрессивность течения заболевания. В данном исследовании проведен анализ пролиферативной активности первичных АТК с помощью оценки индексов пролиферации KI-67 и сопоставления полученных данных с клинико-морфологическими факторами прогноза и показателями выживаемости

больных КРР. У большинства больных КРР выявлен высокий уровень пролиферативной активности KI-67, при этом большой процент KI-67⁺ клеток (>50%) отмечен в 33 случаях, умеренные индексы пролиферации (21–50%) – в 105 случаях и низкий уровень пролиферации (< 20%) – в 12 случаях.

Экспрессия маркера наблюдалась в опухолях с различной степенью гистологической дифференцировки и, как правило, в меньшей степени была выражена в участках с секреторной активностью (слизееобразованием). Средний уровень экспрессии антигена KI-67 прямо пропорционально коррелировал со степенью злокачественности КРР. В опухолях с более высоким уровнем злокачественности индекс KI-67 был выше, чем в опухолях с более низким уровнем злокачественности (табл. 3). При изучении связи экспрессии маркеров с показателями выживаемости больных КРР высокая пролиферативная активность клеток КРР, исследованная с помощью индексов KI-67, являлась одним из факторов неблагоприятного прогноза течения заболевания.

Изучение мутационного статуса больных с КРР

Следующим этапом исследования стало изучение молекулярно-генетических изменений в зависимости от гистологического варианта опухоли и пролиферативной активности (табл. 4). Из таблиц 4–7 видно, что на фоне ПХТ происходят изменения молекулярно-генетического статуса больных КРР, а именно: уменьшается количество мутаций и снижается уровень EGFR и VEGFR. Наиболее выраженные изменения происходят у больных КРР с высокодифференцированной АТК (более благоприятный фенотип). При анализе изменений, произошедших после проведения 6 курсов ПХТ, наблюдается уменьшение количества мутаций в генах, а также снижение уровня EGFR, VEGFR у всех больных.

При анализе молекулярно-генетического статуса больных КРР, которые получали лечение по схеме FOLFIRI + цетуксимаб и FOLFIRI + бевацизумаб, видно, что выраженность его изменений (нарушений) меньше, чем у больных, получавших просто ПХТ по схеме FOLFIRI. При этом наблюдается не только качественно-количественное улучшение молекулярно-генетического статуса больных КРР (в виде уменьшения количества мутаций), но и снижение уровня экспрессии ростовых факторов, что также является признаком улучшения состояния клеток.

Установлено, что на фоне специального лечения количество мутаций уменьшается. В группе пациентов, получавших ХТ по схеме FOLFIRI, частота объективных ответов составила 54%, время до прогрессирования – 10,9 мес. и продолжительность жизни – 20,6 мес.

В группе пациентов, получавших ХТ по схеме FOLFIRI + цетуксимаб, частота объективных ответов составила 57%, время до прогрессирования – 11,4 месяцев и продолжительность жизни – 26,1 месяцев.

В группе пациентов, получавших ХТ по схеме FOLFIRI + бевацизумаб, частота объективных ответов – 57,9%, время до прогрессирования – 13,5 месяцев и продолжительность жизни – 27,7 мес.

При анализе данных по общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования выявлено, что схемы лечения больных КРР FOLFIRI + цетуксимаб и FOLFIRI + бевацизумаб увеличивают медиану времени до прогрессирования с 10,9 до 11,4 мес. в и с 10,9 до 13,5 мес., медиану общей выживаемости с 20,6 до 26,1 мес. и с 20,6 до 27,7 мес. по сравнению со схемой FOLFIRI без добавления таргетных препаратов.

Таблица 1

Распределение больных КРР в зависимости от степени дифференцировки опухоли и значения индекса *EGFR*

Степень дифференцировки опухоли (n пациентов)	Уровень экспрессии антигена <i>EGFR</i>			
	0	1+	2+	3+
Низкая (n=23)	–	–	4	19
Умеренная (n=115)	–	29	68	18
Высокая (n=12)	4	8	–	–

Таблица 2

Распределение больных КРР в зависимости от степени дифференцировки опухоли и значения индекса *VEGFR*

Степень дифференцировки опухоли (n – кол-во пациентов)	Уровень экспрессии антигена <i>VEGFR</i>			
	0	1+	2+	3+
Низкая (n=23)	–	1	3	19
Умеренная (n=115)	2	25	64	24
Высокая (n=12)	2	9	1	–

Таблица 3

Распределение больных КРР в зависимости от степени дифференцировки опухоли и значения индекса *KI-67*

Степень дифференцировки опухоли (n – кол-во пациентов)	Уровень экспрессии антигена <i>KI-67</i>		
	низкая пролиферативная активность < 20% (n=12)	умеренная пролиферативная активность 21–50% (n=105)	высокая пролиферативная активность > 50% (n=33)
Высокая (n=12)	12 (100%)	–	–
Умеренная (n=115)	–	105 (91,3%)	10 (8,7%)
Низкая (n=23)	–	–	23 (100%)

Добавление бевацизумаба, цетуксимаба к химиотерапии достоверно улучшает время до прогрессирования, и увеличивает продолжительность жизни больных. Терапия моноклональными антителами должна проводиться максимально долго, до прогрессирования. Не определены клинические и молекулярные факторы, позволяющие прогнозировать успех терапии бевацизумабом. В то же время, эффективность анти*EGFR* антител реализуется только у пациентов без мутации гена *K-ras*.

При изучении результатов мы выявили, что наибольшее количество мутаций наблюдается у больных КРР с умеренно-дифференцированными, активно пролиферирующими (*KI-67* > 50 %) опухолями.

При этом преобладают мутации *p53* в 7 экзоне. Существенной зависимости от гистологической формы опухоли и возраста больных выявлено не было.

Как маркер клеточной пролиферации антиген *KI-67* является важным критерием прогноза клинического течения КРР. Уровень клеточной пролиферации (индекс *KI-67*) коррелирует с ответом опухоли на предоперационную химиотерапию и исход КРР, доказано, что уровень экспрессии антигена *KI-67* значительно снижается с возрастом пациентов[3].

Результаты исследования позволяют предположить, что, несмотря на то, что апоптоз и клеточная пролиферация являются взаимосвязанными процессами, оказывающими сильное влияние на биологическое поведение опухолей, при оценке риска метастазирования КРР экспрессия этих факторов должна учитываться в комплексе с маркерами, более тесно связанными с инвазивным потенциалом раковых клеток.

Вместе с тем, полученные в исследовании результаты подтверждают, что важными факторами прогноза течения КРР являются следующие биологические параметры пролиферации и апоптоза: индекс пролиферации *KI-67*, ядерная аккумуляция

p53 и соотношение уровней экспрессии *p53/EGFR* и *VEGFR* в опухоли.

Таким образом, при однофакторном анализе показано, что содержание большинства изученных белков в опухолях обладает определенной прогностической ценностью. При многофакторном анализе комплексного содержания белков с учетом клинико-морфологических признаков были определены наиболее значимые независимые показатели.

Следует отметить, что такие морфологические характеристики, как низкая степень гистологической дифференцировки и наличие инвазии опухоли сосудов снижали прогностическую значимость большинства маркеров.

Подводя итог проведенного исследования можно заключить, что изучение особенностей экспрессии молекулярных маркеров при КРР, а также сопоставление собственных результатов и литературных данных показало, что процессы инвазии и метастазирования сопровождаются значительными изменениями иммунофенотипа клеток первичных опухолей и затрагивают многие биохимические процессы. Прекращение экспрессии одних и гиперэкспрессия других факторов влияет на целый ряд клеточных характеристик и приводит к возникновению злокачественного фенотипа, что в последствии способствует прогрессии опухолей, развитию отдаленных метастазов и снижению выживаемости больных КРР.

Клинико-морфологические, иммуногистохимические, биохимические сопоставления могут способствовать определению более точных критериев для совершенствования методов диагностики и определения показаний к дополнительным методам терапии.

Дальнейшее изучение и проверка выявленных закономерностей в клинике будут полезны для прогнозирования и улучшения результатов лечения опухолей данной локализации.

Таблица 4

Молекулярно-генетический статус больных КРР в зависимости от экспрессии ростовых факторов EGFR, hVEGFR-165 до лечения (n=150)

Степень дифференцировки опухолевых клеток (n пациентов)	EGFR (N=0-9,5 fmol/ml)	hVEGFR-165 (N=0-120 pg/ml)	Исследуемый ген										Кол-во мутаций	
			p53, экзон		C-kit, кодон	B-raf, кодон	APC	K-ras; кодоны	E-cadherin	p16				
			5	6							7	8		
Высокая (n=12)	10,8	130,0	4	4	9	8	12	15	-	-	12; 13	-	-	35
Умеренная (n=115)	36,7	168,0	27	54	79	42	12	-	18	-	-	32	26	290
Низкая (n=23)	15,4	174,7	11	10	21	9	7	1	14	-	-	11	8	92

Таблица 5

Молекулярно-генетический статус больных КРР после 6 курсов FOLFIRI (n=50)

Степень дифференцировки опухолевых клеток (n пациентов)	EGFR (N=0-9,5 fmol/ml)	hVEGFR-165 (N=0-120 pg/ml)	Исследуемый ген											
			p53, экзон		C-kit, кодон	B-raf, кодон	APC	K-ras; кодоны	E-cadherin	p16				
			5	6							7	8		
Высокая (n=4)	9,8	128,0	1	1	3	2	-	-	1	-	-	-	2	-
Умеренная (n=38)	34,9	165,0	9	21	32	15	4	-	8	-	-	-	12	10
Низкая (n=8)	13,8	143,9	5	4	8	4	3	1	4	-	-	-	4	4

Таблица 6

Молекулярно-генетический статус больных КРР после 6 курсов FOLFIRI + цетуксимаб (n=50)

Степень дифференцировки опухолевых клеток (n пациентов)	EGFR (N=0-9,5 fmol/ml)	hVEGFR-165 (N=0-120 pg/ml)	Исследуемый ген											
			p53, экзон		C-kit, кодон	B-raf, кодон	APC	K-ras; кодоны	E-cadherin	p16				
			5	6							7	8		
Высокая (n=4)	9,8	128,0	1	-	3	2	-	-	1	-	-	-	1	-
Умеренная (n=39)	34,9	165,0	7	16	16	12	3	-	3	-	-	-	8	7
Низкая (n=7)	13,8	143,9	3	3	5	3	3	-	4	-	-	-	3	2

Таблица 7

Молекулярно-генетический статус больных КРР после 6 курсов FOLFIRI + бевацизумаб (n=50)

Степень дифференцировки опухолевых клеток (n пациентов)	EGFR (N=0-9,5 fmol/ml)	hVEGFR-165 (N=0-120 pg/ml)	Исследуемый ген											
			p53, экзон		C-kit, кодон	B-raf, кодон	APC	K-ras; кодоны	E-cadherin	p16				
			5	6							7	8		
Высокая (n=4)	9,3	125,9	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	1	-
Умеренная (n=38)	34,3	161,3	5	10	13	9	2	-	3	-	-	-	6	4
Низкая (n=8)	13,3	139,2	2	2	5	2	1	-	3	-	-	-	2	1

Выводы

Многофакторный анализ прогностической значимости комплекса клинико-морфологических признаков с учетом экспрессии молекулярно-биологических маркеров позволил выявить тесную связь между EGFR и VEGFR и молекулярно-генетическим статусом больных КРП.

На основании полученных результатов установлено, что изменения их экспрессии рассматривается как общий независимый фактор прогноза безрецидивной выживаемости больных КРП.

Молекулярно-генетическое исследование выявило выраженные изменения: в большинстве наблюдений встречаются мутации генов *p53* в 6; 7 экзонах, *APC*, *C-kit*, *E-cadherin*.

Полученные результаты позволяют рассматривать иммуногистохимический анализ EGFR и VEGFR в опухоли как метод прогнозирования развития отдаленных метастазов у больных КРП после операции. У всех больных выявлено превышение нормальных значений EGFR и VEGFRs.

Литература

1. Базин И.С., Гарин А.М., Жарков С.А., Нариманов М.Н. Рак толстой кишки состояние проблемы. // Российский медицинский журнал. 2003, Т. 11. С. 674-79
2. Имянитов Е.Н. Клинико-молекулярные аспекты колоректального рака: этиопатогенез, профилактика, индивидуализация лечения. // Практ. онкол. — 2005. — Т. 6, N2. С. 65-70.
3. Oesterreich S., Deng W., Jiang S., Cui X., Inanova M., Schiff R., Kaiyan K., Kang K., Hadsell D.L., Behrens J. & Lee A.V. Estrogenmediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. // Cancer Res. 63. P. 5203-8.

Высокая пролиферативная активность клеток АТК, исследованная с помощью индекса KI-67, является достоверным фактором неблагоприятного прогноза общей выживаемости, но не связана с БРВ больных РТК. На фоне проводимого комплексного лечения в группах больных наблюдалась положительная динамика изменения молекулярно-генетического статуса: уменьшилось число мутаций у больных с заранее благоприятным фенотипом. Уровень EGFR и VEGFRs на фоне применения схем FOLFIRI + бевацизумаб и FOLFIRI + цетуксимаб достоверно снижался по сравнению с FOLFIRI без добавления таргетных препаратов.

У больных, проходивших лечение по схеме FOLFIRI + бевацизумаб и FOLFIRI + цетуксимаб наблюдается значительное улучшение молекулярно-генетического статуса (число мутаций сократилось) по сравнению с группой FOLFIRI без добавления таргетных препаратов. У групп больных проходивших лечение с добавлением таргетных препаратов наблюдалось увеличение показателей общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 615.2:577.112:591.463.1

А.В. Самойлов¹, В.В. Мартиросян¹, А.Ю. Барышников², Н.М. Сураева²
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЕТУХА
 В КАЧЕСТВЕ ПЕРЕНОСЧИКОВ ЧУЖЕРОДНОЙ ДНК
 С ЦЕЛЮ РАЗРАБОТКИ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ
 МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ**

¹ГНУ НИИ ПЗК им. В.А. Афанасьева РАСХН, Московская обл.²РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва**Контактная информация**

Самойлов Артем Владимирович, старший научный сотрудник лаборатории трансгенеза

Адрес: 140143, Московская обл., Раменский р-н, п. Родники, ул. Трудовая, 6; тел. +7(495)548-92-32

e-mail: als_83@mail.ru

Статья поступила 10.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Цель данного исследования – разработка и совершенствование биотехнологического метода получения продуцентов фармацевтических белков человека. Трансфекцию сперматозоидов проводили плазмидой, содержащей ген Г-КСФ человека, с помощью липосом «Lipofectine®». Определены оптимальные режимы подготовки сперматозоидов петуха для трансфекции, изучены индивидуальные различия между производителями по эффективности осеменения спермой после манипуляционных воздействий, продемонстрирована интеграция гена Г-КСФ человека в куриных эмбрионах.

Ключевые слова: фармацевтические белки, Г-КСФ, трансгенез, сперматозоиды, липосомы, куриные эмбрионы.

A.V. Samoilov¹, V.V. Martirosian¹, A.Yu. Baryshnikov², N.M. Surayeva²
**THE USAGE LINKER
 OF BASED CHICKEN SPERM-MEDIATED GENE TRANSFER
 FOR DEVELOPMENT AND STUDY OF METHODS
 OF THERAPEUTIC PROTEINS PRODUCTION**

¹Animal and Rabbit Breeding Research Institute of RAAS, Moscow Region²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow**Abstract**

The aim of this study was to develop and to modify the biotechnological methods of pharmaceutical proteins livestock production. The transfection of sperm with human G-CSF gene was carried out with Liposomes «Lipofectine®». The parameters of the optimal chicken sperm transfection have been determined. We have studied the efficiency of sperm insemination after manipulations due to individual differences between producers. Here, we also demonstrate the integration of human GM-CSF gene in chicken embryos.

Key words: pharmaceutical proteins, GM-CSF, transgenesis, sperm cells, liposomes, chicken embryos.

Введение

Разработка технологии введения чужеродного гена путем переноса со спермой открывает широкие возможности по использованию яйца кур для продукции фармацевтических белков. К преимуществам использования трансгенной птицы по сравнению с известными технологиями получения таких белков относятся:

- 1) потенциальные возможности широкомасштабного производства за счет быстрого размножения исходных трансгенных особей,
- 2) высокий уровень экспрессии экзогенных белков и их правильное гликозилирование и посттрансляционные модификации в организме трансгенных кур,
- 3) низкая стоимость производства [2].

На рынке продуцентов лекарственных препаратов трансгенная птица получена только в нескольких лабораториях США и Великобритании, результаты исследований запатентованы.

Однако необходимо отметить, что большинство трансгенных продуцентов с высоким титром лекарственных белков были получены с использо-

ванием вирусных конструкций плазмид [5]. Таким образом, не исключен возможный риск нежелательной активации определенных генов организма, в том числе и онкогенов, в случае попадания вирусного агента вместе с экзогенным белком.

При разработке методов получения трансгенной птицы с использованием опосредованного переноса невирусных плазмид с помощью сперматозоидов было показано, что различные связывающие агенты (липосомы, МКА) значительно повышают эффективность хромосомного встраивания экзогенной ДНК [3; 4; 7].

Для успешного трансгенеза важно также подобрать оптимальные условия подготовки спермы для трансфекции и изучить индивидуальные различия производителей по эффективности осеменения после проведения манипуляционных воздействий. Такие исследования до настоящего времени не проводились.

Целью настоящего исследования являлось изучение комплекса вопросов, связанных с разработкой и усовершенствованием биотехнологических методов генетической трансформации птицы с помощью опосредованного переноса чужеродной ДНК с использованием сперматозоидов.

Материалы и методы

В опытах использовали кур кросса «Радо-неж» и кросса «Птичное». Для получения спермы использован метод одновременного ручного массажа поясничной части спины и брюшной стенки в направлении к хвосту.

Оценка качества спермы

Для дальнейшей работы отобраны петухи с со спермой нормального молочно-белого или слегка желтоватого цвета, сливкообразной консистенции, без хлопьев; концентрация спермиев 4–5 млрд в 1 мл; активность спермиев не ниже 7 баллов (активность и подвижность спермиев определяли по числу сперматозоидов, имеющих поступательно-прямолинейное движение).

Сперматозоиды отмывали от семенной жидкости путем двух-трехкратного центрифугирования (220 или 450 g, 5 мин).

В работе использовали конструкцию вектора pIRES (Clontech, США). Данный вектор предназначен для экспрессии в эукариотических клетках, содержит CMV-промотор и эукариотический селективный ген устойчивости к неомицину/канамицину. В полилинкер вектора pIRES EGFP2 был проклонирован ген Г-КСФ человека, любезно предоставленный С.И. Городецким (ИМБ РАН), по сайтам рестрикции BamHI-EcoRI. Размер исходной генной конструкции составил 6585 пар оснований.

Плазмидную ДНК в количестве 40 мкг растворяли в 250 мкл среды OPTI-MEM («Invitrogen», США), добавляли 40 мкл «Lipofectin®» («Invitrogen», США) и инкубировали 40 мин при комнатной температуре. Одновременно готовили смесь рестриктазы SalI с липофектином на среде OPTI-MEM; для этого 150 ед. (4 мкл) рестриктазы смешивали со 150 мкл среды OPTI-MEM и добавляли 40 мкл «Lipofectin®», смесь также инкубировали 40 мин. Смешивали растворы ДНК и рестриктазы, добавляли к осевшим сперматозоидам после второго центрифугирования, перемешивали и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. В опытах была использована смешанная сперма от 3 петухов.

Осеменение кур

Осеменение производилось с применением шприца с укороченным катетером, который вводился в яйцепровод на глубину 4–5 см с последующим впрыскиванием дозы спермы. После осеменения проводили сбор яиц, инкубировали 7 суток, извлекали эмбрионы и анализировали методом ПЦР. Эмбрионы гомогенизировали с 500 мкл PBS (ООО «НПО ПанЭко», Россия, Москва) и отбирали 100 мкл гомогенизата для выделения ДНК.

ДНК из гомогенизата выделяли с помощью наборов «Универсальной пробоподготовки» (ООО «Лаборатория ИзоГен», Россия, Москва). Выделенную ДНК либо сразу использовали для постановки ПЦР, либо хранили при температуре –20 °С.

ПЦР проводилась с применением наборов для постановки ПЦР GenPak® PCR Core (ООО «Лаборатория ИзоГен», Россия, Москва). На основании генетической карты плазмиды pIRES2 с помощью компьютерной программы Vector NTI 9.0.0. были подобраны праймеры для проведения ПЦР-анализа. Для определения наличия гена ГКСФ человека были подобраны следующие праймеры, кодирующие участок гена в 730 пар олигонуклеотидов: Gcsf-dir 5' CCT GCC AGC TCC CTG CCC CAG 3' Gcsf-rev 5' GCC TGC AGG AGC CCC TGG TAG AGG 3';

Для определения наличия CMV-промотора были подобраны следующие праймеры, кодирующие участок гена в 305 пар олигонуклеотидов: CMV-dir 5'GCC AAG TAC GCC CCC TAT TGA CG 3' CMV-rev 5'CGT ACA CGC STA CCG CCC ATT TGC 3'

Синтез праймеров осуществлялся ООО «СибЭнзим-М», (Россия, Новосибирск).

Результаты и обсуждение

Необходимым этапом при получении трансгенной птицы является использование унифицированных образцов спермы хорошего качества. В птицеводстве с этой целью используются среды-разбавители, позволяющие сохранить свойства спермы и получать разбавленные дозы спермы одной концентрации. Нами был выбран разбавитель, разработанный и произведенный на базе НИИ Птицеводства. Показано, что основные показатели разбавленной спермы сохраняются при комнатной температуре в течение 5 час. после получения биоматериала, и даже после суточного хранения. Аналогичные показатели отмечались нами и при использовании в качестве разбавителя среды OPTI-MEM. Оказалось, что сразу же после эякуляции у сперматозоидов из-за разницы температуры тела и окружающей среды, возникает температурный шок, проявляющийся в виде снижения подвижности, который не влиял на оплодотворяющую способность спермы. С целью удаления семенной жидкости из образцов семени нами были оценены два режима центрифугирования – при 220 и 450 g на протяжении 5 мин. – с последующим разбавлением сперматозоидов после их осаждения разбавителем, а также подобран количественный состав сперматозоидов, удовлетворяющий условия проведения экспериментов. Наилучшие показатели по осеменению кур были получены в случае однократного и трехкратного центрифугирования спермы при 220 g на протяжении 5 мин. в дозе 500 млн., что дало 82 и 50 % оплодотворенных яиц соответственно. Далее нами изучены индивидуальные различия способности к осеменению спермы петухов после трехкратного центрифугирования сперматозоидов.

Существенных различий между производителями выявлено не было. Процент оплодотворенных яиц варьировал 36–40. Однако при осеменении кур смешанной спермой этот показатель был выше (63%), поэтому в дальнейших экспериментах использовалась смешанная сперма от трех производителей. Необходимо отметить, что в современном птицеводстве при проведении искусственного осеменения куриц также применяется смешанная сперма [1]. Также были изучены индивидуальные различия куриц по их способности к эффективному осеменению. Куриц осеменяли смешанной спермой в дозе 500 млн. сперматозоидов при трехкратном центрифугировании при 220 g. Для участия в дальнейших экспериментах по трансгенезу, нами были отобраны курицы, которые откладывали 81, 62 и 52% оплодотворенных яиц, что являлось выше среднего показателя.

Таким образом, нами впервые изучены индивидуальные различия производителей по эффективности осеменения после проведения манипуляционных воздействий, связанных с подготовкой сперматозоидов к трансфекции, и отобраны петухи и курицы для дальнейших экспериментов по трансгенезу.

Известно, что у мышей и свиней при инкубации экзогенной ДНК со сперматозоидами чаще всего встречалось эпизодическое встраивание, отсутствие встраивания или трансген не передавался следующему поколению [6; 8].

Возможно, что выявленные различия в характере взаимодействий экзогенной ДНК при ее непосредственной инкубации со спермой и опосредованном переносе, а также и дальнейшие последствия этих событий регулируются разными молекулярными механизмами.

В литературных источниках нам не встречались работы по инкубации плазмид со спермой петуха без опосредованного переноса. В наших экспериментах на птице также не удалось зафиксировать интеграцию ДНК этим методом, т.к. после осеменения трех куриц спермой, инкубированной в присутствии плазмидной ДНК, и содержащей ген Г-КСФ человека без использования липосом, было собрано 18 яиц, получено 12 эмбрионов, ни один из которых не был трансгенным.

В связи с опубликованными данными о положительном влиянии липосом на процесс связывания ДНК со сперматозоидами [4; 7] нами изучен препарат на основе липосом – «Lipofectine®» (Invitrogen). Ранее на примере инъекции в семенники крыс было показано, что не любой коммерческий препарат комплексов липосом с геном способен встраивать экзогенную ДНК [8]. Нами выбран препарат «Lipofectine®» (Invitrogen), который еще не был изучен при трансгенезе птицы. Проведено семь осеменений куриц трансфицированной спермой с тестированием семисуточных эмбрионов на присутствие чужеродного гена. Было собрано 51 яйцо, из которых получено 29 эмбрионов, один из которых оказался трансгенным (табл., рис., трек № 6). При этом длина гибридизируемого фрагмента гена соответствовала ожидаемой.

Таблица

Получение трансгенных эмбрионов после осеменения кур спермой петухов, трансфицированной геном Г-КСФ человека с применением препарата «Lipofectine®»

Показатель	n объектов	Процент от числа	
		Снесенных яиц	Полученных эмбрионов
Получено яиц	51	100	
Получено эмбрионов	29	57	100
В том числе:			
Развились нормально	29	57	100
Из них трансгенных	1	2,0	3,4

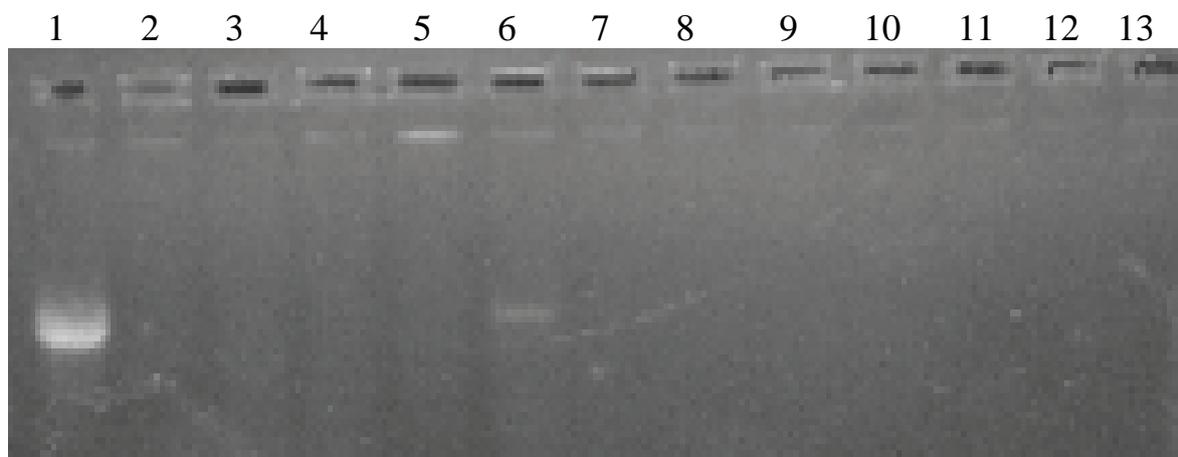


Рис. ПЦР-анализ ДНК эмбрионов птицы:

- 1 – положительный контроль – плазида с ч-Г-КСФ;
- 2–10 – ДНК эмбрионов, полученных в результате эксперимента;
- 11; 12 – отрицательные контроли нетрансгенных куриц;
- 13 – отрицательный контроль выделения ДНК.

Выводы

1. Оптимальным способом отделения сперматозоидов петуха от семенной жидкости является центрифугирование эякулята при 220 g в течение 5 мин. Оптимальное число сперматозоидов, используемых для трансфекции чужеродным геном, составляет 500 млн. на дозу.
2. Наблюдаются значительные индивидуальные различия между курицами по эффективности осеменения спермой после манипуляционных воздействий. Процент оплодотворенных яиц составил в среднем 47 % с колебаниями от 19 до 81 % у отдельных особей.

3. Методом ПЦР продемонстрирована интеграция гена ГКСФ человека у куриных эмбрионов.

Авторы статьи выражают искреннюю благодарность фирме ООО «Биолайн Фармторг», в лице Генерального директора Тищенко А.Н., за всестороннюю поддержку при проведении исследований.

Литература

1. Давтян А.Д. Воспроизводство и искусственное осеменение сельскохозяйственной птицы. – Сергиев Посад: ВНИТИП, 1999. – 240 с.
2. Сураева Н.М., Самойлов А.В. Получение фармацевтических белков с помощью трансгенной птицы // Вестник РОНЦ. – 2009. – №4. – С. 19–25.
3. Chang K., Qian J., Jiang M.S. *et al.* Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer // BMC Biotechnol. – 2002. – 2. – P. 5–10.
4. Harel-Markowitz E., Gurevich M., Shore L.S. *et al.* Use of sperm plasmid DNA lipofection combined with REMI (restriction enzyme-mediated insertion) for production of transgenic chickens expressing eGFP (enhanced green fluorescent protein) or human follicle-stimulating hormone // Biol.Reprod. 2009. – 80(5). – P. 1046–52.
5. Kamihira M., Ono K., Esaka K. *et al.* High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector // J. Virology. – 2005. – 79(17). – P. 10864–74.
6. Wu Z., Li Z., Yang J. Transient transgene transmission to piglets by intrauterine insemination of spermatozoa incubated with DNA fragments // Mol. Repr. Dev. – 2008. – 75. – P. 26–32.
7. Yang C.C., Chang H.S., Lin C.J. *et al.* Cock spermatozoa serve as the gene vector for generation of transgenic chicken (*Gallus gallus*) // Asian-Aust. J. Anim. – 2004. – 17(7) – P. 885–91.
8. Yonezawa T., Furuhashi Y., Hirabayashi K. *et al.* Detection of transgenic in progeny at different developmental stages following testis-mediated gene transfer // Mol. Repr. Dev. – 2001. – 60. – P. 196–201.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 615.837.3-7:599.323.4

В.М. Бухман¹, И.Б. Меркулова¹, Н.П. Ермакова¹, О.И. Коняева¹, Е.Л. Членова¹, Н.Ю. Кульбачевская¹, Т.В. Абрамова¹, А.А. Сергеев¹, Ю.Е. Чикунова¹, А.Л. Николаев², Л.М. Михайлова¹

**ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НА КРЫСАХ
ЛОКАЛЬНОГО УЛЬТРАЗВУКОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СРЕДНЕЙ ИНТЕНСИВНОСТИ,
ГЕНЕРИРУЕМОГО УСТАНОВКОЙ «УСДТ»**

¹РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Контактная информация

Бухман Владимир Михайлович, д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией фармакологии и токсикологии НИИ ЭДнТО

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.:** +7(495)324-22-44;

e-mail: bukhman@mail.ru

Статья поступила 28.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

В опытах на взрослых неинбредных крысах-самцах оценена потенциальная безопасность для пациентов и персонала ультразвукового воздействия, осуществляемого с помощью нового отечественного устройства для проведения сонодинамической терапии «УСДТ». Проводили 10-минутное озвучивание участка хвоста крыс (площадь 0,9 мм², 3–5 см от основания) с двух датчиков, генерирующих УЗ частотой 0,7 и 2,64 МГц с интенсивностью от 3 до 6 Вт/см². Использовали однократный сканирующий, трехкратный сканирующий и однократный направленный режим облучения в дозах от 13,5 до 81,0 КДж. Не выявлено влияния на организм животных группы «персонал». В отношении крыс группы «пациенты» не выявлено побочных эффектов при использовании терапевтического сканирующего режима с интенсивностью 3 Вт/см². Общетоксические явления не наблюдались ни в одном режиме. При использовании интенсивности >3 Вт/см² в сканирующем режиме и во всем интервале доз в направленном режиме развивалась локальная токсичность. Результаты проведенных опытов свидетельствуют о безопасности клинического применения устройства «УСДТ» для пациентов и персонала при использовании терапевтического сканирующего режима.

Ключевые слова: терапевтический ультразвук, аппарат для проведения сонодинамической терапии «УСДТ», доклиническая оценка безопасности, крысы.

V.M. Bukhman¹, I.B. Merkulova¹, N.P. Ermakova¹, O.I. Konyaeva¹, E.L. Chlenova¹, N.Yu. Kulbahevskaya¹, T.V. Abramova¹, A.A. Sergeev¹, Yu.E. Chikunova¹, A.L. Nikolaev², L.M. Mikhaylova¹

**TOXICOLOGICAL ESTIMATION ON RATS
OF LOCAL ULTRASONIC INFLUENCE OF THE AVERAGE INTENSITY GENERATED
BY THE EQUIPMENT «USDT»**

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

²M.V. Lomonosov Moscow State University

Abstract

Potential safety for patients and the personnel of the ultrasonic influence which is carried out by means of the new domestic device for carrying out sonodynamic therapy "USDT" is estimated in experiments on males adult outbred rats. The site of a rat's tail (the area 0,9 mm², 3–5 cm from the tail basis) was exposed to ultrasound generating from two transducers by frequency of 0.7 and 2.64 MHz with intensity from 3 to 6 W/cm² for 10 minutes. The unitary scanning, triple scanning and unitary directed regimens of an irradiation in doses from 13.5 to 81.0 kJ were used. We have not observed influences on an organism of animals of group "personnel". Concerning rats of group "patients" it is not taped side effects when we used therapeutic regimen of 3 W/cm² regimen. The all-toxic actions were not observed in used regimens. Local toxicity developed at intensity >3 W/cm² in scanning regimen and in all interval of doses at unitary directed regimen. The data obtained indicate that the application of device "USDT" is safety for patients and the personnel when used at a therapeutic scanning regimen.

Key words: therapeutic ultrasonic, "USDT" device, preclinical study, rats.

Введение

В настоящее время интенсивно разрабатывается возможность терапевтического использования УЗ в терапии онкологических пациентов. Возможность сфокусировать ультразвуковое облучение локально в солидном опухолевом узле позволяет достичь хорошего результата у многих пациентов. Предполагается, что развитие сонодинамической терапии приведет к повышению частоты полного выздоровления онкологических пациентов в ранних стадиях развития солидных опухолей с 80 до 100 % [4].

Сонодинамическая терапия является новым бурно развивающимся неинвазивным мультимодальным методом лечения онкологических пациентов с локальными новообразованиями, расположенными на различной глубине от поверхности кожи. В основу сонодинамической терапии положено синергичное действие УЗ и соносенсибилизирующих соединений.

В связи с этим имеется необходимость, с одной стороны, в усовершенствовании терапевтических УЗ-аппаратов, с другой – в разработке новых адекватных соносенсибилизаторов.

В этой работе мы сообщаем о результатах доклинического изучения потенциальной безопасности клинического применения нового разрешенного к производству, продаже и применению на территории РФ отечественного аппарата для сонодинамической терапии «УСДТ» [3].

Материалы и методы

Лабораторные животные

Использовали 300 здоровых половозрелых неинбредных крыс-самцов разведки питомника РОНЦ. Содержание животных и опыты на них проводились в соответствии с международными правилами. Животных содержали в специальных клетках по 5 особей при температуре воздуха 20–23 °С и относительной влажности 65 % в условиях искусственного освещения и принудительной вентиляции на подстилке из древесных стружек, стерилизованных в сушильном шкафу. Для кормления животных использовали стандартный промышленный сертифицированный корм с установленным сроком годности. Сырую питьевую воду, помещенную в закрытые поилки, крысы получали в неограниченном количестве.

Подопытных крыс делили на 3 группы:

- 1) «пациенты» – облучаются локально (центральный участок хвоста) в определенном режиме;
- 2) «персонал» – крысы находятся рядом с прибором 2 ч (во время облучения «пациентов»);
- 3) «контроль» – крысы находятся в другом помещении.

Прибор

Установка «УСДТ» представляет собой терапевтический ультразвуковой аппарат настольного типа. При необходимости он может быть установлен на передвижную роликовую платформу для удобства перемещения во внутрибольничных помещениях.

Терапевтическая эффективность установки обеспечивается сочетанным действием акустических колебаний двух частот (0,7 и 2,64 МГц). Акустическое поле в очаге поражения формируется сложением акустических полей отдельных облучателей, зафиксированных в матрице.

В сканирующем режиме воздействия равномерность суммарного акустического поля обеспечивается системой плоских облучателей, параллельно расположенных в матрице, или изменением угла взаимной ориентации облучателей.

УЗ воздействие

Крыс первой группы помещали в специальное фиксирующее устройство «домик», а УЗ воздействию подвергался только хвост животного, который опускали в ванну с водой.

УЗ был сфокусирован на участке площадью 0,9 мм² на расстоянии 3–5 см от основания хвоста. Во всех исследованиях использовали подводный метод УЗ, контактная среда – вода при температуре 34,5–35,0 °С., время УЗ во всех исследованиях 10 мин. Изученные режимы УЗ представлены в табл.

Таблица

Режимы УЗ при изучении безопасности аппарата «УСДТ»

Группы	Частота поля		НИ ¹	ЭИ ²	РВ ³	Т ⁴	Доза ⁵
	1	2					
	Мгц		Вт/см ²			мин	КДж
«пациент»	0,7	2,64	3,0	1,5	СО ⁶	10	13,5
	0,7	2,64	4,5	2,25	СО	10	20,25
	0,7	2,64	6,0	3,0	СО	10	27,0
	0,7	2,64	3,0	3,0	НО ⁷	10	27,0
	–	2,64	4,5	4,5	НО	10	40,5
	0,7	2,64	6,0	6,0	НО	10	54,0
	–	–	3,0	1,5	СТ ⁸	10×3	40,5
«персонал»	–	–	6,0	3,0	СТ	10×3	81,0
	–	–	–	–	О ⁹	120	–

¹НИ – номинальная интенсивность.

²ЭИ – эффективная интенсивность.

³РВ – режим воздействия.

⁴Т – время воздействия.

⁵Доза УЗ рассчитывается по формуле: Доза = ЭИ × площадь воздействия × Т.

⁶СО – сканирующий режим однократно.

⁷НО – направленный режим однократно.

⁸СТ – сканирующий режим трехкратно.

⁹О – однократно.

Оценка состояния животных

Проводилась в соответствии с методическими рекомендациями [2] и Административным регламентом изучения новой медицинской техники [1]. С помощью общепринятых функциональных и морфологических методик изучали локальную токсичность и общетоксическое действие. Исследования проводили на –1; 0; 1; 2; 7; 15 и 30 сутки после окончания воздействия. Следили за общим состоянием животных, количеством съеденного корма и выпитой воды, поведенческими реакциями. Последние включали тесты влияния на ЦНС. Степень возбудимости животных оценивали по уровню двигательной активности, агрессивности и пisku животных («вокализация»). Нервно-мышечную возбудимость оценивали по наличию спонтанного тремора, судорог и изменения мы-

шечного тонуса. Для выявления вестибулярных расстройств оценивали рефлексы «позы», «походки» (атаксия и другие нарушения). Вегетативные нарушения оценивали по величине зрачка (миоз, мидриаз), наличию или отсутствию экзофтальма, сосудистым изменениям. Для оценки болевого эффекта и функционального состояния нервной системы исследовали рефлекторную оборонительную реакцию крыс. Определяли массу и ректальную температуру тела животных; проводили клинический анализ крови: общий уровень лейкоцитов и формула крови, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, осмотическая резистентность эритроцитов. Выполняли стандартный биохимический анализ сыворотки крови с определением уровней: белка, альбумина, ЩФ, АЛТ, глюкозы, ЛДГ, билирубина, мочевины и креатинина.

Определяли диурез и выполняли клинический анализ мочи: цвет, рН мочи, белок, сахар, микроскопия осадка. Снимали ЭКГ, по которой оценивали частоту сердечных сокращений, время электросистолы – интервал QS, время полного сокращения и систолический показатель.

После окончания экспериментов по однократному и многократному УЗ воздействию животных умерщвляли. Вскрытие животных проводили сразу после умерщвления. Патоморфологическое исследование включало макроскопическое и гистологическое исследование внутренних органов и хвостов животных. Для гистологического исследования участки внутренних органов и хвоста от 3–5 крыс из каждой группы фиксировали в 10% нейтральном формалине и подвергали общепринятой гистологической обработке для получения парафиновых срезов толщиной 5–7 мкм. После депарафинирования срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Участки хвоста после фиксации в формалине и промывки в спиртах дополнительно подвергали декальцинации в 5 %-ной азотной кислоте.

Микроскопию проводили на микроскопе Carl Zeiss, Jena (Германия). Полученные патоморфологические данные от животных после однократного и многократного воздействия УЗ с помощью установки «УСДТ» сравнивали с данными контрольных животных.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003. За достоверные принимали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Не выявлено влияния на организм животных группы «персонал». УЗ не оказало общетоксического действия на организм крыс из групп «пациент» ни в одном из изучавшихся режимов.

Однако в некоторых режимах, УЗ сопровождалось макроскопическими и микроскопическими проявлениями локальной токсичности, описанными далее. Гистологическая картина поперечных срезов хвоста интактных животных показана на рис.1 (см. вклейку).

Сканирующий однократный режим

После применения УЗ интенсивностью 3 Вт/см² макроскопические изменения хвоста крыс в месте воздействия не выявлены как на 1, так и на 30 сутки. При гистологическом исследовании поперечных срезов хвостов крыс изменения структурных элементов хвоста – кожи, подкожной клетчатки, мышц, хряща и кости позвонков, стенки вен и артерий, сухожилий – не отмечены; морфологическая картина соответствует контролю (рис. 2а). Выраженная локальная токсичность обнаружена при гистологическом исследовании при интенсивности (И) >3 Вт/см² (рис. 2 Б–Д). Спустя 1 сутки после УЗ воздействия интенсивностью 4,5 и 6 Вт/см² у части крыс, в отличие от контрольных, отмечены изменения, которые выражались в отеке и мононуклеарной инфильтрации подкожной клетчатки; отеке, клеточной инфильтрации и деструкции пучков мышечных волокон, отрыве их от наружной соединительнотканной оболочки. Через 30 суток воспалительные изменения у большей части крыс исчезали; однако у единичных крыс обнаруживались участки мышц с признаками дистрофии, в некоторых артериях отмечено огрубение и отслаивание внутренней эластической мембраны, ее неравномерная извитость.

Направленный однократный режим

Через 1 сутки после применения УЗ интенсивностью 3 Вт/см² у 2 из 3 крыс при наружном осмотре хвоста в месте УЗ воздействия макроскопические изменения не выявлены.

У одной крысы на месте воздействия УЗ хвост был несколько утолщен. Через 1 сутки после применения УЗ интенсивностью 4,5 Вт/см² у всех крыс были отмечены макроскопические изменения в месте УЗ воздействия и рядом с ним в виде ярко-красных подкожных пятен.

У всех крыс обнаружены по 4 пятна, расположенные на некотором расстоянии друг от друга. На месте УЗ воздействия отмечали мацерацию кожи, отек и отсутствие волос. Сосуды хвоста были инъецированы.

Через 1 сутки после применения направленного УЗ интенсивностью 6 Вт/см² у всех крыс в месте УЗ воздействия и рядом с ним обнаруживались подкожные кровоизлияния в виде красных и синих пятен. Отек тканей хвоста не был выражен, сосуды инъецированы, целостность кожи не нарушена.

При гистологическом исследовании поперечных срезов хвоста в этот срок после однократного направленного воздействия УЗ интенсивностью 3 Вт/см² у животных отмечали умеренную воспалительную реакцию в подкожной клетчатке, выражавшуюся в отеке, несильной мононуклеарной инфильтрации, расширении и полнокровии вен; у одной крысы отмечали периваскулярное кровоизлияние (рис. 3. а, б).

При увеличении интенсивности УЗ до 4,5 и 6 Вт/см² у всех животных были отмечены деструктивные и воспалительные изменения различной степени: отек кожи, подкожной соединительной ткани, выраженная мононуклеарная инфильтрация, гиперемия и красные тромбы в венозных сосудах, очаговая деструкция и дистрофия мышечных волокон, в цитоплазме некоторых макрофагов обнаруживались фагоцитированные обломки клеток.

У отдельных крыс наблюдали повреждение и десквамацию эпидермиса, скопление под ним серозно-фибринозного экссудата (рис. 3. В–Е). К 30 суткам у части крыс отмеченные изменения различной степени выраженности сохранялись.

УЗ–воздействие в данном режиме вызывает выраженную локальную дозо-зависимую токсичность во всем, изученном интервале И.

Сканирующий трехкратный режим

Наружный осмотр хвоста крыс на 1 и 30 сутки после воздействия УЗ в 3-кратном сканирующем режиме не выявил признаков повреждения в хвосте крыс на месте воздействия.

При гистологическом исследовании поперечных срезов хвоста крыс через 1 и 30 суток после окончания 3-кратного применения УЗ интенсивностью 3 Вт/см² макроскопические изменения в структурных элементах хвоста – кожи, подкожной клетчатки, мышц, хряща и кости позвонков, стенки артерий и вен, сухожилий не выявлены.

При гистологическом исследовании морфологическая картина аналогична таковой у крыс контрольной группы и крыс после однократного УЗ воздействия интенсивностью 3 Вт/см².

При увеличении интенсивности УЗ до 6 Вт/см² при 3-кратном применении через 1 сутки у всех 5 крыс хвост в месте воздействия УЗ был бочковидно утолщен, отечен; у одной крысы обнаружено подкожное кровоизлияние в виде красного пятна.

Через 30 суток после 3-кратного применения УЗ интенсивностью 3 Вт/см² утолщение хвоста сохранялось лишь у одной крысы из 5, а после применения УЗ интенсивностью 6 Вт/см² в том же режиме наблюдалось у 4 из 5 крыс. У контрольных крыс изменения хвоста отсутствовали.

При гистологическом исследовании поперечных срезов хвоста через 1 сутки после окончания 3-кратного применения УЗ интенсивностью 6 Вт/см² в хвосте в месте воздействия УЗ отмечены изменения, сходные с однократным применением УЗ интенсивностью 4,5 и 6 Вт/см², которые выражались в отеке и клеточной инфильтрации подкожной клетчатки и пучков мышечных волокон; в последних наблюдались признаки разобщения и деструкции. Через 30 суток отмеченные выше изменения у большей части крыс исчезали, а у единичных были минимальными.

Таким образом, УЗ воздействие высокой интенсивности аппаратом «УСДТ» приводит к развитию локальных изменений в тканях хвоста, вызывая воспалительные и деструктивные изменения в подкожной соединительной ткани и мышцах.

В наших опытах 10-минутное озвучивание хвоста крыс в сканирующем однократном терапевтическом режиме при $I = 3 \text{ Вт/см}^2$ не сопровождалось развитием местных токсических эффектов. Во всех остальных изученных режимах наблюдались выраженные локальные изменения, наиболее выраженные и длительные при однократном прямом воздействии УЗ, генерируемого установкой «УСДТ». Однако ни в одном из использованных режимов облучение участка хвоста крыс не сопровождалось общетоксическим действием. Не выявлено также какого-либо токсического действия на крыс, находившихся рядом с работающей установкой «УСДТ». Таким образом, при использовании установки «УСДТ» безопасным является сканирующий режим УЗ с интенсивностью 3 Вт/см².

Заключение

Результаты доклинического изучения на крысах показывают, что терапевтический аппарат «УСДТ» потенциально безопасен для пациентов и персонала при соблюдении рекомендаций и правил в соответствии с принципами действия УЗ прибора.

Литература

1. Административный регламент федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по регистрации изделий медицинского назначения. <http://www.medexpert.ru/document/registration/25/>
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/Под ред. Хабриева Р.У. – Издание второе, переработанное и дополненное. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения и социального развития. Федеральное государственное учреждение Научный Центр Экспертизы Средств Медицинского Применения. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
3. Установка ультразвуковой сонодинамической терапии «УСДТ». Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05174 от 30 июня 2009 г.
4. Myhr G. Multimodal cancer treatment: real time monitoring, optimization, and synergistic effects // Technol Cancer Res Treat. – 2008 – 7(5) – P. 409–14.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616-006.81-08:615.371/.372

*И.В. Манина, Н.М. Сапрыкина, А.М. Козлов, И.Н. Михайлова, И.Н. Григорьева, Н.Н. Касаткина, А.Ю. Барышников***ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНОЙ GM-CSF-СЕКРЕТИРУЮЩЕЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ
ПУТЕМ ПРЕИНКУБАЦИИ С ЦИТОКИНАМИ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация***Манина Ирина Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной терапии метастазов НИИ ЭДнТО*

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел. +7(499)612-80-08

e-mail: ira-bio@yandex.ru

Статья поступила 25.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

На экспериментальной модели меланомы B16 F10 мышей *in vivo* изучена возможность повышения эффективности биотерапии с помощью цельноклеточной противоопухолевой GM-CSF-секретирующей вакцины путем преинкубации клеток вакцины в присутствии цитокинов. При культивировании клеток меланомы в присутствии INF- γ резко повышается экспрессия MHC I и II классов. Вакцины, полученные на основе модифицированных геном GM-CSF-клеток, после их преинкубации в среде, содержащей INF- γ в концентрации 10 нг/мл и времени экспозиции 48 ч, оказывают более выраженное профилактическое и терапевтическое действие. При сочетании применения биотерапии на основе GM-CSF-секретирующих клеток, инкубированных в присутствии INF- γ , и хирургическом удалении первичного опухолевого узла отмечен наилучший терапевтический эффект. Полученные результаты создают предпосылки для оптимизации режимов проведения вакцинотерапии в клинической практике.

Ключевые слова: меланома, биотерапия, цельноклеточная противоопухолевая GM-CSF-секретирующая вакцина, IFN- γ , TNF- α .

*I.V. Manina, N.S. Saprikina, A.M. Kozlov, I.N. Mikhaylova, I.N. Grigorieva, N.N. Kasatkina, A.Y. Barishnikov.***THE INCREASING OF GM-CSF PRODUCED VACCINE
EFFICIENCY BY INHIBITION
THE CELLS WITH CYTOKINES***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

We have studied the effect of incubation of GM-CSF-produced vaccine with different cytokines in order to increase the efficiency of antitumor response. Here we show that after cultivation of melanoma cells with INF- γ the expression of MHC I and II classes considerably increases. The incubation of vaccine with INF- γ at the concentration 10 ng/ml for 48 hours has more expressed preventive and therapeutic effects. The therapeutic effect was more effective if we combined the surgical resection of primary tumor with biotherapy based on GM-CSF-produced vaccine. The data obtained allow to optimize the regimen of vaccinotherapy in clinical practice.

Key words: melanoma, biotherapy, antitumor cell-whole GM-CSF-produced vaccine, IFN- γ , TNF- α .

Введение

Опыт клинического применения GM-CSF-секретирующих вакцин из транзитивно трансфицированных аутологичных опухолевых клеток пациентов подтвердил эффективность такого вида биотерапии опухолей человека [3; 6; 9; 10].

Одной из главных причин малой эффективности противоопухолевых цельноклеточных вакцин является низкая иммуногенность самих опухолевых клеток. Плохое распознавание опухолевых клеток Т-лимфоцитами происходит вследствие неадекватной презентации антигенов [1; 2]. Злокачественная трансформация меланоцитов и опухолевая прогрессия часто ассоциируется с потерей антигенов MHC [8].

Данные, свидетельствующие об увеличении экспрессии MHC под действием INF- γ , известны [12; 15]. INF- γ повышает экспрессию антигенов MHC I и II классов на разных клетках и может индуцировать их экспрессию на тех клетках, которые не экспрессируют MHC конститутивно, что делает опухоль

более чувствительной к эффекторам иммунной системы [13]. Тем самым INF- γ повышает эффективность презентации антигенов и способствует их распознаванию Т-лимфоцитами [14].

Таким образом, восстановление экспрессии комплексов MHC на поверхности опухолевых клеток имеет принципиальное значение для реализации нормального противоопухолевого иммунного ответа [17]. Представляется необходимым контролировать экспрессию ОАА и антигенов MHC I и II классов в опухолевых клетках для приготовления на их основе аутологичных и аллогенных вакцин, а в случае аллогенных вакцин вести отбор клеточных линий, стабильно продуцирующих соответствующие опухолеассоциированных антигены [7].

Несмотря на обилие работ, посвященных способам повышения эффективности биотерапии, данная проблема остается по-прежнему актуальной [5; 11]. В ходе настоящего исследования апробирован метод повышения иммуногенности цельноклеточных противоопухолевых вакцин *in vitro* с помощью преинкубации клеток с цитокинами IFN- γ и TNF- α .

Материалы и методы

Исследование выполнено на мышах линии C₅₇Bl/6, самцах массой 22–25 г. в количестве до 2000 особей (полученные из питомника лабораторных животных РАМН «Столовая»). Для индукции развития меланомы вводили 1×10^5 клеток B16F10 мышей, которые по своему иммунофенотипу наиболее полно воспроизводят модель меланомы человека [16;18]. Формирующиеся опухоли измеряли дважды в неделю, объем опухоли определяли по формуле:

$$V = D_{\max} \times D_1 \times \left(\frac{D_{\max}}{2}\right), \text{ где}$$

D_{\max} равен максимальному диаметру опухоли,
 D_1 – диаметру, перпендикулярному максимальному.

Для вакцинотерапии использовали облученные на источнике γ -излучения Агат-Р с применением ^{60}Co (в дозе 100 Гр) клетки меланомы B16F10, секретирующий GM-CSF клон BG. При иммунизации каждой мыши вводили подкожно 1×10^6 клеток. Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе в стандартных условиях в среде DMEM (ПанЭко, РФ) с добавлением 10 %-ной телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС, производство NuClone, USA), 10 мг/мл гентамицина (ПанЭко, РФ) при 37 °C и 5% CO_2 . Смену культуральной среды проводили каждые 48 ч. При достижении монослоя 50 % при смене культуральной среды вводили исследуемый цитокин: рекомбинантный мышинный INF- γ (кат № 315-05, PetroTech Inc., USA) или рекомбинантный мышинный TNF- α (кат № 315-01A, PetroTech Inc., USA). Кривокопсервацию проводили в жидком азоте.

Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли и динамике продолжительности жизни мышей, антиметастатический – по массе и количеству метастатических колоний в легких в соответствие со стандартными методиками. Первичные опухоли (достигшие размера 700–1000 мм³) у животных удаляли хирургическим способом на фоне гексеналового наркоза (100 мг/кг, однократно, внутривенно).

Оценку уровня экспрессии антигенов МНС I и МНС II проводили проточно-цитофлуориметрическим методом на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером (длина волны 488 нм), с использованием программного обеспечения CELLQuest.

Результаты и обсуждение

Жизнеспособность клеток, культивированных 12 и 24 ч в присутствии INF- γ при концентрации 5 и 10 нг/мл культуральной среды не отличалась от контроля (количество погибших клеток составило менее 5 %). Было отмечено, что присутствие INF- γ в среде значительно повышает способность клеток к дифференцировке: выявлено выраженное увеличение гиперпигментированных гранулосодержащих клеток, снижение количества делящихся клеток. На рис. 1. (см. вклейку) представлены результаты обзорной микроскопии клеток GM-CSF-секретирующего клона BG, культивированные 48 ч в присутствии INF- γ (концентрация 10 нг/мл культуральной среды), по сравнению с контролем на рис. 2. Морфологические свойства клеток, культивированных в присутствии TNF- α при концентрации 25; 50; 100 нг/мл культуральной сре-

ды по описанной ранее методике при 12–; 24– и 48– часовом режиме не менялись. При культивировании в присутствии TNF- α в концентрации 100 нг/мл культуральной среды в течение 12 ч гибель клеток составила более 30 %. Данная концентрация в ходе дальнейших экспериментов не применялась в связи с выраженным цитотоксическим эффектом.

Преинкубация клеток B16 F10 клон BG в течение 48 ч в среде, содержащей INF- γ в концентрации 5 нг/мл повышала экспрессию МНС II до 14 %, а в концентрации 10 нг/мл – до 16 %. Время инкубации имело принципиально важное значение: 24-часовая инкубация была не эффективна. TNF- α оказывал гораздо менее выраженное влияние на экспрессию клетками B16F10 клон BG антигенов МНС II класса. При определении экспрессии МНС I класса было обнаружено выраженное влияние INF- γ . При культивировании клеток в присутствии INF- γ в течение 48 ч (в концентрации 5 нг/мл и 10 нг/мл) экспрессия МНС I достоверно увеличилась на 92 и 97 % соответственно ($p < 0,05$). При культивировании клеток в присутствии TNF- α в концентрации 50 нг/мл в течение 48 ч выявлено увеличение экспрессии только в 10 раз по сравнению с контрольной группой. Данные представлены в виде диаграмм на рис. 3–4.

Оценку эффекта биотерапии проводили в профилактическом (вакцину вводили животным за 5–7 суток до трансплантации опухолей) и терапевтическом (вакцину вводили через 5–7 суток после трансплантации опухолей) режимах. В качестве сравнения применялась цельноклеточная противоопухолевая вакцина, приготовленная по аналогичной технологии без добавления цитокинов в среду (интактная).

В ходе проведения данных экспериментов было выявлено появление инфильтратов на месте введения вакцины. Данный процесс отражает индукцию иммунной реакции на месте введения вакцины по типу ГЗТ и степень ее выраженности, что свидетельствует об иммуногенности вакцины [4]. Динамика их появления и размеры были более выражены в группе животных, получавших INF- γ – модифицированную вакцину.

Выявлено ингибирующее действие вакцины на развитие опухолей на месте трансплантации опухолевых клеток. Средняя продолжительность жизни животных группы, получавших INF- γ модифицированную *in vitro* цельноклеточную секретирующую GM-CSF вакцину, составила $53,1 \pm 3,0$ суток, а увеличение продолжительности жизни на 78 % (95 %-ный ДИ $69,9 \div 86,1$), достоверность различий с контрольной группой $p < 0,05$. Средняя продолжительность жизни животных группы, получавших интактную цельноклеточную секретирующую GM-CSF вакцину, составила $46,6 \pm 4,5$ суток, а увеличение продолжительности жизни на 57 % (95 %-ный ДИ $47,3 \div 66,7$). Средняя продолжительность жизни животных контрольной группы составила $29,7 \pm 4,0$ суток.

На 52 сутки после трансплантации опухолевых клеток и при вакцинации по заявляемому способу роста опухоли не наблюдалось у 72 % животных (95 %-ный ДИ $63,2 \div 80,8$), достоверность различий с контрольной группой $p < 0,05$. При вакцинации с использованием интактной цельноклеточной секретирующей GM-CSF вакцины роста опухоли не выявлено у 50 % животных (95 %-ный ДИ $40,2 \div 59,8$). В контрольной группе отмечена 100 % гибель животных в связи с прогрессией опухолевого роста. С целью контроля воспроизводимости результатов проведена серия опытов по схожим схемам, в которых получены идентичные данные.

Эффективность профилактического применения вакцин выразилась и в значительном увеличении средней продолжительности жизни вакцинированных животных по сравнению с контрольными. По этому клинически значимому критерию применение INF- γ модифицированной GM-CSF-секретирующей вакцины было также наиболее эффективным.

Сравнительная оценка эффективности интактной, модифицированной с помощью INF- γ и модифицированной с помощью TNF- α цельноклеточной GM-CSF-секретирующей противоопухолевой вакцины, представлена в виде диаграмм на рис. 5; 6. Показано достоверное увеличение УПЖ ($p > 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных, которым не проводили профилактическую вакцинотерапию.

Терапевтическое применение интактной и модифицированной преинкубацией в среде, содержащей цитокины (TNF- α или INF- γ), GM-CSF-секретирующей вакцины в режиме монотерапии не оказывает влияния на продолжительность жизни мышей с развившимся опухолевым процессом.

Это может быть связано с множеством факторов, в том числе развитием большой опухолевой массы. У всех животных, получавших разные виды GM-CSF-секретирующей противоопухолевой вакцины, отмечено появление выраженных инфильтратов на месте вакцинации, что свидетельствует о развитии реакции по типу ГЗТ [4].

Цель заключительного этапа состояла в попытке скомпоновать рациональную схему сочетанного применения противоопухолевой вакцины (модифицированной *in vitro* преинкубацией с цитокинами) и ХТ. В работе использованы циклофосфамид в дозе 350 мг/кг однократно и цисплатин в дозе 8 мг/кг однократно. Циторедуктивное действие высокодозной ХТ сопряжено с выраженной, а зачастую тотальной иммуносупрессией. Для коррекции этого побочного эффекта ХТ в схему включена трансплантация КМ. Данные представлены в табл. На основании полученных результатов показано, что комбинированная терапия не превысила эффективности цитостатика в режиме монотерапии по отношению к росту первичного опухолевого узла. Сочетанное применение высокодозной химиотерапии, вакцинотерапии с применением модифицированной преинкубацией *in vitro* в присутствии цитокинов INF- γ и TNF- α цельноклеточной противоопухолевой GM-CSF-секретирующей вакцины и биотерапии (внутривенном введении 1×10^6 клеток костного мозга, полученных от сингенных интактных животных) по сравнению с проведением высокодозной химиотерапии в режиме монотерапии оказывало умеренный терапевтический эффект, достоверно отличающийся от контрольной группы животных, $p < 0,05$; от группы животных с проведенной трансплантацией костного мозга в режиме монотерапии, $p < 0,05$. Выявлено превосходство INF- γ модифицированной вакцины.

Таблица

Влияние сочетанного применения циклофосфамида и вакцинотерапии на продолжительность жизни мышей с подкожно привитой меланомой B16F10 и торможение развития опухоли

Воздействие	СПЖ, дни	УПЖ, %	ТРО, % на 20 сутки опыта
Контроль	22,7 \pm 3,5	–	11591,6 \pm 3563,19 ^{***}
Вакцина TNF- α	19,5 \pm 3,8	–15	6 95 % ДИ (1,3 \div 10,7)
Вакцина INF- γ	27,9 \pm 3,7	23 95 % ДИ (14,8 \div 31,2)	10 95 % ДИ (4,1 \div 15,9)
Циклофосфамид + КМ	34,6 \pm 4,2	52 ^{*,**} 95 % ДИ (42,2 \div 61,8)	82 ^{*,**} 95 % ДИ (73,3 \div 88,7)
Циклофосфамид + КМ + вакцина INF- γ	40,9 \pm 3,2	80 ^{*,**} 95 % ДИ (72,2 \div 87,8)	84 ^{*,**} 95 % ДИ (76,8 \div 91,2)
Циклофосфамид + КМ + вакцина TNF- α	29,7 \pm 4,3	31 ^{*,**} 95 % ДИ (21,9 \div 40,1)	78 ^{*,**} 95 % ДИ (69,9 \div 86,1)
Циклофосфамид	42,4 \pm 6,1	87 ^{*,**} 95 % ДИ (80,4 \div 93,6)	84 ^{*,**} 95 % ДИ (76,8 \div 91,2)
КМ	23,4 \pm 4,4	3 95 % ДИ (0 \div 6,3)	+21

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой;

** $p < 0,05$ по сравнению с группой животных с проведенной трансплантацией КМ режиме монотерапии;

***для контрольной группы указан размер опухоли в мм³.

Однако применение цитостатиков в режиме высокодозной монотерапии было не достаточно эффективным в отношении процесса метастазирования опухоли в легкие. У 43 % мышей, получавших циклофосфамид, и у 57 % получавших цисплатин ($p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой) в режиме монотерапии развились метастазы. В то же время при оценке влияния комбинированной терапии отмечена некоторая тенденция повышения антиметастатической активности.

На фоне хирургического удаления первичного опухолевого узла применение GM-CSF модифицированной противоопухолевой вакцины повышает эффект терапии в отношении метастазов меланомы в легкие. Эксперименты по сравнительной оценке эффективности биотерапии с использованием цельноклеточной противоопухолевой GM-CSF-секретирующей

модифицированной вакцины, преинкубированной *in vitro* с INF- γ , и интактной вакцины выявили преимущество INF- γ -модифицированной вакцины. Максимально эффективным оказался режим вакцинации, предполагающий двукратное введение вакцины (за 5 дней до и 5 дней после хирургического удаления первичного опухолевого узла). Индекс ТРО составил 37 % ($p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой) в режиме послеоперационной вакцинации и 43 % ($p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой) в режиме двукратной вакцинации. Однократная предоперационная вакцинация животных не приводила к достоверному снижению интенсивности метастазирования. Результаты типичного эксперимента, выполненного с целью оценки терапевтической активности модифицированной *in vitro* INF- γ цельноклеточной GM-CSF секретирующей вакцины, представлены на рис. 7.

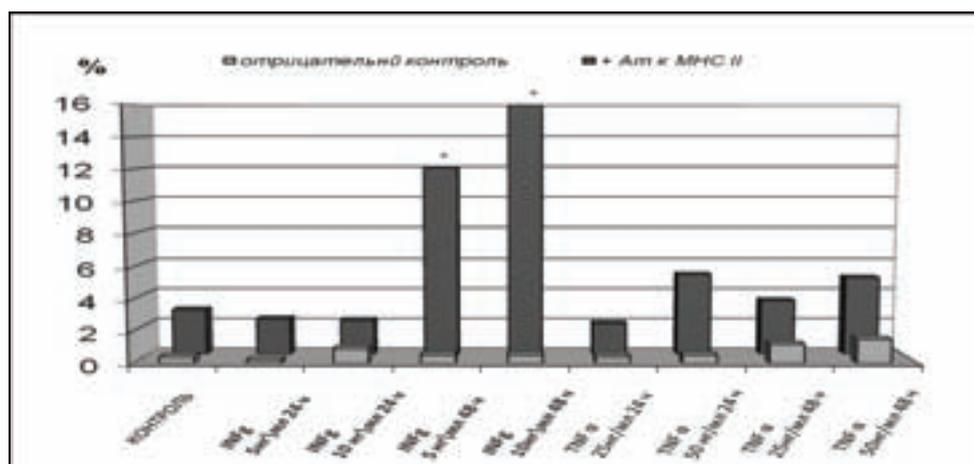


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии МНС II на клетках меланомы мышей B16 F10, модифицированных геном GM-CSF (клон BG), при разных режимах культивирования в присутствии цитокинов *in vitro*. (* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой).

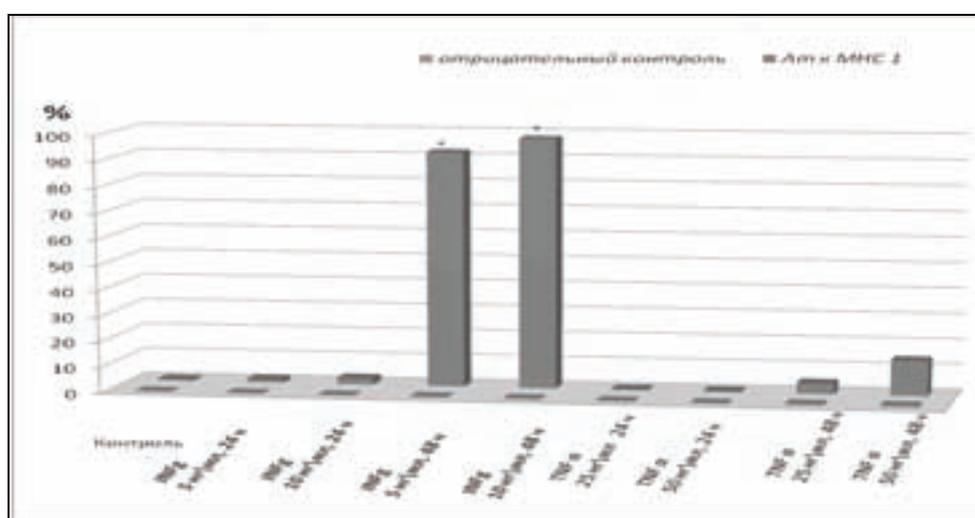


Рис. 4. Изменение уровня экспрессии МНС I на клетках меланомы мышей B16 F10, модифицированных геном GM-CSF (клон BG), при разных режимах культивирования в присутствии цитокинов *in vitro*. (* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой).

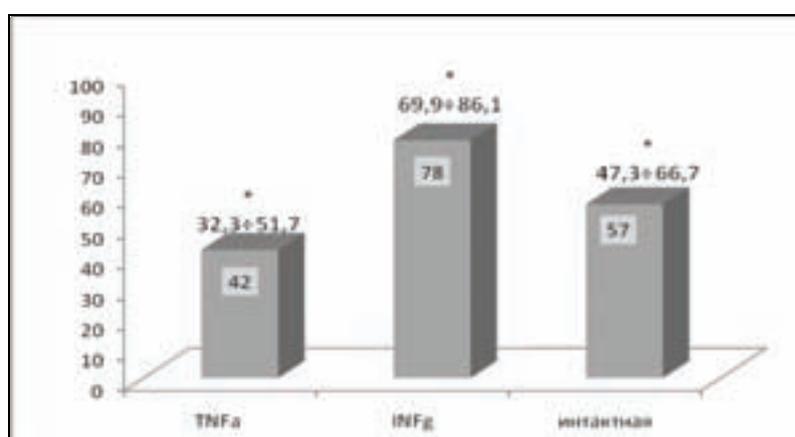


Рис. 5. Увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) животных с меланомой B16F10, вакцинированных в профилактическом режиме интактной, модифицированной с помощью INF- γ и модифицированной с помощью TNF- α цельноклеточной GM-CSF секретирующей противоопухолевой вакциной. (* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой).

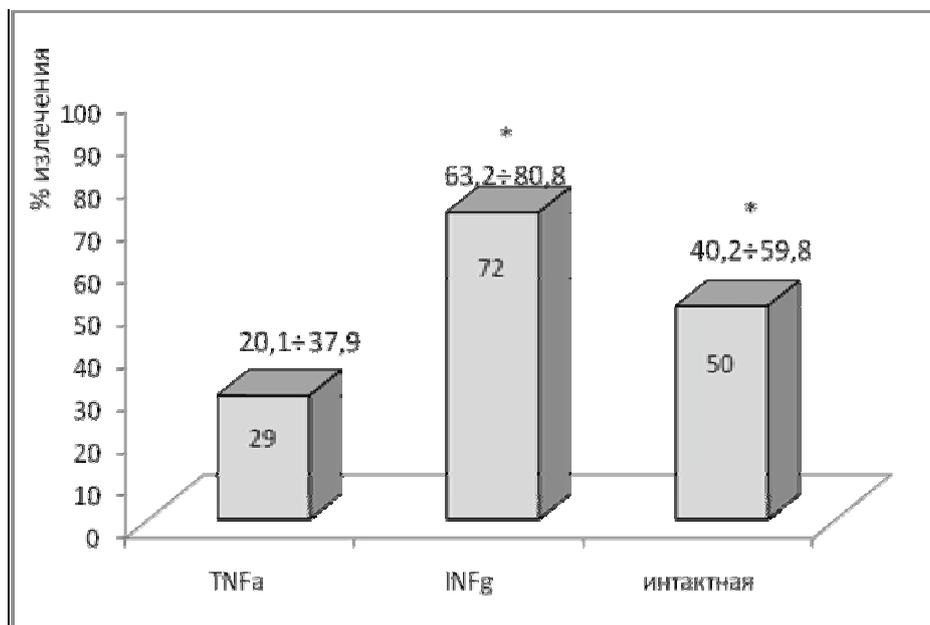


Рис. 6. Частота «излечения**» животных (%) с меланомой, вакцинированных в профилактическом режиме интактной, модифицированной с помощью INF-γ и модифицированной с помощью TNF-α цельноклеточной GM-CSF секретирующей противоопухолевой вакциной.

* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой;

**«излечение» – отсутствие роста опухоли на месте трансплантации опухолевых клеток на фоне профилактического применения вакцины.

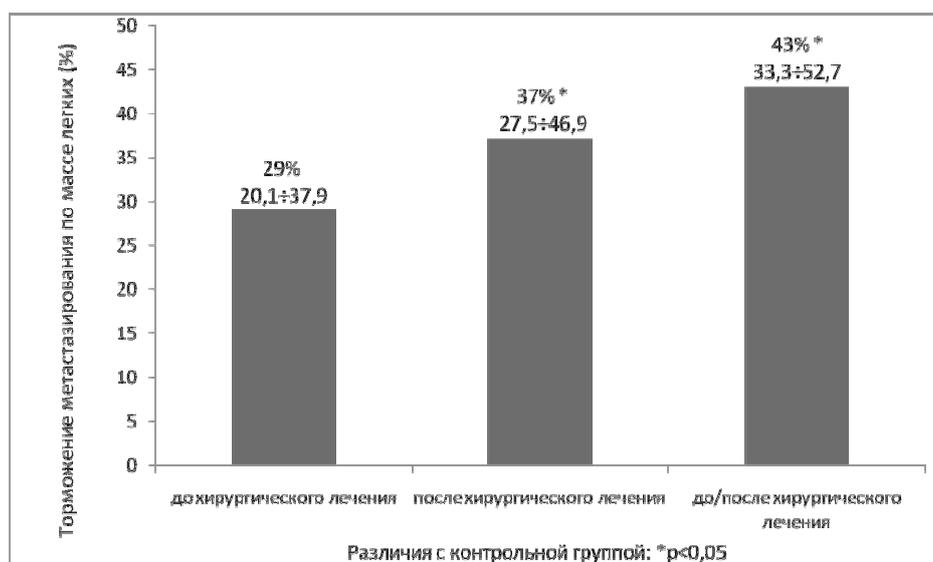


Рис. 7. Антиметастатическая активность цельноклеточной противоопухолевой модифицированной INF-γ *in vitro* вакцины (при разных режимах введения) на фоне хирургического удаления первичного опухолевого узла.

Выводы

1. Повышение экспрессии антигенов МНС клетками противоопухолевой вакцины при их инкубации с INF- γ *in vitro* приводит к повышению эффективности цельноклеточной противоопухолевой GM-CSF секретирующей вакцины.
2. Для повышения экспрессии МНС необходима инкубация опухолевых клеток в среде, содержащей INF- γ , в течение длительного времени. Максимальный уровень экспрессии отмечен при концентрации 10 нг/мл среды в течение 48 ч. Менее продолжительная инкубация при той же концентрации не вызывает достаточного увеличения экспрессии МНС.
3. Вакцины, полученные на основе модифицированных геном GM-CSF клеток, после их преинкубации в среде, содержащей оптимальную концентрацию INF- γ и достаточное время экспозиции, оказывают значительно более выраженное профилактическое и терапевтическое действие.
4. При сочетанном применении биотерапии на основе GM-CSF-секретирующих клеток, инкубированных в присутствии INF- γ *in vitro*, и хирургическом удалении первичного опухолевого узла отмечен наилучший терапевтический эффект. Эти результаты создают предпосылки для оптимизации режимов проведения вакцинотерапии в клинической практике.

Литература

1. Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2004. – Т. 2. – С. 59–63.
2. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей // Вестник Московского онкологического общества. – 2008. – Т. 1. – С. 6–10.
3. Бережной А.Е., Сапрыкина Н.С., Ларин С.С. и др. Изучение противоопухолевой активности вакцин на основе генетически модифицированных опухолевых клеток, секретирующих GM-CSF // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 47–53.
4. Михайлова И.Н., Иванов П.В., Петренко Н.Н. и др. Внутрикожная клеточная реакция на фоне вакцинотерапии меланомы кожи // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2010. – №1. – С. 63–7.
5. Мусеенко В.М., Балдуева И.А. Проблемы иммунологии опухолевого роста и возможности вакцинотерапии // Медицинский академический журнал. – 2007. – Т. 7, № 4. – С. 17–35.
6. Borrello I., Pardoll D. GM-CSF-based cellular vaccines: a review of the clinical experience // Cytokine Growth Factor Rev. – 2002. – 13. – P. 185–93.
7. Gambari R., Barbieri R., Piva R. et al. Regulation of the expression of class II genes of the human major histocompatibility complex in tumor cells // Ann N Y Acad Sci. – 1987. – 511. – P. 292–307.
8. Garrido C., Algarra I., Maleno I. et al. Alterations of HLA class I expression in human melanoma xenografts in immunodeficient mice occur frequently and are associated with higher tumorigenicity // Cancer Immunol Immunother. – 2010. – 59(1). – P. 13–26.
9. Hege K.M., Joss K., Pardoll D. GM-CSF gene-modified cancer cell immunotherapies: of mice and men // Int Rev Immunol. – 2006. – 25. – P. 321–52.
10. Li B., Simmons A., Du T. et al. Allogeneic GM-CSF-secreting tumor cell immunotherapies generate potent anti-tumor responses comparable to autologous tumor cell immunotherapies // Clin Immunol. – 2009. – Nov. – 133(2). – P. 184–97.
11. Machiels J.P., Reilly R.T., Emens L.A. et al. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice // Cancer Res. – 2001. – 61. – P. 3689–97.
12. Propper D.J., chao D., braybrooke J.P. et al. low-dose ifn-gamma induces tumor mhc expression in metastatic malignant melanoma // clin cancer res. – 2003. – 9(1). – p. 84–92.
13. Rodríguez T., Méndez R., Del Campo A. et al. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines // BMC Cancer. – 2007. – 23 Feb. – P. 7–34.
14. Rodríguez T., Méndez R., Del Campo A. et al. Patterns of constitutive and IFN-gamma inducible expression of HLA class II molecules in human melanoma cell lines // Immunogenetics. – 2007. – 59(2). – P. 123–33.
15. Rosa F.M., Fellous M. Regulation of HLA-DR gene by IFN-gamma. Transcriptional and post-transcriptional control // J Immunol. – 1988. – 1 Mar. – 140(5). – P. 1660–4.
16. Seliger B., Wollscheid U., Momburg F. et al. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells // Cancer Res. – 2001. – 61(3). – P. 1095–9.
17. Whitley E.M., Bird A.C., Zucker K.E., Wolfe L.G. Modulation by canine interferon-gamma of major histocompatibility complex and tumor-associated antigen expression in canine mammary tumor and melanoma cell lines // Anticancer Res. – 1995. – 15(3). – P. 923–9.
18. Willem W., Overwijk N., Restifo P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma // Curr Protoc Immunol. – 2009. – 20(1). – P. 1–33.

УДК 616.72-002.77-085:576.353.4

*А.В. Безгин, Л.А. Князева***ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕРАПИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА В СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ И КЛИНИЧЕСКУЮ СИМПТОМАТИКУ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЗИТИВНОСТИ ПО РЕВМАТОИДНОМУ ФАКТОРУ***Курский государственный медицинский университет***Контактная информация***Безгин Артем Вячеславович, канд. мед. наук, ассистент кафедры внутренних болезней №1*

Адрес: 305051, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3; тел. +7(919)271-62-32

e-mail: kafedra_n1@bk.ru

Статья поступила 03.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

В статье проведена оценка показателей цитокинового статуса в синовиальной жидкости у 74 больных РА. Установлены отличия в содержании ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α и ВЭФР-А в синовиальной жидкости больных в зависимости от позитивности по РФ. У серопозитивных по РФ пациентов преобладало содержание ИЛ-1 β и ВЭФР-А, при серонегативном РА – ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-8. Определена большая эффективность влияния инфликсимаба на исследуемые показатели при серонегативном по РФ варианте РА.

Ключевые слова: цитокины, васкулоэндотелиальный фактор роста-А, ревматоидный артрит, инфликсимаб.*A.V. Bezgin, L.A. Knyazeva***THE INFLUENCE OF TREATMENT ON THE LOCAL IMMUNE STATUS AND CLINICAL PICTURE IN DIFFERENT SEROLOGICAL SUBTYPES OF RHEUMATOID ARTHRITIS***State Medical University, Kursk***Abstract**

The cytokines status in the synovial liquid of the 74 RA patients was performed in this article. It was estimated the differences between the concentrations of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) in the synovial liquid of RA patients, according to the serological subtypes RF. The higher concentrations of IL-1 β and VEGF-A were observed in seropositive patients. The seronegative variant of RA was characterised by increased levels of TNF- α , IL-6, IL-8. Moreover, the efficacy of infliximab therapy was more distinguished in the patients with seronegative RA.

Key words: cytokines, vasculoendotheliae growth factor-A, infliximab, rheumatoid arthritis.**Введение**

РА является одним из самых тяжелых заболеваний человека и представляет серьезную медико-социальную проблему из-за прогрессирующего характера течения, приводящего к быстрому развитию инвалидности вследствие функциональной недостаточности суставов. Так в первые 3 года болезни трудоспособность утрачивают около 35 % больных, а через 5 лет – более половины. При этом продолжительность жизни больных примерно на 7–10 лет меньше популяционной [4; 5].

Известно, что основным принципом лечения РА является применение БПВП, от эффективности действия которых напрямую зависит прогноз заболевания. Следует отметить, что на стандартную терапию БПВП удовлетворительно отвечают не более 50 % больных [6]. Внедрение в клиническую практику нового класса БПВП, – ГИБП – коренным образом изменило сложившуюся ситуацию, поскольку значительно расширило терапевтические возможности, сделало достижимым торможение эрозивного процесса в суставах и ремиссию заболевания [2]. Известно, что ГИБП – инфликсимаб – уже более 10 лет применяется в лечении ревматологических заболеваний, в том числе РА. Однако результаты оценки эффективности применения инфликсимаба при РА неоднозначны, имеются сведения, что примерно

половина больных недостаточно реагирует на лечение ингибиторами ФНО- α , что во многом обусловлено гетерогенностью патогенетических механизмов и вариантов течения РА [11]. Данные положения обосновывают необходимость проведения исследований по выявлению особенностей патогенетических механизмов при РА, уточнение которых будет способствовать индивидуализации и повышению эффективности назначаемой терапии.

Цель работы – изучение содержания в синовиальной жидкости цитокинов провоспалительного действия (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α), васкулоэндотелиального фактора роста – А (ВЭФР-А) у больных ревматоидным артритом в зависимости от позитивности по ревматоидному фактору (РФ) и их динамики под влиянием терапии инфликсимабом и метотрексатом.

Материалы и методы

На базе ревматологического отделения областной клинической больницы г. Курска обследовано 74 пациента, страдающих РА с умеренной и высокой активностью; длительность заболевания колебалась от 6 мес. до 7 лет.

Средний возраст больных составил 48,2 \pm 6,5 года. Группа контроля включала 20 здоровых доноров.

Критерии включения в исследование:

- РА 2–3 степени активности, (DAS 28 > 3,2);
- наличие показаний и отсутствие противопоказаний к применению БПВП;
- пациенты, получавшие в качестве БПВП метотрексат и инфликсимаб;
- наличие информированного согласия пациента о включении в исследование.

Критерии исключения пациентов из исследования:

- РА 1 степени активности;
- инфекционные процессы любой локализации.

Диагноз ревматоидного артрита устанавливался в соответствии с критериями Американской Коллегии Ревматологов (ACR, 1987 г.). Количественная оценка активности РА проводилась с использованием индекса DAS 28 (Disease Activity Score), рекомендованного EULAR. Оценка эффективности терапии проводилась на основании анализа динамики клинической симптоматики РА по критериям EULAR и ACR. Определение показателей цитокинового статуса, ВЭФР-А в синовиальной жидкости проводилась до начала терапии, и после 12 мес. лечения. Все обследованные больные были разделены на две группы в зависимости от серопозитивности по РФ: первую группу (1n=38) составили пациенты с серопозитивным по РФ РА, вторую (2n=36) – больные с серонегативным по РФ вариантом РА. Все больные получали в качестве базисной противовоспалительной терапии инфликсимаб – вводили в/в капельно по 200 мг/сутки в соответствии с рекомендуемой схемой: 0; 2; 4; 6 неделя, затем каждые 8 недель на фоне приема метотрексата 10 мг/нед. Концентрацию ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНО-α, ИЛ-8 в синовиальной жидкости больных РА оценивали с помощью тест-систем Pro Con (НПО «Протеиновый контур», г. Санкт-Петербург). Васкулоэндотелиальный фактор роста А (ВЭФР-А) исследовали иммуноферментным методом (Bender, Medsystems Qmbh). Синовиальную жидкость для исследования получали при пункции коленных суставов. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы «Microsoft Excel-2000» 2003.

Результаты и обсуждение

Исследование исходного содержания цитокинов провоспалительного действия в синовиальной жидкости больных РА показало достоверное увеличение их содержания: ФНО-α – $426,5 \pm 14,8$ пг/мл; ИЛ-1β – $288,4 \pm 11,7$ пг/мл; ИЛ-6 – $234,5 \pm 13,1$ пг/мл; ИЛ-8 – $148,6 \pm 16,1$ пг/мл в сравнении с показателями здоровых людей. У всех обследованных больных РА определено повышение уровня ВЭФР-А ($76,8 \pm 10,6$ пмоль/л; $p < 0,05$) в синовиальной жидкости. При сравнении содержания изучаемых цитокинов у больных в зависимости от серопозитивности по РФ было установлено, что при серонегативном варианте РА в синовиальной жидкости имел место более высокий уровень ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-8 ($498,4 \pm 13,7$ пг/мл, $p < 0,05$; $298,5 \pm 19,1$ пг/мл, $p < 0,05$; $398,6 \pm 19,7$ пг/мл, $p < 0,05$ соответственно; табл. 1). Концентрация ИЛ-1β и ВЭФР-А у больных этой группы составляла соответственно $204,7 \pm 12,3$ пг/мл и $76,8 \pm 10,6$ пг/мл, и была достоверно ниже в сравнении с показателями при серопозитивном по РФ варианте РА, при котором уровень ИЛ-1β и ВЭФР-А составил соответственно $318,4 \pm 24,7$ пг/мл и $393,7 \pm 25,2$ пг/мл; табл. 2). Таким образом, проведенные исследования выявили особенности в со-

держании исследуемых цитокинов в синовиальной жидкости больных в зависимости от серопозитивности по РФ. При серонегативном варианте РА в синовиальной жидкости преобладало содержание ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-8. У больных с серопозитивной формой РА отмечена значительно большая концентрация ИЛ-1β, ВЭФР-А, при меньшем уровне ФНО-α, ИЛ-6 и ИЛ-8, что отражает особенности патогенеза данных вариантов РА. Следует отметить, что нарушения в системе цитокинов имеют патогенное значение при РА. Таким цитокином, как ФНО-α, ИЛ-6, вырабатываемым в процессе иммунного взаимодействия макрофагов и лимфоцитов в синовиальной мембране, принадлежит ведущая роль в дальнейшем активировании клеток и развитии острого воспалительного процесса в суставе [8] прежде всего при серонегативном варианте РА. Гиперпродукция ФНО-α, ИЛ-6, ИЛ-8 является основным стимулом для агрессивной пролиферации синовиальных клеток. Следует отметить, что ФНО-α в цитокиновой иерархии занимает стабильно более высокую позицию и стимулирует продукцию ИЛ-1β, ИЛ-6. Гиперпродукция ИЛ-6 активирует экспрессию молекул адгезии на эндотелии синовиоцитов, усиливает активность фибробластов и остеокластов, тем самым потенцирует воспаление при РА [3]. Важным свойством ИЛ-8 является стимуляция ангиогенеза путем активации пролиферации эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток, усиления продукции ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α [3]. Преимущественное увеличение уровня ИЛ-8 при негативном по РФ варианте РА можно рассматривать в качестве компенсаторной реакции, направленной на частичное замещение в ангиогенезе активности ВЭФР-А, содержание которого у больных этой группы оказалось достоверно ниже в сравнении с серопозитивным по РФ ревматоидным артритом. Прогрессирование заболевания, формирование паннуса при РА сопряжено с гиперпродукцией ВЭФР-А, ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α, обладающих свойствами инициировать воспаление и разрушение костной и хрящевой ткани [9]. ФНО-α потенцирует эффекты ключевых медиаторов воспаления в синовиальной оболочке, запуская деструктивные процессы в суставах, стимулирует остеокластогенез и вместе с другими цитокинами (ИЛ-1β и ИЛ-6) способствует развитию костной и хрящевой деструкции сустава и прогрессированию заболевания. Под влиянием ФНО-α активируется продукция ИЛ-8, который в свою очередь, обладает способностью потенцировать синтез клетками ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α, также ИЛ-8 играет ключевую роль в миграции нейтрофилов в очаг воспаления в синовиальной ткани. Источником ИЛ-8 в полости суставов могут являться синовиальные клетки, гиперэкспрессия ИЛ-8 обуславливает прогрессирование воспаления синовиальной оболочки суставов [3]. Под влиянием ИЛ-1β хондроциты вырабатывают собственные провоспалительные медиаторы, а повышенное количество оксида азота, приводит к гибели хондроцитов. ИЛ-1β и ФНО-α обладают синергической и самоиндуцирующей активностью, потенцируют развитие синовита с лейкоцитарной инфильтрацией сустава. Эти цитокины усиливают экспрессию молекул адгезии (ICAM -1, VCAM -1) на мембранах эндотелия сосудов синовиальной мембраны, индуцируют синтез хемотаксических факторов, стимулируют продукцию фактора роста фибробластов, вызывая тем самым прогрессирование деструкции суставов [1]. Следует подчеркнуть важную роль ИЛ-1β в активировании экспрессии ВЭФР-А [10].

Определение в синовиальной жидкости у обследованных больных РА уровня ВЭФР-А показало, что его концентрация при серопозитивном варианте болезни была в 1,6 раза выше, чем у больных с серонегативным РА.

Известно, что васкулоэндотелиальный фактор роста А, секретирующийся макрофагами, фибробластами, лимфоцитами, играет важную роль в неангиогенезе при РА, осуществляя стимуляцию пролиферации синовиальных и эндотелиальных клеток, образование новых сосудов, активный рост паннуса с обилием в нем кровеносных сосудов [11].

Более высокое содержание ВЭФР-А у больных с серопозитивным вариантом заболевания отражает прогрессирование болезни, высокую активность процессов неангиогенеза, стимулированных ВЭФР-А. При этом надо отметить, что процессы деструкции хряща и кости при РА связаны не столько с механическим давлением растущего паннуса, сколько с гиперпродукцией провоспалительных медиаторов, в том числе ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α [8].

Сравнительная оценка клинической эффективности применения инфликсимаба у больных РА в зависимости от серопозитивности по РФ показала, что у серонегативных пациентов, получавших инфликсимаб, эффективность лечения (число пациентов с ответом по DAS 28 составило более 50 %) была достоверно выше, чем в группе серопозитивных по РФ больных (всего 17,5 % больных с ответом по DAS 28).

При этом после 12 мес. терапии только у 15 % больных, позитивных по РФ, в сравнении с 45 % пациентов, негативных по РФ, имел место «хороший ответ» (снижение DAS >1,2) и минимальная активность заболевания (1,6 < DAS < 2,4). Число пациентов, «не отвечающих» на терапию (DAS > 3,7), составило соответственно 50 % в первой группе, и 18 % – во второй.

Проведенный мониторинг лабораторных показателей (после 2 мес. терапии) установил достоверное снижение содержания в синовиальной жидкости больных с РФ-позитивным РА ВЭФР-А – на 29,1 %, ФНО- α – на 15,0 %, ИЛ-1 β – на 18,0 % и ИЛ-6 – на 17,3 %, ИЛ-8 – на 19,5 %.

При этом у пациентов с РФ-негативным вариантом РА после 2-месячного лечения инфликсимабом выявлена большая результативность коррекции изучаемых показателей: концентрация ФНО- α уменьшилась на 48,6 % ($p < 0,05$), ИЛ-1 β – на 39,8 % ($p < 0,05$), ИЛ-6 – на 32,1 % ($p < 0,05$); ИЛ-8 – на 34,7 % ($p < 0,05$); снижение концентрации ВЭФР-А в синовиальной жидкости составило 52,3 % ($p < 0,05$).

Определение уровня изучаемых цитокинов после 12 мес. терапии показало нормализацию их содержания в синовиальной жидкости у больных с РФ-негативным РА, получавших лечение инфликсимабом. У пациентов с РФ-позитивным РА, на фоне лечения было достигнуто достоверное уменьшение концентрации ФНО- α – на 69,8 %, ИЛ-1 β – на 48,5 %, ИЛ-6 – на 78,3 %, ВЭФР-А – на 85,4 %. Анализ полученных данных установил большую клиническую эффективность терапии инфликсимабом при серонегативном варианте РА, что во многом связано с высоким содержанием при этом варианте РА ФНО- α , являющегося мишенью для реализации активности инфликсимаба.

Известно, что ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α обладают частично перекрещивающейся и самоиндуцирующей активностью [7], поэтому снижение продукции ФНО- α под влиянием инфликсимаба сопровождается большей эффективностью корригирующего влияния на цитокиновый статус в синовиальной жидкости при серонегативном варианте РА.

Выводы

Полученные результаты дают основание рекомендовать применение инфликсимаба у больных серонегативным по РФ вариантом РА, учитывая большую результативность действия препарата, достаточно быстрое и эффективное купирование активности заболевания, контроль за его прогрессированием, что лежит в основе предотвращения процессов деструкции костной и хрящевой ткани и, следовательно, сохранения целостности и функциональной активности суставов.

Таблица 1

Влияние терапии на показатели цитокинового статуса в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом РФ⁺

Группа	Показатель				
	ФНО- α , пг/мл	ИЛ-1 β , пг/мл	ИЛ-6, пг/мл	ВЭФР-А, пмоль/л	ИЛ-8, пг/мл
1. Контроль (n=20)	35,2 \pm 4,6	16,1 \pm 6,3	6,2 \pm 0,9	15,6 \pm 3,6	6,8 \pm 2,1
Больные ревматоидным артритом РФ ⁺ (n=36)					
2. До лечения:	498,4 \pm 13,7* ¹	204,7 \pm 12,3* ¹	298,5 \pm 19,1* ¹	76,8 \pm 10,6* ¹	398,6 \pm 19,7* ¹
3. Через 12 мес. терапии*	32,7 \pm 4,8* ²	17,4 \pm 2,6* ²	11,3 \pm 1,3* ²	26,5 \pm 5,4* ²	7,9 \pm 3,2* ²
*инфликсимаб + метотрексат 10 мг/нед (n=36)					

Таблица 2

Влияние терапии на показатели цитокинового статуса в синовиальной жидкости больных ревматоидным артритом РФ⁺

Группа	Показатель				
	ФНО- α , пг/мл	ИЛ-1 β , пг/мл	ИЛ-6, пг/мл	ВЭФР-А, пмоль/л	ИЛ-8, пг/мл
1. Контроль (n=20)	35,2 \pm 4,6	16,1 \pm 6,3	6,2 \pm 0,9	15,6 \pm 3,6	6,8 \pm 2,1
Больные ревматоидным артритом РФ ⁺ (n=38)					
2. До лечения:	128,5 \pm 14,8* ¹	318,4 \pm 24,7* ¹	232,5 \pm 8,4* ¹	393,7 \pm 25,2* ¹	160,3 \pm 6,8* ¹
3. Через 12 мес. терапии*	38,8 \pm 6,2* ¹	164 \pm 10,2* ¹⁻²	50,5 \pm 9,8* ¹⁻²	57,5 \pm 15,8* ¹⁻²	44,2 \pm 4,9* ¹⁻²
*инфликсимаб + метотрексат 10 мг/нед (n=38)					

Литература

1. *Бадюкин В.В.* Избранные лекции по клинической ревматологии / Под ред. В.А. Насоновой, Н.В. Бунчука. – М., 2003. – С. 82–90.
2. *Каратеев Д.Е.* Современная медикаментозная терапия ревматоидного артрита // *Лечащий врач.* – 2007. – № 2. – С. 40–6.
3. *Кетлинский С.А.* Цитокины. – С-Пб.: Фолиант, 2008. – 550 с.
4. *Насонов Е.Л.* Фармакотерапия ревматоидного артрита с позиций доказательной медицины; новые рекомендации // *РМЖ.* – 2002. – № 6. – С. 11–23.
5. *Насонов Е.Л.* Ревматоидный артрит как общемедицинская проблема // *Терапевт.* – 2004. – № 5. – С. 5–7.
6. *Насонов Е.Л., Каратеев Д.Е.* Ревматоидный артрит. Ревматология. Национальное руководство; под ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 852 с.
7. *Насонова В.А.* Ревматология. – М.: Медицина, 2008. – 457 с.
8. *Сигидин Я.А., Лукина Г.В.* Биологическая терапия в ревматологии– 2-е изд., доп. – М.: Практическая медицина, 2009. – 302 с.
9. *Antoni C., Krueger G.G., de Vlam K. et al.* Infliximab improves signs and symptoms of psoriatic arthritis: results of IMPACT 2 trial // *Ann Rheum Dis.* – 2005. – 64. – P. 197–200.
10. *Kowantz M., Ferrava N.* Vascular endothelium growth factor signaling pathways: therapeutic perspective // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – 12(17). – P. 5018–22.
11. *Smolen J.S., Weinblatt M.* When patients with rheumatoid arthritis fail tumor necrosis factor inhibitors what is the next step // *J Ann Rheum Dis.* – 2008. – 67. – P. 1497–8.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.248-036.65:616.155.32

И.О. Чикилева¹, М.В. Киселевский¹, Т.В. Борисова², О.Г. Фотиади², А.В. Караулов²**ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ
БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ПЕРИОД ОБОСТРЕНИЯ**¹РОИЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва²Первый Московский государственный университет имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва**Контактная информация**

Караулов Александр Викторович, профессор, чл.-корр. РАМН, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии

Адрес: 119992, Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2; тел. +7(495)395-64-97

e-mail: karaulov@mtu-net.ru

Статья поступила 03.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Целью настоящей работы было исследование содержания регуляторных Т-лимфоцитов (Трег), активированных Т-хелперов (Тх) и натуральных киллеров (НК) в крови больных бронхиальной астмой в период обострения по сравнению со здоровыми донорами. Для характеристики содержания субпопуляций лимфоцитов был использован метод многоцветной проточной цитофлуориметрии. Содержание Трег и Тх определяли при помощи одновременного окрашивания клеток антителами к маркерам CD4; CD25 и FoxP3. Для оценки доли НК использовали антитела к CD16 и CD56. Показано, что у пациентов наблюдается значительное увеличение доли активированных Тх CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. При этом количество Трег остается практически неизменным. Среди пациентов были отмечены лица как с повышенной, так и с пониженной долей НК. Однако даже при повышенном уровне НК отмечались нарушения в экспрессии на поверхности НК маркеров активации CD58 и NKG2D. Таким образом, при бронхиальной астме в период обострения наблюдаются изменения субпопуляционного состава лимфоцитов, проявляющиеся, прежде всего, в повышении содержания активированных Тх и альтерациях в экспрессии маркеров активации НК.

Ключевые слова: бронхиальная астма, Трег, FoxP3, НК.I.O. Chikileva¹, M.V. Kiselevsky¹, T.V. Borisova², O.G. Fotiadi², A.V. Karaulov²**UNUSUAL PHENOTYPIC FEATURES OF LYMPHOCYTES
IN BLOOD OF BRONCHIAL ASTHMA PATIENTS DURING EXACERBATION**¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS,²I.M. Sechenov 1st Moscow State University Ministry of Health and Social Development**Abstract**

The purpose of the present work was to study the content of regulatory T-lymphocytes (Tregs), activated T helpers (Th) and natural killer (NK) cells in the blood of bronchial asthma patients in the period of exacerbation and to compare with healthy controls. To characterize percentages of different lymphocyte subpopulations, we applied multi-color fluorescent flow cytometry. The content of Tregs and Th cells were determined by simultaneous staining with antibodies towards CD4, CD25, and FoxP3 markers. To measure of NK-cell percentages, antibodies to CD16 and CD56 were applied. Significant increase in the content of activated CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Th cells was shown in the patients' group. At the same time quantities of Tregs remained on the same level. In this study we observed the patients manifesting increased as well as decreased percentages of NK-cells. However, even patients with increased NK cells showed abnormalities in expression of NK-cell activation CD58 and NKG2D markers. Taken together, there are changes in subpopulation composition of lymphocytes during exacerbation of bronchial asthma manifesting. The alterations were observed first of all in the increasing of the content of activated Th cells and modulation of NK-cell activation markers expression profile.

Key words: bronchial asthma, Tregs, FoxP3, NK cells.**Введение**

У больных бронхиальной астмой отмечаются разнообразные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов. В частности, рядом исследователей обнаружено увеличение экспрессии активационных молекул (HLA-DR, CD25), зависящее от выраженности основных симптомов заболевания [1; 2; 5; 6; 8; 10].

Кроме того, было показано, что один из возможных механизмов, ведущих к развитию аллергических состояний и астмы, заключается в нарушениях функционирования Трег [11; 14].

В модели на мышах было показано, что накопление Трег в легких и дренирующих лимфати-

ческих узлах коррелирует с прекращением аллергических воспалительных процессов [3].

Многие исследования указывают на существенные изменения содержания НК, их фенотипических и функциональных характеристик при астме [2; 7; 13; 15]. Однако их роль в развитии аллергических реакций и, в частности, атопической бронхиальной астмы до сих пор остается исследованной слабо. Данные о характере изменений содержания НК-клеток при астме противоречивы, что, по всей видимости, объясняется различными выборками пациентов [1; 2; 5; 6; 8–10; 12].

Целью работы было исследование содержания Т-лимфоцитов и НК в крови больных бронхиальной астмой в период обострения.

Материалы и методы

Выделение МНК периферической крови

МНК 11 здоровых доноров и 11 больных астмой в период обострения выделяли из стабилизированной гепарином (25 Ед./мл) периферической крови на одноступенчатом градиенте фикола плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$ (ПанЭко, Россия) центрифугированием при 400 g в течение 20 минут. Мононуклеарные клетки, образовавшие интерфазное кольцо, собирали пипеткой и трехкратно отмывали в среде RPMI-1640. После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 200 g.

Фенотипическая характеристика МНК

Содержание Трег $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ и активированных Тх $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^-$ определили у 6 пациентов и 6 доноров группы сравнения. Используя МКА (BeckmanCoulter, США), на поверхности МНК больных и здоровых доноров исследовали уровень экспрессии молекул CD4 и CD25. Уровень экспрессии FoxP3 определяли с помощью внутриклеточного окрашивания клеток МКА к FoxP3 (Miltenyi Biotec Inc., Германия). Клетки окрашивали моноклональными FITC (флюоресциннизоционат)-мечеными антителами против CD4, PE (фикоэритрин)-мечеными против CD25 и APC (аллофикоцианин)-мечеными антителами против FoxP3. Результаты учитывали на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Содержание НК- и НКТ-клеток определили у 11 пациентов и 11 доноров группы сравнения. Для определения содержания НК- и НКТ-клеток МНК окрашивали комбинацией антител к CD16(FITC), CD56(APC) и CD3(PE). Для характеристики НК были также использованы антитела к CD58 (FITC, BeckmanCoulter, США) и NKG2D(PE) (Miltenyi Biotec Inc., Германия). Гейт (окно) популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 5000 клеток в гейте лимфоцитов. Статистическая обработка материала проведена при помощи программного пакета WIN MDI 2.9. Расчет содержания популяций клеток, несущих разные комбинации трех маркеров (Трег $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$, активированных Тх $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^-$ и др.) проводился, как описано в нашей работе [4].

Результаты и обсуждение

Наше исследование показало, что у больных бронхиальной астмой наблюдается повышенный уровень экспрессии на поверхности лимфоцитов компонента рецептора интерлейкина-2 CD25, который представляет собой один из маркеров активации лимфоцитов (рис. 1А-Б).

Эти данные согласуются с результатами других исследователей [1; 2]. При этом у данной группы пациентов была значительно повышена доля активированных Тх ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^-$; рис. 2А).

В среднем содержание активированных Тх в популяции лимфоцитов больных составило $16 \pm 5\%$ по сравнению с $2,5 \pm 1,2\%$ для здоровых доноров (статистически достоверное отличие при $p < 0,05$). Согласно современному взгляду о важной роли в аллергических процессах эффекторных Тх-лимфоцитов 2 типа (Тх2) [3; 11], мы предполагаем, что в данной популяции преобладали активированные Тх2-клетки.

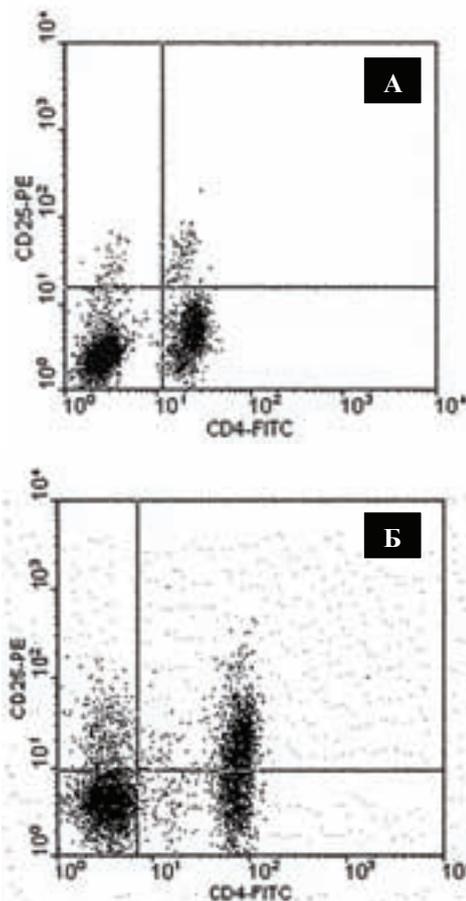


Рис. 1. Типичные точечные графики (дот-плоты) распределения лимфоцитов в координатах логарифма интенсивности флуоресценции антител к CD4, меченных FITC, и к CD25(PE).

А: здоровый донор.

Б: пациент с астмой.

У пациентов с астмой в период обострения отмечается увеличение экспрессии активационного маркера CD25 также на поверхности лимфоцитов, отличных от CD4-позитивных Тх, что, по-видимому, отражает общую напряженность иммунной системы у больных астмой в период обострения. Интересно отметить, что по данным других исследователей даже в период стабилизации у пациентов с астмой отмечается повышенное содержание активированных лимфоцитов как среди CD4^+ Тх, так и CD8^+ цитотоксических лимфоцитов, также и среди В-лимфоцитов [2].

Содержание супрессорной субпопуляции Трег ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$) у больных астмой практически не отличалось от здоровых доноров (рис. 2Б). Средние значения величины доли Трег для больных составили $2,4 \pm 1,1\%$, а для здоровых доноров – $2,3 \pm 1,3\%$. Таким образом, их соотношение с активированными Тх-лимфоцитами у больных астмой значительно ниже, чем у здоровых доноров. Наши данные, подобно результатам других авторов, позволяют предположить недостаточность Трег у больных астмой в период обострения по сравнению со здоровыми индивидуумами контрольной группы [11; 14].

У большинства пациентов с астмой отмечалась очевидная тенденция к снижению количества НК (рис. 3) по сравнению с таковым контрольной группы здоровых индивидуумов. Только у 3 больных, напротив, отмечалось повышение доли НК-клеток.

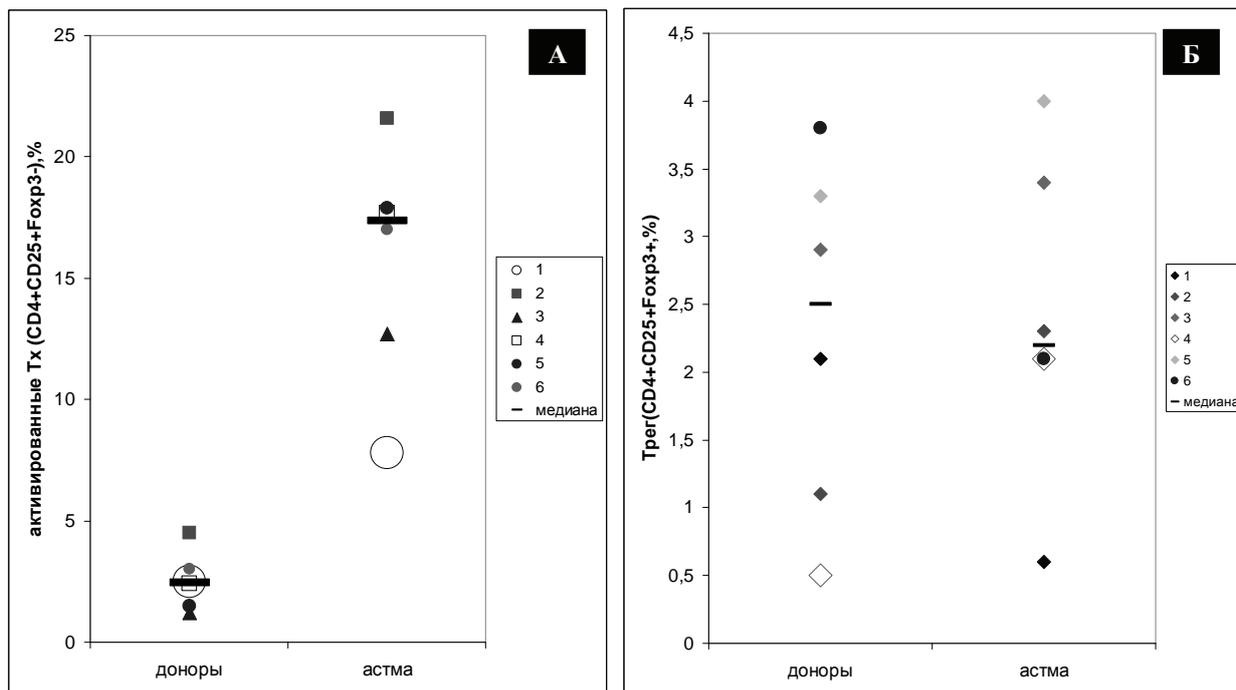


Рис. 2. Сравнение содержания активированных Тх и Трег в крови пациентов с астмой и здоровых доноров. На каждой диаграмме приведена медиана значений. Значения процентной доли Тх и Трег для разных индивидуумов в ряде случаев оказались очень близкими, поэтому точки почти сливаются. Каждый пациент или донор обозначен собственным значком.

А: активированные Тх.
Б: активированные Трег.

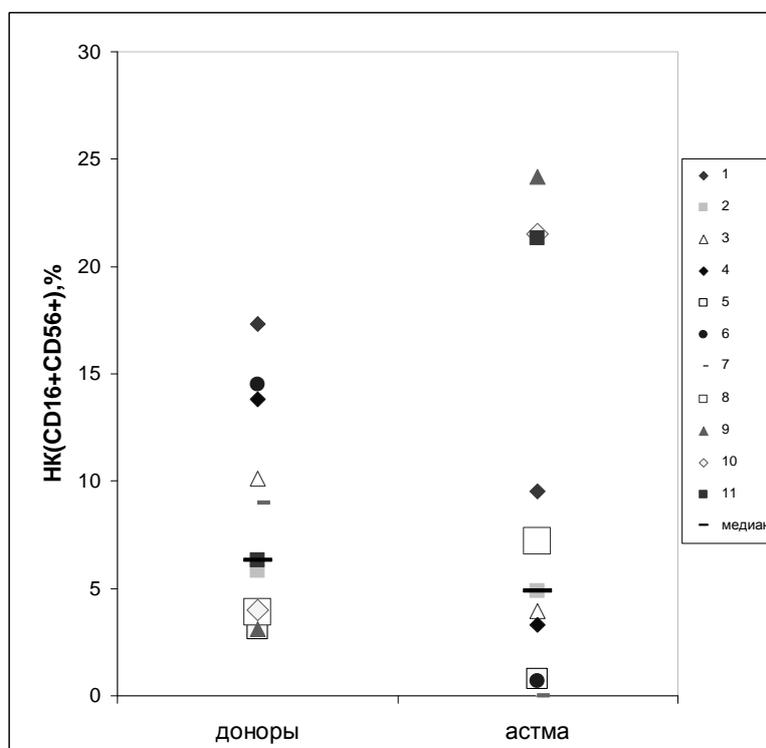


Рис. 3. Сравнение содержания НК (CD16⁺CD56⁺) в крови пациентов с астмой и здоровых доноров. На каждой диаграмме приведена медиана значений. Значения для разных индивидуумов в ряде случаев оказались очень близкими, поэтому точки почти сливаются. Каждый пациент или донор обозначен собственным значком.

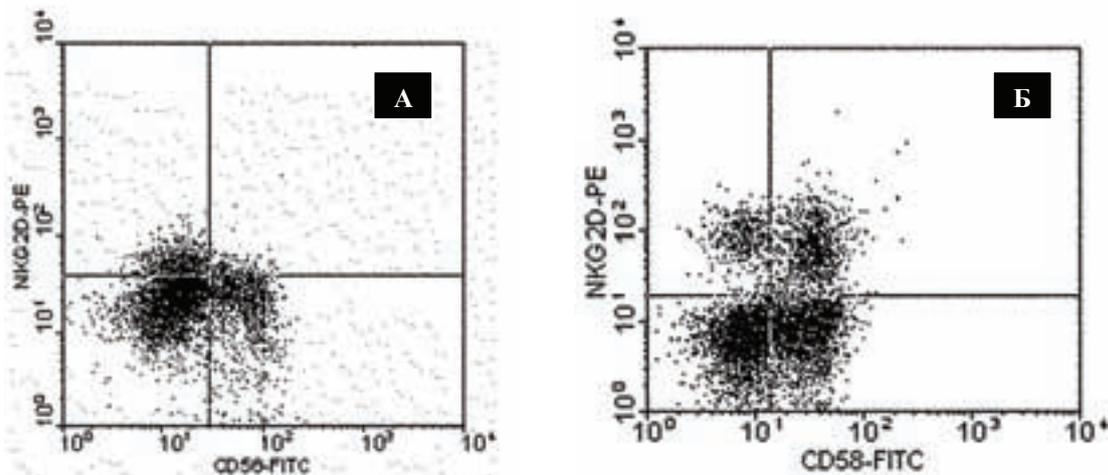


Рис. 4. Точечные графики (дот-плоты) распределения лимфоцитов пациента с астмой, имеющего повышенное содержание НК и типичного здорового донора в координатах логарифма интенсивности флуоресценции антител к CD58, меченных FITC, и к NKG2D(PE). NKG2D – активирующий рецептор НК, который экспрессируется практически всеми НК и частью Т-клеток. У пациента практически не заметна популяция клеток, экспрессирующих одновременно NKG2D и молекулы адгезии CD58.

А: пациент.

Б: здоровый донор.

Однако даже у пациентов с повышенным содержанием НК отмечались нарушения активационного статуса клеток. В частности, у 2 из 3 из вышеуказанных пациентов на поверхности НК в значительной степени была понижена экспрессия активационного рецептора НК NKG2D (0–1 % от $CD56^+$ НК) и молекул адгезии CD58 (0–4 % от $CD56^+$ НК) (рис. 4). В группе сравнения практически все НК экспрессировали NKG2D (90–100 % от $CD56^+$ НК), а число $CD56^+$ НК, несущих CD58, варьировало от 30 до 80 %. Однако в настоящем исследовании у больных бронхиальной астмой не удалось выявить статистически достоверного отличия содержания субпопуляции НК по сравнению с таковым группы здоровых доноров (см. рис. 3).

Исследования некоторых авторов указывают, что содержание НК и их активность повышены у пациентов с астмой по сравнению со здоровыми индивидуумами [1; 5; 6; 8–10]. Тем не менее, другими исследователями было показано, что содержание НК у пациентов с atopической астмой в период стабилизации не изменено по сравнению со здоровыми индивидуумами группы контроля [2]. Однако авторы данной работы отмечают повышенное содержание НКТ-лимфоцитов $CD3^+CD16^+CD56^+$ в группе лиц, страдающих atopической астмой по сравнению с таковой контрольной группы. Эти данные согласуются с работой F. Liu et al., которые показали, что содержание НК у пациентов с бронхиальной астмой во время стабилизации не отличается от таковых здоровых индивидуумов [12]. В то же время в период обострения, как и по нашим данным, авторы этой статьи отметили статистически достоверное снижение у пациентов с астмой процентного содержания НК. Как было показано в еще одной работе, снижение содержания НК у детей при тяжелой инфекции респираторным синцитиальным вирусом индуцирует развитие или ведет к обострению atopической астмы [7]. Авторы связывают это частично с тем, что НК представляют собой один из важнейших источников интерферона- γ , цитокина, который направляет иммунные реакции по Тх1-типу и препятствует развитию atopических реакций Тх2-типа. К сожалению, у нас отсутствуют данные о причине обострения

астмы у пациентов. Поэтому сложно делать четкие предположения о том или ином характере изменений НК.

НК, по всей видимости, играют существенную роль в развитии atopического воспаления при астме. НК-клетки 2 класса могут секретировать цитокин ИЛ-4, который усугубляет atopические реакции Тх2-типа [15]. Данные другой работы показали в модели на мышах, что во время контакта животных с аллергеном НК-клетки накапливаются и пролиферируют в лимфатических узлах, дренирующих легкие [13]. Результаты исследования указали, что НК способны потенцировать накопление в легких эозинофилов. Интересно, что авторы отметили увеличение экспрессии на поверхности НК активационного маркера молекул костимуляции презентации антигенов CD86 во время введения мышам аллергена [13]. Наши данные также указывают на существенные фенотипические изменения НК у части пациентов, которые существенно могут повлиять на функционирование клеток. В особенности, понижение экспрессии рецептора NKG2D у части пациентов с обострением бронхиальной астмы может привести к понижению способности НК лизировать свои обычные мишени – клетки, инфицированные вирусом или злокачественно трансформированные. Данный рецептор распознает на поверхности своих мишеней лиганды, индуцируемые клеточным стрессом при злокачественной трансформации и вирусной инфекции, а также некоторые вирусные белки. Понижение экспрессии молекулы CD58 может также понизить функциональную активность НК в отношении своих мишеней и, кроме того, с большой вероятностью, приведет к нарушениям в процессах регулирования НК.

Наши результаты и данные других исследователей свидетельствуют о том, что при бронхиальной астме, в особенности при ее обострении, наблюдаются патологические изменения ряда иммунных эффекторов, включая НК, Тх и другие группы лимфоцитов. Точную физиологическую значимость данных явлений и причинно-следственные связи между различными изменениями иммунных клеток при бронхиальной астме предстоит еще досконально изучить.

Выводы

Таким образом, при бронхиальной астме в период обострения наблюдаются изменения субпулационного состава лимфоцитов, проявляющиеся прежде всего в повышении содержания активированных Тх-клеток ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$), при этом

доля Трег ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) не отличается от здоровых доноров. У большинства пациентов экспериментальной группы было отмечено уменьшение доли НК. Дополнительные исследования показали изменение экспрессии маркеров активации НК ($CD58$, $NKG2D$) у некоторых пациентов с повышенным уровнем НК.

Литература

1. Aguilar-Angeles D., Rojo-Gutiérrez M.I., Lypéz-Valladares K.E. et al. Lymphocytes B and NK in respiratory allergy // *Rev. Alerg. Mex.* – 2005. – 52. – P. 183–7.
2. Bohacs A., Pöllinger U., Tamösi L. et al. Surface markers of lymphocyte activation in pregnant asthmatics // *Inflamm. Res.* – 2010. – 59. – P. 63–70.
3. Carson IV W. F., Guernsey L. A., Singh A. et al. Accumulation of Regulatory T Cells in Local Draining Lymph Nodes of the Lung Correlates with Spontaneous Resolution of Chronic Asthma in a Murine Model // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2008. – 145(3) – P. 231–43.
4. Chikileva IO; Shubina IZh; Baronzio G; Kiselevsky MV. Is it necessary to deplete the lymphokine activated killers' populations of $CD4^+CD25^+$ lymphocytes? Regulatory Foxp3-positive T cells within lymphokine activated killers // *Biomed. & Pharmacother.* – 2010. – 64. – P. 379–85.
5. Corrigan C.J. T lymphocytes in asthma pathogenesis. In: Barnes PJ, ed., *Asthma*. – Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. – P. 433–51.
6. Jira M., Antosova V., Vondra J. et al. Natural killer and interleukin-2 induced cytotoxicity in asthmatics. I. Effect of acute antigenspecific challenge // *Allergy*. – 1988. – 43. – P. 294–8.
7. Kaiko G.E., Phipps S., Angkasekwinai P. et al. NK Cell Deficiency Predisposes to Viral-Induced Th2-Type Allergic Inflammation via Epithelial-Derived IL-25 // *J. Immunol.* – 2010. – 185(8). – P. 4681–90.
8. Korsgren M., Persson C.G.A., Sundler F. et al. Natural Killer Cells Determine Development of Allergen-induced Eosinophilic Airway Inflammation in mice // *J. Exp. Med.* – 1999. – 189 – P. 553–62.
9. Korsgren M. NK cells and asthma // *Curr. Pharm. Des.* – 2002. – 8. – P. 1871–6.
10. Krejsek J., Kral B., Vokurkova D. et al. Decreased peripheral blood $\gamma\delta$ T cells in patients with bronchial asthma // *Allergy*. – 1998. – 53. – P. 73–7.
11. Larchü M. Regulatory T Cells in Allergy and Asthma // *Chest*. – 2007. – 132. – P. 1007–14.
12. Liu F., Luo Y.L., Wu Y.X., Kong O.Y. Peripheral natural killer cell counting and its clinical significance blood in patients with bronchial asthma // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. – 2008. – 28(5). – P. 780–2.
13. Ple C., Barrier M., Amniai L. et al. Natural killer cells accumulate in lung-draining lymph nodes and regulate airway eosinophilia in a murine model of asthma // *Scand. J. Immunol.* – 2010 – 72(2). – P. 118–27.
14. van Oosterhout A.J.M., Bloksma N. Regulatory T-lymphocytes in asthma // *Eur. Respir. J.* – 2005. – 26 – P. 918–32.
15. Wei H., Zhang J., Xiao W. et al. Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance // *J. Allergy. Clin. Immunol.* – 2005. – 115(4). – P. 841–7.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.65-006.6-07: 57.083.3

*Т.В. Осипова¹, Т.П. Рябых¹, З.А. Соколова¹, В.И. Карасева¹, Н.Б. Паклин²***ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТАТИЧЕСКОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ В ФОРМАТЕ БИОЧИПА: РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ**¹РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва²Рязанский государственный университет им. С.А. Есенина, Рязань**Контактная информация***Осипова Татьяна Владимировна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО***Адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.:** +7(495)324-10-65**e-mail:** tatrav44@yandex.ru

Статья поступила 12.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Простатический специфический антиген – основной маркер рака предстательной железы. Две формы этого антигена – общая и свободная – и их соотношение используются в диагностике и мониторинге больных РПЖ. Современная технология биочипов позволяет создавать новые, более совершенные диагностические системы для определения опухолевых маркеров. Целью исследования являлась оценка диагностической эффективности новой тест-системы в формате микрочипа (ИМБ РАН) для определения двух форм ПСА в сыворотке крови человека. На большом клиническом материале, включающем 164 образца сыворотки крови онкологических, неонкологических больных и здоровых доноров, показано, что тест-система в формате микрочипа позволяет проводить одновременное количественное определение ПСАобщ и ПСАсв и получать результаты, сравнимые с результатами традиционных иммуноферментных тест-систем. С помощью модели логистической регрессии и ROC-анализа показано, что новая тест-система в формате микрочипа имеет диагностическую эффективность, сопоставимую с эффективностью широко используемых иммуноферментных тест-систем Fujirebio Diagnostics (Швеция), и в некоторых случаях превосходит последние по показателю специфичности (ПСАобщ и %ПСАсв). Значения площадей под ROC-кривыми при использовании многофакторных моделей составляют для системы в формате микрочипа 0,725, а для иммуноферментных тест-систем «Fujirebio Diagnostics» – 0,642.

Ключевые слова: белковый микрочип, диагностические тест-системы, рак простаты, простатический специфический антиген, ROC-анализ.

*T.V. Osipova¹, T.P. Ryabikh¹, Z.A. Sokolova¹, V.I. Karaseva¹, N.B. Paklin²***DETECTION OF PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN IN HUMAN SERUM****BY BIOCHIP-BASED TEST SYSTEM: CLINICAL TRIAL**¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow²S.A. Esenin Russian State University, Rязань**Abstract**

PSA is the most useful indicator of PCa. Two forms of this antigen, tPSA, fPSA, and their ratio (%fPSA) are used in diagnostics and monitoring of patients with PCa. Modern biochip technology makes it possible to develop more perfect diagnostic systems for detection of tumors' markers. The goal of the investigation is diagnostic performance evaluation of the biochip-based test system (EIMB, RAS) for simultaneous detection of two PSA forms in human serum. Sera were collected from 164 patients with PCa, non-malignant prostate diseases and healthy donors. Here we show, that the biochip-based test system makes it possible simultaneous quantitation of tPSA and fPSA, and the tumor marker levels obtained are highly competitive with these derived from conventional ELISA test systems (Fujirebio Diagnostics, Sweden). ROC-analysis and logistic regression analysis were used to compare the diagnostic accuracy of two systems. The new test system has diagnostic efficiency competitive with that of ELISA systems, and is superior to the latter in specificity for tPSA and %fPSA. AUCs the ROC-curves in multifactorial models are 0,725 for biochip-based test-system and 0,642 for ELISA systems.

Key words: protein biochip, diagnostic systems, prostate cancer, tPSA, fPSA, ROC-analysis.

Введение

Разработка методов ранней диагностики злокачественных опухолей продолжает оставаться одной из актуальнейших проблем современной онкологии. РПЖ относится к наиболее распространенным онкологическим заболеваниям среди мужского населения [1]. Увеличение заболеваемости РПЖ приводит к необходимости поиска новых методов раннего выявления заболевания. Ведущая роль в диагностике РПЖ принадлежит ПСА.

Открытие ПСА [20] и создание серологического теста для его определения у человека имело большое значение для диагностики и выявления ранних и локальных форм РПЖ [8]. Ценность серологического теста на ПСА по сравнению с другими методами выявления РПЖ состоит в его простоте, малой инвазивности, воспроизводимости и объективности. Однако повышение этого маркера при различных не злокачественных заболеваниях предстательной железы несколько снижает диагностическую ценность ПСА-теста.

Многочисленные исследования последних лет показали, что диагностическая специфичность ПСА-теста может быть увеличена за счет определения различных форм антигена и соотношения между ними [7; 16], что существенно для дифференциальной диагностики рака и ДГПЖ. В настоящее время дифференциальная диагностика РПЖ и ДГПЖ основана на одновременном измерении общей и свободной форм ПСА и определении %ПСА_{св}, т.к. известно, что содержание свободной формы относительно общей у больных РПЖ меньше, чем в норме и при ДГПЖ. Это особенно важно при незначительном повышении ПСА в пределах от 4 до 10 нг/мл [5; 11], так как в этом случае диагностируются ранние, потенциально излечимые стадии РПЖ.

Существует большое количество коммерческих иммунохимических наборов для раздельного определения разных форм ПСА. Однако из-за отсутствия стандартизации возникают существенные различия в результатах анализов, выполненных разными тест-системами [17; 18], что приводит к искажению истинного значения %ПСА_{св} и к существенным ошибкам при диагностике РПЖ. Для преодоления этих различий разрабатываются новые диагностические системы, позволяющие одновременно в одном образце сыворотки крови измерять концентрации двух форм ПСА и их соотношение [12]. В таких тест-системах ошибки измерений, связанные с иммобилизацией антител, объемом анализируемого образца, разведением образца и условиями проведения иммуноанализа, сведены к минимуму. Возникшая на рубеже веков технология биологических микрочипов дает возможность создавать мультиплексные диагностические системы, позволяющие проводить в одном образце одновременный количественный анализ большого числа маркеров [2; 10]. Применение в онкологии подобных тест-систем, позволит повысить эффективность диагностики злокачественных заболеваний [19]. Ранее нами была показана возможность количественной оценки серологических онкомаркеров в формате гидрогелевых микрочипов, изготовленных по технологии, разработанной в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН (ИМБ РАН) [3]. На основе микрочипов в ИМБ РАН был разработан диагностический набор «ОМ-Биочип (ПСА)» для одновременного количественного измерения двух форм ПСА (общей и свободной) в сыворотке крови человека. Первоначальный вариант тест-системы был основан на двухстадийном варианте сэндвич-иммуноанализа с флуоресцентной детекцией сигнала и имел вполне удовлетворительные аналитические характеристики [5; 14]. В дальнейшем тест-система была усовершенствована путем замены двухстадийного варианта иммуноанализа на одностадийный [15].

Цели настоящей работы:

- испытание новой диагностической системы на клиническом материале;
- оценка ее диагностической эффективности с помощью ROC-анализа;
- сопоставление с эффективностью стандартных иммуноферментных диагностических систем фирмы Fujirebio Diagnostics, Швеция.

Материалы и методы

Получение образцов сыворотки крови

Для испытаний было отобрано 164 образца сыворотки крови человека, в их числе 67 – от больных РПЖ, 46 – от больных ДГПЖ, 30 – от больных

злокачественными урогенитальными опухолями, и 21 – от здоровых доноров. Образцы сыворотки крови пациентов получены: из урологического отделения РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН (онкологические больные), из отделения урологии ГКБ № 60 г. Москвы (больные ДГПЖ) и ФГБУ ГНЦ Минздрава России (здоровые доноры). Все больные имели гистологически подтвержденные диагнозы.

Образцы сыворотки центрифугировали при 1600 об/мин в течение 15–20 мин, разливали по ампулам, замораживали и хранили при –20 °С до проведения анализа, исключая повторные процедуры замораживания и оттаивания.

Диагностические тест-системы

Концентрации ПСА_{общ} и ПСА_{св}, а также % ПСА_{св} в одних и тех же образцах сыворотки крови были измерены с помощью тест-системы в формате микрочипа и диагностических иммуноферментных наборов для определения общей и свободной форм ПСА фирмы Fujirebio Diagnostics.

Диагностические наборы «ОМ-Биочип (ПСА)» для одновременного количественного измерения двух форм ПСА (общей и свободной) в сыворотке крови человека были приобретены в ООО «Биочип-ИМБ». В набор входили биологические микрочипы и комплект реагентов для проведения иммуноанализа.

В качестве систем сравнения в работе использовали коммерческие диагностические иммуноферментные наборы для определения ПСА_{общ} и наборы для определения ПСА_{св} фирмы Fujirebio Diagnostics, Швеция.

Иммуноанализ на микрочипе и регистрация сигналов

В диагностических наборах «ОМ-Биочип (ПСА)» использовался принцип одностадийного прямого сэндвич-иммуноанализа с флуоресцентной регистрацией сигналов. Биологические микрочипы содержали полусферические гидрогелевые элементы с иммобилизованными МКА к ПСА_{общ} и ПСА_{св}. МКА к ПСА_{общ} в равной степени реагировали как со свободной формой ПСА, так и с формой, связанной с антихимоотрипсином. Антитела против ПСА_{св} связывали только ПСА в свободной форме. К образцу сыворотки добавляли раствор флуоресцентно меченых антител в соотношении 5:1, тщательно перемешивали и полученную смесь вносили внутрь пластиковой камеры (V=60мкл), расположенной над гелевыми ячейками микрочипа. После инкубации проводили отмывку биочипа и регистрацию флуоресцентных сигналов с помощью универсального аппаратно-программного комплекса (УАПК, производство ИМБ РАН) для анализа изображений микрочипов. Для расчета концентрации ПСА_{общ} и ПСА_{св} и %ПСА_{св} в исследуемом образце использовали программу «ImaGelAssay».

Статистическая обработка результатов

Регрессионный анализ проводили, используя пакет программ Microsoft Excel. Диагностическую эффективность тест-системы на основе микрочипа оценивали с помощью ROC-анализа [13; 21], используя компьютерную программу MedCalc, версия 9.3.1 г.2009. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 приведены основные данные о группах больных, включенных в исследование: возраст, измеренные уровни ПСА_{общ}, ПСА_{св} и %ПСА_{св}.

Таблица 1

Основные данные по группам больных, включенных в исследование

Возраст Среднее Min—max	РПЖ (n=67)		ДГПЖ (n=46)		Урогенитальные опухоли (n=30)		Доноры (n=21)	
	68,2 ± 7,7 (53-100)		70,6 ± 5,7 (58-80)		53,6 ± 15,6 (28-80)		29,9 ± 8,1 (21-45)	
	ИФА	ЧИП	ИФА	ЧИП	ИФА	ЧИП	ИФА	ЧИП
ПСАобщ, нг/мл								
среднее±SD	20,4±31,1	20,7±35,5	7,0±6,6	4,9±6,0	2,0±2,1	2,2±2,2	0,5±0,3	0,6±0,4
минимальное	0,008	0,03	0,03	0,05	0,2	0,15	0,14	0,12
максимальное	150,9	167,8	29,9	32,7	7,2	7,9	1,16	1,89
ПСАсв, нг/мл								
среднее±SD	2,8±4,5	4,1±7,4	1,1±1,0	1,3±1,4	0,4±0,3	0,5±0,9	0,2±0,1	0,2±0,2
минимальное	0,001	0,001	0,007	0,001	0,001	0,001	0,04	0,001
максимальное	21,9	43,7	4,6	5,7	1,17	4,47	0,32	0,69
%ПСАсв								
среднее±SD	14,0±11,7	16,4±17,1	18,7±9,9	28,6±25,0	23,3±16,5	20,2±23,5	35,5±14,9	36,2±35,1
минимальное	0,19	0,04	4,37	0,07	0,36	0,03	11,6	0,1
максимальное	50,8	27,9	51,09	88,6	63,5	77,9	58,4	97,4

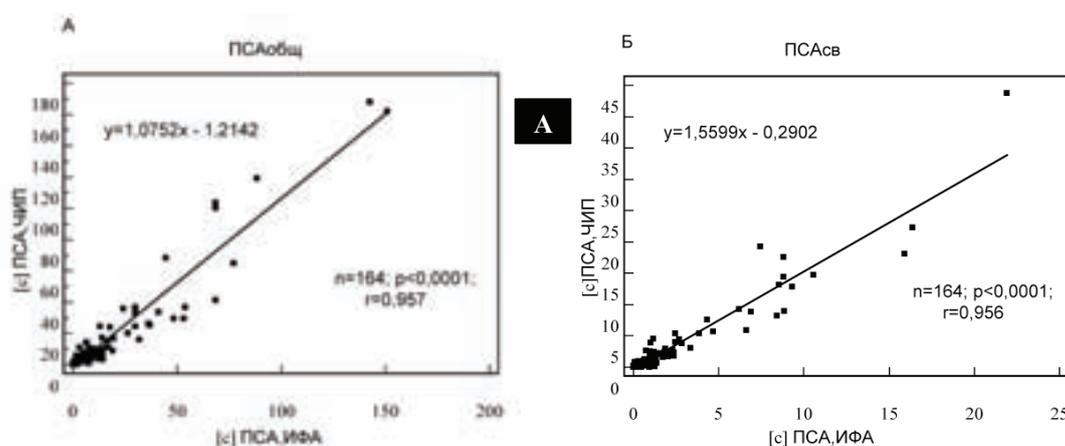


Рис. 1. Линии регрессии уровней, в образцах сыворотки крови, измеренных на чипе (ЧИП) и в традиционной иммуноферментной системе Fujirebio Diagnostics (ИФА):

А: ПСАобщ.

Б: ПСАсв.

Корреляционный анализ показал высокую степень корреляции результатов, полученных в двух видах систем (рис. 1). Коэффициент корреляции составил: для ПСАобщ – 0,957, для ПСАсв – 0,956 ($p < 0,0001$). Для %ПСАсв коэффициент корреляции составил 0,377, но также был статистически достоверен ($p < 0,0001$).

Таким образом, новая диагностическая система в формате биочипа, объединившая на одном носителе две аналитические системы (на ПСАобщ и ПСАсв), позволяет проводить одновременное количественное определение разных форм ПСА и получать результаты, сравнимые с результатами традиционных иммуноферментных тест-систем.

Известно, что наибольшие проблемы в диагностике РПЖ возникают в так называемой «серой зоне» – интервале концентраций ПСАобщ в сыворотке крови от 4 до 10 нг/мл.

В эту зону попадают пациенты не только с раком предстательной железы, но и с другими заболеваниями, в первую очередь, с ДГПЖ. Для проведения дифференциальной диагностики в этом интервале концентраций ПСА вводят дополнительные показатели: соотношение разных форм ПСА (например, %ПСАсв), плотность ПСА, скорость прироста и др. Так, использование показателя %ПСАсв увеличивает специфичность ПСА-теста на 15–20 % по сравнению с использованием только ПСАобщ и позволяет избежать 20–25 % неоправданных био-

псий. Известно, однако, что 75 % больных РПЖ с нормальным уровнем ПСАобщ попадает в диапазон концентраций от 2 до 4 нг/мл. Поэтому рядом авторов было предложено расширить границы «серой зоны» до 2,5–10 нг/мл [9].

В связи с этим, представляло интерес изучить диагностические характеристики новой системы, используя образцы сыворотки с уровнями ПСАобщ, соответствующими «серой зоне». С этой целью из исходного массива был отобран 61 образец сыворотки крови пациентов старше 45 лет с уровнями ПСАобщ от 3 до 10 нг/мл. В эту группу не вошли здоровые доноры, поскольку их возраст был менее 45 лет.

Оценку диагностической эффективности тест-системы в формате микрочипа и сравнение ее с эффективностью референтной системы Fujirebio Diagnostics проводили с помощью ROC-анализа. ROC-кривая представляет собой зависимость чувствительности от «100 – специфичность» (чувствительность – доля пациентов с заболеванием, у которых диагностический тест положителен; специфичность – доля пациентов без заболевания, у которых диагностический тест отрицателен). Сравнение осуществляли по следующим критериям: чувствительность, специфичность и площадь под ROC-кривой – AUC. AUC изменяется в пределах от 0,5 до 1,0. AUC равная единице соответствует 100% чувствительности и 100% специфичности.

Специфичность оценивали при фиксированном значении чувствительности, принимаемом за 90%, т.к. известно, что чем выше специфичность при одном и том же значении чувствительности, тем эффективнее тест-система.

Мультиплексные диагностические системы, разрабатываемые на основе биологических микрочипов, позволяют строить многофакторные диагностические модели, в которых учитываются не только результаты аналитических измерений опухолевых маркеров, но и ряд дополнительных факторов (возраст, наследственность, объем простаты и т.д.), являющихся важной дополнительной информацией в диагностике [4].

Показано, что многофакторные модели имеют, как правило, более высокие показатели диагностической чувствительности и специфичности, чем однофакторные, использующие какой-либо один фактор: ПСАобщ или ПСАсв и т.д.

Сравнение эффективности диагностических систем проводили, учитывая как один фактор (ПСАобщ, ПСАсв или %ПСАсв), так и несколько факторов одновременно (ПСАобщ, ПСАсв, %ПСАсв, возраст).

На рис. 2 представлены ROC-кривые и значения AUC для однофакторных моделей с факторами ПСАобщ, ПСАсв и %ПСАсв, полученные по результатам измерений в иммуноферментной системе Fujirebio Diagnostics и на микрочипе. Сравнительный анализ этих кривых показывает, что тест-система на основе микрочипа позволяет получать результаты, сравнимые с Fujirebio Diagnostics. Отличия по величине AUC во всех случаях незначительны ($p = 0,324-0,960$).

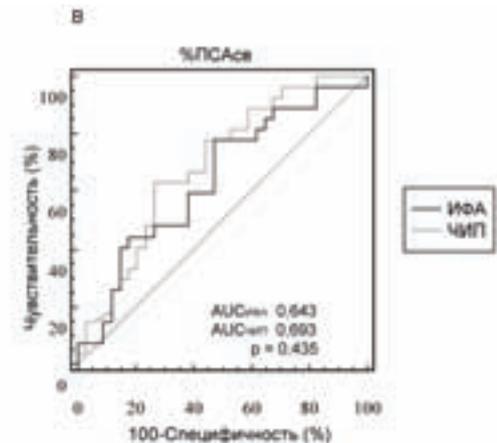
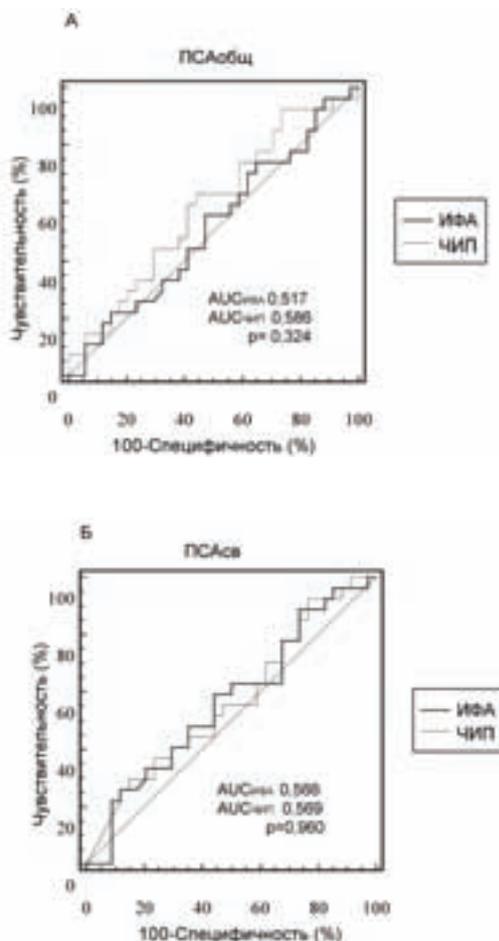


Рис. 2. Сравнение площади под ROC-кривыми (AUC) для тест-системы в формате микрочипа (ЧИП) и иммуноферментной тест-системы Fujirebio Diagnostics (ИФА).

А: ПСАобщ.

Б: ПСАсв.

В: %ПСАсв (В).

В обоих случаях наибольшую эффективность показывает модель на основе %ПСАсв. Величина AUC для % ПСАсв в системе Fujirebio Diagnostics составляет 0,643, а в системе на основе микрочипа – 0,693. Хотя эти различия не были статистически значимы, тенденцию к более высоким показателям проявляла тест-система на основе микрочипа. Кроме того, новая система имела больший показатель диагностической специфичности для ПСАобщ и %ПСАсв, чем традиционная иммуноферментная система. При фиксированном значении чувствительности, принятом за 92,6 %, и при близких значениях порога (табл. 2), диагностическая специфичность %ПСАсв и ПСАобщ для тест-системы Fujirebio Diagnostics составила 17,6 и 14,0 % соответственно, а для тест-системы в формате микрочипа – 32,3 и 26,5 % соответственно. При этом ПСАсв имел в двух тест-системах одинаково низкий показатель специфичности: 17,7 % для Fujirebio Diagnostics и 17,6% для «ОМ-Биочип (ПСА)».

Сравнение диагностической эффективности двух тест-систем проводили также и на основании многофакторной модели, учитывающей одновременно несколько факторов: ПСАобщ, ПСАсв, %ПСАсв и возраст больного. На рис. 3 приведены ROC-кривые для ПСАобщ, ПСАсв, %ПСАсв и для многофакторной модели на основе логистической регрессии, учитывающей указанные 4 фактора (LR4), (А) для иммуноферментной системы Fujirebio Diagnostics и (Б) для системы «ОМ-Биочип (ПСА)». Сравнение величины площади под ROC-кривыми показало, что в случае системы в формате микрочипа наибольшую площадь дает кривая для многофакторной модели LR4. Величина площади AUC для LR4 составила 0,725, тогда как для однофакторных моделей ПСАобщ, ПСАсв, %ПСАсв площади под кривыми составили 0,586; 0,569 и 0,693 соответственно. В случае Fujirebio Diagnostics многофакторная модель не дала преимуществ по сравнению с однофакторной моделью, учитывающей % ПСАсв (AUC для LR4 – 0,642, а для %ПСАсв – 0,643). При попарном сравнении ROC-кривых многофакторных моделей двух систем можно видеть, что большую площадь под кривой, а следовательно, и большую диагностическую эффективность показывает система в формате микрочипа (рис. 4).

Таблица 2

Сравнение диагностической специфичности тест-систем Fujirebio Diagnostics (ИФА) и в формате микрочипа при фиксированном значении чувствительности (92,6%)

Параметр	Чувствительность, 92,6%			
	Специфичность, %		Порог (cut-off)	
	ИФА	микрочип	ИФА	микрочип
ПСАобщ	14,0	26,5	2,2	1,6
ПСАсв	17,7	17,6	1,3	1,9
%ПСАсв	17,6	32,3	24,4	26,2

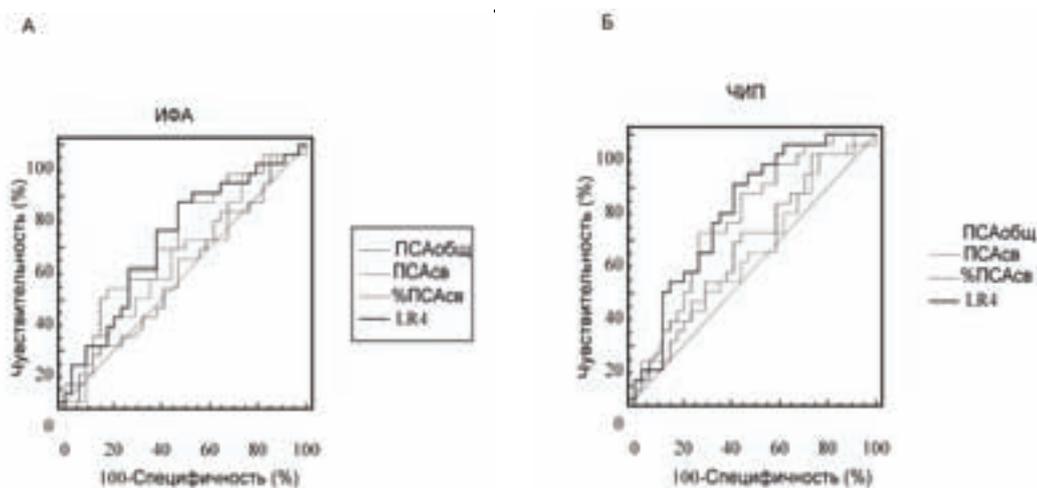


Рис. 3. Сравнение ROC-кривых для ПСАобщ, ПСАсв, %ПСАсв и для многофакторной модели логистической регрессии, учитывающей 4 фактора:

А: для тест-системы Fujirebio Diagnostics (ИФА).

Б: для тест-системы «ОМ Биочип (ПСА)» (ЧИП).

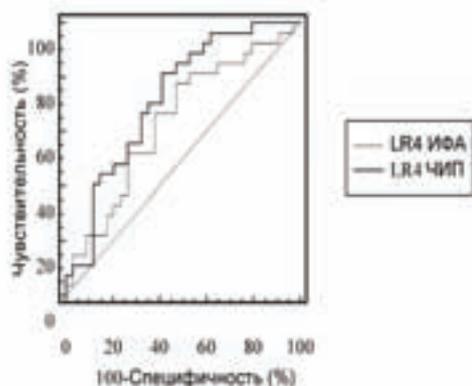


Рис. 4. Сравнение ROC-кривых для многофакторной модели логистической регрессии, учитывающей 4 фактора, для систем Fujirebio Diagnostics (ИФА) и в формате микрочипа (ЧИП).

Значения AUC для ROC-кривых многофакторных моделей равны: 0,642 (Fujirebio Diagnostics) и 0,725 («ОМ-Биочип (ПСА)»).

При одинаковой чувствительности (92,6%) многофакторная модель новой диагностической системы в наших исследованиях имела более высокий показатель специфичности (41,1%), чем многофакторная модель коммерческой иммуноферментной системы Fujirebio Diagnostics (17,6%).

Кроме того, многофакторная система в формате микрочипа имела показатель специфичности выше, чем % ПСАсв (41,1 и 32,3 % соответственно), который, как известно, играет значительную роль в диагностике РПЖ больных, чьи показатели ПСАобщ находятся в «серой зоне».

Заключение

Таким образом, тест-система в формате микрочипа «ОМ-Биочип (ПСА)» позволяет определять уровни опухолевых маркеров и получать результаты, сравнимые с результатами, полученными в традиционной иммуноферментной тест-системе Fujirebio Diagnostics. С помощью моделей логистической регрессии показано, что тест-система в формате микрочипа имеет диагностическую эффективность, сопоставимую с таковой тест-системы Fujirebio Diagnostics и в некоторых случаях превосходит последнюю по показателю специфичности (ПСАобщ и %ПСАсв). Значения площадей под ROC-кривыми для модели логистической регрессии равны 0,642 (Fujirebio Diagnostics) и 0,725 «ОМ-Биочип (ПСА)».

Литература

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России и стран СНГ // Вестник РОНЦ им.Н.Н.Блохина РАМН.-2008.- №2.-С.52
2. Мирзабеков А.Д., Рубина А.Ю., Паньков С.В. Композиция для полимеризационной иммобилизации биологически значимых соединений и способ ее осуществления. Пат. W0 03/033539, БИ. 2003. №32.
3. Осипова Т.В., Рябых Т.П., Барышников А.Ю. Диагностические микрочипы: их применение в онкологии // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2006. – Т. 5, № 3. – С. 72–81.
4. Паклин Н.Б., Орешков В.И. Бизнес-аналитика: от данных к знаниям. – СПб.: Питер, 2009. – 624 с.
5. Рябых Т.П., Осипова Т.В., Дементьева Е.И. и др. Тест-система в формате биочипа для одновременного количественного определения общей и свободной форм простата-специфического антигена в сыворотке крови // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 49–57.
6. Catalona W.J., Smith D.S., Wolfert R.L. et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening // JAMA. – 1995. – 274. – P. 1214–20.
7. Catalona W.J., Partin A.W., Slawin K.M. et al. Use of percentage of free prostate specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostate disease; a prospective multicenter clinical trial // JAMA – 1998. – 279. – P. 1542–47.
8. Gann P.H., Hennekens C.H., Stampfer M.J. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostate cancer // JAMA. – 1995. – 273. – P. 289–94.
9. Gann P.H., Ma J., Catalona W.J., Stampfer M.J. Strategies combining total and percent free prostate specific antigen for detecting prostate cancer: A prospective evaluation // The journal of Urology. – 2002. – 167(issue 6). – P. 2427–34.
10. Kingsmore S.F. Multiplexed protein measurement: technologies and application of protein and antibody assays // Nat.Rev.DrugDiscov. – 2006. – 5. – P. 310–20.
11. Lilja H. Significance of different molecular forms of serum PSA/The free, noncomplexed form of PSA versus that complexed to alpha 1-antichymotrypsin // Urol. Clin.North Am. – 1993. – 20. – P. 681–6.
12. Mitrunen K., Pettersson K., Piironen T. et al. Dual-Label One-Step immunoassay for simultaneous measurement of free and total prostate-specific antigen concentration and ration in serum // Clin. Chem. – 1995. – 41(8). – P. 1115–20.
13. Metz C.E. Basic Principles of ROC analysis // Semin.Nucl. Med. – 1978. – 8 – P. 283–98.
14. Osipova T., Ryabykh T., Rubina A. Et al. Biochip-based test-system for prostate cancer diagnostics. In.: New Aspects of Biotechnology and Medicine. New York: Nova Science Publishers, Inc, 2007. – Carter III. – P. 15–28.
15. Osipova T., Sokolova Z., Ryabykh T. et al. Biochip-based test-system for cancer diagnostics .Simultaneous of total and free forms of prostate-specific antigen // Technical Proceeding of the 2008 Nanotechnology Conference and Trade Show. – 2008. – 2. – P. 30–3.
16. Stenman U.H., Leinonen J., Alfthan H. et al. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1 antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostate cancer // CancerRes. – 1991. – 51. – P. 222–6.
17. Stephan C., Klaas M., Muller C. Interchangeability of measurements of total and free prostate-specific antigen in serum with 5 frequently used assays combination: up date // Clin.Chem. – 2006. – 52. – P. 59–64.
18. Strobel S., Smith K., Wolfert R. et al. Role of free PSA in Discordance Across commercial PSA assays // Clin.Chem. – 1996. – 42(4). – P. 645–6.
19. Tsao R.C., Wu T.L., Chang P.Y. et al. Detection of carcinomas in a asymptomatic Chinese population: advantage of screening with multiple tumor markers // J.Clin.Lab.Anal. – 2006. – 20. – P. 42–6.
20. Wang M.C., Valenzuela L.A., Murphy G.P. et al. Purification of a human prostate specific antigen // Invest.Urology. – 1979. – 17. – P. 159–63.
21. Zweig M.H., Campbell G. Receiver-operating characteristics (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine // Clin.Chem. – 1993. – 39. – P. 561–77.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ
РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 579.8:616-006-092.9:612.42

V.A. Galynkin¹, N.V. Kozhemyakina², E.P. Ananjeva², S.V. Gurina²
ДЕЙСТВИЕ УГЛЕВОДНЫХ ФРАКЦИЙ МИЦЕЛИЯ *FOMES FOMENTARIUS*
И *GANODERMA APPLANATUM*

НА РОСТ ПОДКОЖНО ПЕРЕВИТОЙ ОПУХОЛИ ЭРЛИХА У МЫШЕЙ¹ГИПРОРЫБФЛОТ, Санкт-Петербург²Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия**Контактная информация**

Галынкин Валерий Абрамович, д-р техн. наук, заведующий лабораторией технической микробиологии

Адрес: 190000, Санкт-Петербург, ул. Малая Морская, д. 18; тел. +7(812)595-44-17

e-mail: beilis82@inbox.ru

Статья поступила 14.10.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Изучено действие углеводов фракций, выделенных из мицелия грибов *Fomes fomentarius* и *Ganoderma applanatum*, на рост подкожно перевитой солидной опухоли Эрлиха. Показано, что растворимая фракция мицелия *G. applanatum* вызывала статистически достоверное торможение роста опухоли и обладала выраженным противоопухолевым эффектом, нерастворимые фракции *F. fomentarius* и *G. applanatum* соответственно оказывали слабое противоопухолевое действие. Установлено, что фракции при внутрибрюшинном введении оказывали стимулирующее действие на функциональную активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов, причем более выраженный активирующий эффект на макрофаги оказывала растворимая фракция *G. applanatum*.

Ключевые слова: базидиомицеты, солидная опухоль Эрлиха, система мононуклеарных фагоцитов, макрофаги.

V.A. Galynkin¹, N.V. Kozhemyakina², E.P. Ananjeva², S.V. Gurina²
EFFECT OF POLYSACCHARIDES FRACTIONS FROM *FOMES FOMENTARIUS*
AND *GANODERMA APPLANATUM*
ON GROWTH EHRLICH SOLID TUMOR IN MICE

¹GIPRORYBFLOT, St.Petersburg²Department of Microbiology, St.Petersburg State Chemical-Pharmaceutical Academy**Abstract**

Effect of carbohydrate fractions from mycelium of higher Basidiomycetes *Fomes fomentarius* and *Ganoderma applanatum* on Ehrlich's solid tumor growth was investigated. We present evidence, that administration of soluble fraction of *Ganoderma applanatum* results in significant Ehrlich's solid tumor growth inhibition. In tumor model insoluble fractions had weak antitumor activity. The aqueous extracts have been shown to have a stimulative effect on functional activity of reticuloendothelial system when it was administrated intraperitoneally. However, the soluble fraction had more significant effect on macrophage activation.

Key words: Basidiomycetes, Ehrlich's solid tumor, reticuloendothelial system, macrophages.**Введение**

В народной медицине стран Юго-Восточной Азии базидиальные грибы с давних времен использовались для лечения различных заболеваний. Трутовик настоящий (*Fomes fomentarius*) применяли при диспепсии, раке желудка, пищевода, матки, при геморроях; трутовик плоский (*Ganoderma applanatum*) – при раке пищевода, туберкулезе как болеутоляющее и жаропонижающее средство [1]. Биологическую активность грибов связывают с присутствием в их плодовых телах и мицелии ряда компонентов, одними из которых являются полисахариды. Установлено, что грибные гликаны обладают иммуностимулирующими, противовирусными, антибиотическими, гиполипидемическими, гепатопротекторными и противоопухолевыми свойствами, способны регулировать работу сердечно-сосудистой, дыхательной и нервной систем [9; 12; 13]. В настоящее время препараты на основе грибных гликанов широко применяют в комплексной терапии раковых больных и в качестве средства поддерживающей терапии [12; 13; 14]. Существенным достоинством грибных гликанов помимо действия на опухоли является способность значительно снижать побочные

эффекты химио- и радиотерапии, а также отсутствие токсичности [14]. На основании последних исследований можно сделать предположение о наличии у грибных полисахаридов прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки, что, вероятно, связано с остановкой клеточного цикла и активацией процесса апоптоза [7; 11].

Однако в большинстве случаев грибные гликаны классифицируют как модификаторы биологического ответа, их противоопухолевое действие осуществляется за счет стимулирования иммунной системы, в частности макрофагов, Т-лимфоцитов, НК-клеток и индукции экспрессии генов некоторых цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α), усиливающих защитные реакции организма [8; 10; 13].

Цель исследования – экспериментальное изучение действия полисахаридных фракций, выделенных из мицелия грибов *Fomes fomentarius* и *Ganoderma applanatum*, в отношении солидной опухоли Эрлиха в эксперименте *in vivo*. Задачи исследования: изучение влияния полисахаридных фракций на рост перевитой солидной опухоли Эрлиха; модулирование одного из важнейших элементов противоопухолевой защиты – функциональной активности перитонеальных макрофагов.

Материалы и методы

В работе изучали мицелиальную культуру базидиомицетов *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. штамм 9 и *Fomes fomentarius* (L.:Fr.) Fr. штамм 6 из коллекции Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического Университета). Мицелий грибов получали методом глубинного культивирования [3]. В качестве объекта исследования использовали углеводные фракции, выделенные из мицелия путем водной экстракции, отличающиеся по моносахаридному составу и растворимости, а именно РФр и НФр *G. applanatum* и нерастворимый гликан *F. Fomentarius*. РФр *G. applanatum* представляла собой смесь гетерополисахаридов, состоящих из глюкозных, маннозных и галактозных остатков, нерастворимые фракции – хитин-глюкановый комплекс, причем основным углеводным компонентом фракций являлась глюкоза (45–79 %). В эксперименте были использованы белые нелинейные мыши-самцы в возрасте 2,5–3,0 мес. с массой тела 22–30 г (питомник «Рапполово» РАМН). Опухоль Эрлиха была перевита подкожно введением 0,2 мл 10 %-ной взвеси клеток асцитной опухоли Эрлиха в стерильном физиологическом растворе. В исследовании были использованы 4 группы животных. Мыши 1 группы служили контролем. Мышам 2; 3 и 4 группы вводили соответственно фракции внутрибрюшинно ежедневно в течение 5 дней, начиная с 48 ч после перевивки опухоли. Все гликаны вводили в дозе 50 мг/кг в стерильном физиологическом растворе из расчета 0,4 мл раствора на 20 г массы тела мыши. Мышам контрольной группы вводили внутрибрюшинно физиологический раствор в те же сроки и в том же объеме. С 7 дня после перевивки опухоли у всех мышей производили измерение размеров опухоли с определением её объема по формуле:

$$V = A \times B^2 \times \frac{\pi}{6}, \text{ где}$$

A: наибольший размер опухоли, мм,
B: перпендикулярный ему размер, мм.

Измерения опухолей производили до 21 дня после перевивки – дня начала гибели мышей от опухоли. Противоопухолевую активность оценивали по проценту ТРО, индексу эффективности и индексу роста опухоли [5; 6]. Процент торможения роста опухоли (ТРО%) определяли по формуле:

$$T\% = \frac{V_k - V_{\Sigma}}{V_k} \times 100, \text{ где}$$

V_{Σ} : средний объем опухоли в группе мышей, получавших гликаны,

V_k : средний объем опухоли у мышей контрольной группы.

ИЭ, или индекс торможения, определяли по формуле:

$$ИЭ = \frac{V_k}{V_{\Sigma}}, \text{ где}$$

V_{Σ} : средний объем опухоли в группе мышей, получавших гликаны,

V_k : средний объем опухоли у мышей контрольной группы.

ИРО определяли по формуле:

$$ИРО = \frac{S_{\Sigma}}{S_k}, \text{ где}$$

S_{Σ} : площадь под кинетической кривой роста опухоли в группе мышей, получавших гликаны, мм².

S_k : площадь под кинетической кривой роста опухоли мышей контрольной группы, мм².

Для измерения площади под кинетической кривой роста опухоли использовали метод трапеций, базирующийся на формуле:

$$S = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{V_i + V_{i+1}}{2} \times t_i = \frac{V_1 + V_2}{2} \times t_1 + \frac{V_2 + V_3}{2} \times t_2 + \dots + \frac{V_{n-1} + V_n}{2} \times t_{n-1}, \text{ где}$$

V_i : объем опухоли в соответствующем измерении под номером i , мм³,

n – число измерений,

t_1 – время между первым и вторым измерениями, сутки,

t_2 – время между вторым и третьим измерениями, сутки,

t_{n-1} – время между предпоследним и последним измерениями, сутки.

Иммунобиологическую активность углеводных фракций оценивали по их влиянию на показатели функциональной активности перитонеальных макрофагов мышей, отражающие стадии фагоцитоза: хемотаксис, распластывание на стекле, микробактерицидность по отношению к живым клеткам *Staphylococcus aureus* (штамм 209) и поглотительную способность по отношению к убитым нагреванием клеткам *Candida albicans* (штамм АТСС 855-263). Перитонеальные клетки макрофагов получали промыванием брюшной полости мышей синтетической средой 199, содержащей 20% сыворотки крупного рогатого скота, антибиотик (200 Ед/мл канамицина) и гепарин в концентрации 5 Ед/мл (рН среды 7,7). Клетки культивировали в монослое в течение 2 суток и затем оценивали их морфофункциональные изменения [2]. Все полученные в работе результаты обрабатывали методом вариационной статистики с вычислением среднего арифметического для каждой группы опытов и стандартного отклонения от среднего арифметического. Достоверность различий между контрольными и опытными измерениями оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента. Достоверными считались различия между группами при $p < 0,05$. Повторность всех экспериментов составляла не менее 5 раз [4].

Результаты и обсуждение

При изучении противоопухолевой активности было установлено, что ежедневное в течение 5 дней введение углеводных фракций не отразилось на общем состоянии мышей, их поведении, потреблении корма и воды. Это свидетельствовало о хорошей переносимости полисахаридов.

В контрольной группе после перевивки наблюдали быстрый рост опухоли, гликаны вызывали замедление роста по сравнению с контролем. По результатам измерения объема опухоли в динамике (наблюдение в течение 21 дня) было установлено, что наиболее выраженным противоопухолевым эффектом обладала РФр *G. applanatum*, она вызывала статистически достоверное торможение роста опухоли на все сроки наблюдения, причем процент торможения достигал 58 % уже на 10 сутки после перевивки. НФр *G. applanatum* и *F. fomentarius* оказывали менее выраженный ингибирующий эффект на рост опухоли (ТРО 31–39 %), статистически достоверное торможение роста опухоли под действием фракций наблюдали на более поздних сроках эксперимента (17–19 сутки; рис. 1).

При оценке показателя индекса эффективности наблюдали ту же тенденцию, что и при измерении Т%, что свидетельствовало об умеренной противоопухолевой активности НФр *F. fomentarius* и *G. applanatum* и о достаточно выраженном противоопухолевом эффекте РФр *G. applanatum* (рис. 2).

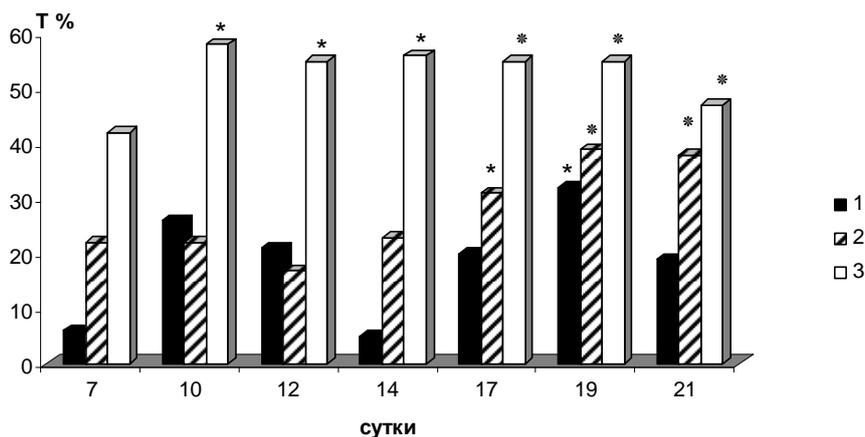


Рис.1. Динамика ТРО

X – время опыта;

Y – ТРО.

1 – НФр *F. fomentarius*; 2 – НФр *G. applanatum*; 3 – РФр *G. applanatum*.

* $p < 0,05$ достоверность различий показателей по сравнению с показателями в контрольной группе животных;

* $p < 0,01$ достоверность различий показателей по сравнению с показателями в контрольной группе животных.

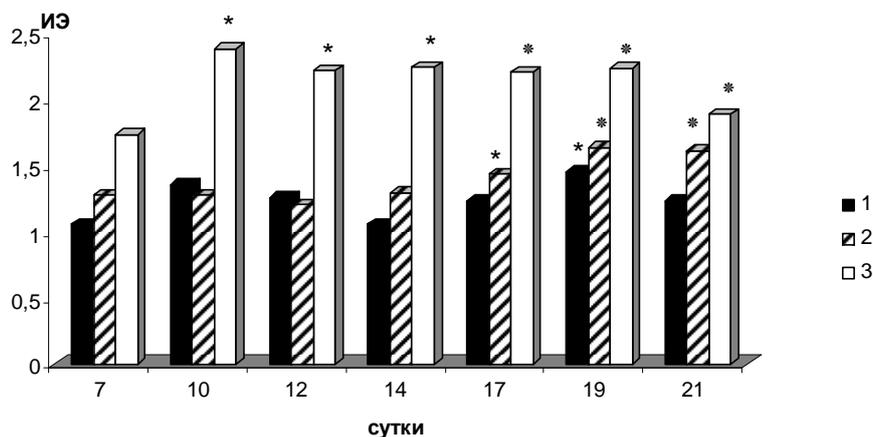


Рис. 2. Динамика изменения индекса эффективности препаратов:

X – время опыта;

Y – индекс эффективности препаратов.

1 – НФр *F. fomentarius*; 2 – НФр *G. applanatum*; 3 – РФр *G. applanatum*.

* $p < 0,05$ достоверность различий показателей по сравнению с показателями в контрольной группе животных;

* $p < 0,01$ достоверность различий показателей по сравнению с показателями в контрольной группе животных.

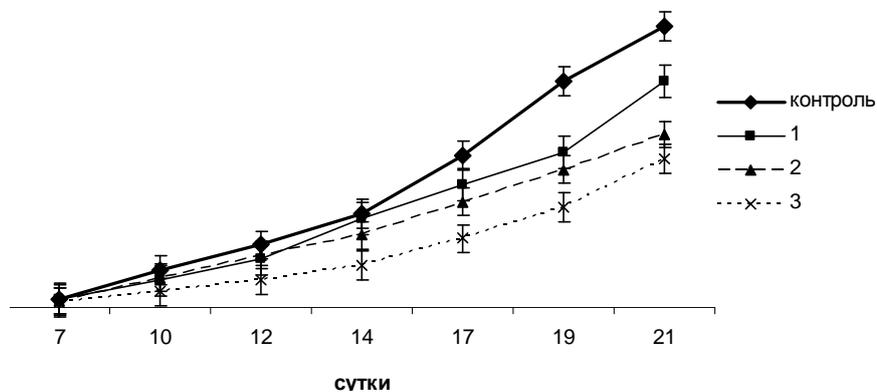


Рис. 3. Кинетические кривые роста опухолей:

X – время опыта;

Y – объём опухолей, мм³.

1 – НФр *F. fomentarius*; 2 – НФр *G. applanatum*; 3 – РФр *G. applanatum*.

Процент ТРО и индекс эффективности отражают выраженность терапевтического действия препаратов, однако для того, чтобы оценить совокупный эффект противоопухолевой терапии необходимо учитывать и его продолжительность. Для оценки динамики изменения объемов опухолей в опытной и контрольной группе использовали кинетические кривые роста опухолей (рис. 3). Большую информационную ценность имеет использование показателей, которые характеризуют кинетические кривые роста опухолей не в отдельных точках, а в совокупности. Такими показателями могут служить площади под кинетическими кривыми роста опухолей [5; 6]. Интегральным критерием, учитывающим как величину, так и продолжительность противоопухолевого действия препарата, является ИРО, который рассчитывается как соотношение площадей под кинетическими кривыми роста опухолей в экспериментальной и контрольной группе. Индекс роста в контроле принимается за 1, в подопытных группах при регрессии опухоли, стабилизации или торможении ее роста он будет меньше 1, а при стимуляции – больше 1. Чем меньше ИРО, тем продолжительнее и сильнее терапевтический эффект. При введении нерастворимых фракций *F. fomentarius* и *G. applanatum* ИРО составлял 0,79 и 0,68 соответственно (площади под кинетическими кривыми роста опухолей составляли соответственно 79 и 68 % по отношению к контролю) и разница между опытом и контролем не являлась статистически достоверной. При применении РФр *G. applanatum* ИРО с высокой степенью достоверности ($p < 0,01$) отличался от контрольных значений и составлял 0,46 (46 % по отношению к контролю), следовательно, наиболее устойчивым и выраженным противоопухолевым действием обладала РФр *G. applanatum*. Таким образом, наиболее выраженную противоопухолевую активность в отношении солидной опухоли Эрлиха проявляла РФр *G. applanatum*, нерастворимые углеводные фракции *F. fomentarius* и *G. applanatum* соответственно оказывали слабое противоопухолевое действие. Иммунобиологическую активность углеводных фракций изучали по их влиянию на функциональную активность перитонеальных макрофагов мышей в динамике в течение 10 суток после их введения. Фракции достоверно стимулировали функциональную активность макрофагов в течение всего срока наблюдения (10 дней). Наиболее эффективна была РФр *G. applanatum*, при её введении показатели хемотаксиса и активации цитоплазматической мембраны макрофагов (распластывания) достигали максимальных значений на 5 сутки эксперимента: количество перитонеальных клеток в брюшной полости увеличивалось в 2,9 раза ($p < 0,01$), количество распластанных макрофагов – в 2 раза по сравнению с контрольным уровнем ($p < 0,01$).

Литература

1. Денисова Н.П. Лечебные свойства грибов. Этномикологический очерк. – СПб: Изд. СПбГМУ, 1998. – 59 с.
2. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля; пер. с нем. А.П. Тарасова. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
3. Кожемякина Н.В., Гурина С.В., Ананьева Е.П. Глубинное культивирование некоторых базидиомицетов // Тез. докл. II съезда микологов России... – М., 2008. – Т. 2. – С. 330.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
5. Стуков А.Н., Иванова М.А., Никитин А.К. Индекс роста опухоли как интегральный критерий...//Вопросы онкологии. – 2001. – Т. 47, № 5. – С. 616–8.
6. Стуков А.Н., Иванова М.А., Никитин А.К. Оценка эффекта противоопухолевой терапии в эксперименте на основании площади под кинетической кривой роста опухоли//Матер. 5-го Всерос. съезда онкологов. – Казань, 2000. – Т. 1. – С. 226–7.
7. Chen W., Zhao Z., Chen S., Li Y. Optimization for the production of...//Bioresour. Technol. – 2008. – 99(8). – P. 3187–94.
8. Kidd P.M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment // Altern. Med. Rev. – 2000. – 5. – P. 4–27.
9. Mizuno T. The extraction and development of...//Int. J. of Medicinal Mushrooms. – 1999. – 1 – P. 195–206.
10. Monro J.A. Treatment of cancer with mushroom products // Arch. Environ. Health. – 2003. – 58(8). – P. 533–7.
11. Muller C.I., Kumagai T., O'Kelly J. et al. Ganoderma lucidum causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells // Leukemia research. – 2006. – 30(7). – P. 841–8.
12. Reshetnikov S.V., Higher Basidiomycota as a source of antitumor... // Int. J. Med. Mush. – 2001. – 3. – P. 361–94.
13. Wasser S.P., Weis A.L. Medical properties of substances...// Int. J. of Medicinal Mushrooms. – 1999. – 1 – P. 31–62.
14. Wasser S.P. Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*); Encyclopedia of Dietary Supplements. – NY: Marcel Dekker Inc., 2005. – P. 603–21.

К 10 суткам показатели несколько снижались, сохраняясь достоверно выше контроля ($p < 0,01$). Нерастворимые фракции оказывали менее выраженное стимулирующее действие на макрофаги, чем РФр, но обладали пролонгированным эффектом, который сохранялся вплоть до 10 суток эксперимента. Микробицидные функции макрофагов под влиянием гликанов оценивали по отношению к *S. aureus*. Сравнивали выживаемость клеток *S. aureus* при контакте со стимулированными полисахаридами макрофагами и макрофагами, полученными от контрольной группы. Фагоцитарную активность оценивали по интенсивности поглощения макрофагами убитых нагреванием клеток *C. albicans*. Исследуемые фракции достоверно увеличивали микробицидный эффект и поглощательную способность макрофагов. Процент фагоцитирующих клеток после введения фракций увеличивался в 1,4–2,1 раза по сравнению с контролем, микробицидный эффект фагоцитов повышался в 2,6–3,5 раза ($p < 0,01$), причем наиболее активна была РФр *G. applanatum*. Таким образом, углеводные фракции, выделенные из мицелия исследуемых грибов, проявляли различное по степени активации действие на функциональный статус макрофагов. Растворимая фракция мицелия *G. applanatum* оказывала более заметное активирующее действие на макрофаги по сравнению с нерастворимыми гликанами, но при этом эффект нерастворимых фракций был более длительным. На основании полученных результатов можно сделать предположение о том, что способность грибных гликанов активировать макрофаги, клетки неспецифической противоопухолевой резистентности, может иметь отношение к механизму ингибирования опухолевого роста.

Выводы

Растворимая полисахаридная фракция *G. Applanatum* обладает выраженным противоопухолевым эффектом в отношении солидной опухоли Эрлиха, нерастворимые фракции *G. applanatum* и *F. Fomentarius* обладают слабой противоопухолевой активностью. Полисахаридные фракции, выделенные из мицелия, обладают выраженным стимулирующим действием на клетки системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ), в частности перитонеальные макрофаги мышей, что проявляется в увеличении показателей их функциональной активности. Растворимая полисахаридная фракция *G. applanatum* более активна по сравнению с нерастворимыми фракциями. Ингибирование опухолевого роста под действием гликанов может быть связано с активацией макрофагов, участвующих в неспецифической противоопухолевой резистентности.

УДК 616.995.122-092.9:615.277.4

Е.Д. Хадиева¹, И.Р. Лукманов¹, А.Х. Сабиров², К.О. Шилин², В.П. Зуевский¹, В.Л. Янин¹, В.Г. Бычков²
**МОДЕЛИРОВАНИЕ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЖКТ
 У СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ НА ФОНЕ СУПЕРИНВАЗИОННОГО ОПИСТОРХОЗА**

¹ГОУ ВПО Ханты-Мансийская государственная медицинская академия²ГОУ ВПО Тюменская государственная медицинская академия Минздрава России**Контактная информация:**

Хадиева Елена Дмитриевна, канд. мед. наук, ассистент кафедры судебной медицины и патологической анатомии

Адрес: 628012, Ханты-Мансийск, ул. Калинина, 40; тел: +7(3467)139-03-24

e-mail: hadieva ed @ okb hmao.ru

Статья поступила 19.01.2011., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Посредством канцерогена MNNG на фоне суперинвазионного описторхоза у сирийских хомяков моделировали ГИСО ЖКТ.

В плазме крови у животных с описторхозом обнаружены мутация гена *c-kit*, экспрессия генов VEGFR и EGFR. ГИСО различных морфологических типов возникли в желудке только при сочетании канцерогена и суперинвазионного описторхоза у 18 из 20 животных, 2 опухоли высокого риска рецидива метастазировали в печень.

Ключевые слова: экспериментальный описторхоз, канцерогенез, ГИСО, желудок.

E.D. Khadieva¹, I.R. Lukmanov¹, A. Kh. Sabirov², K.O. Shilin², V.P. Zuevskiy², V.L. Yanin¹, V.G. Bychkov²
**MODELLING GISTS AT SYRIAN HAMSTERS AGAINST
 A BACKGROUND SUPERINVASIVE OPISTHORCHIOSIS**

¹Khanty-Mansiysk State Medical Academy²Tyumen State Medical Academy**Abstract**

By the means of the cancerogen MNNG against the background of the superinvasive opisthorchiosis at the Syrian hamsters were modeled gastrointestinal stromal tumors of the gastrointestinal tract.

At the animals with the opisthorchiosis was revealed the mutation of the *c-kit* gene, at the paraffin sections of the tumors were revealed the mutations of *c-kit* gene, the expression VEGFR, EGFR, GISTS of the different morphological types occurred only in the stomach of 18 of 20 animals, 2 tumors with the high risk of repetition metastasited into the liver.

Key words: experimental opisthorchiosis, cancerogenesis, GISTS, stomach.

Введение

Стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, экспрессирующие онкомаркеры *c-kit* / CD 117, DOG1 и ассоциированные с PDGFRa-мутациями выделены в самостоятельную нозологическую единицу и включены в классификацию ВОЗ опухолей ЖКТ под названием ГИСО ЖКТ [1; 2; 4; 5; 10].

Выявлены различные морфологические варианты ГИСО и их прогностическое значение [8; 9]. В литературе имеются единичные публикации по результатам моделирования ГИСО на мышах [9], однако лучшим объектом для индуцирования опухолей различного гистогенеза является сирийский хомяк [7].

Цель работы – разработать способ моделирования ГИСО и выявить роль суперинвазионного описторхоза в развитии ГИСО при воздействии MNNG у сирийских хомяков.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проведено на 60 сирийских хомяках *Mesocricetus auratus Waterhouse* 1839, массой 122,2 ± 3,2 г, содержащихся на стандартной диете вивария.

Животные разделены на 4 группы: 1 – контрольная (10); хомяки 2 группы (20) заражены per os 50 метацеркариями описторхисов, суперинвазии (50 личинок) через 7, 14, 25 и 60 сут после первич-

ного заражения; 3 группа: заражение 50 метацеркариями, после 7 сут суперинвазии через зонд в желудок вводили 1,5 мл 0,1 % раствора MNNG четырекратно в течение 4 мес., через 14 сут после каждого введения канцерогена производили суперинвазии 50 метацеркариями, т.е. моделирование опухолей выполнялось при помощи желудочного канцерогена (инициатор) на фоне суперинвазионного описторхоза, который является сильным промотором в холангиоканцерогенезе [6]; 4 группу составили животные (10), которым вводили только MNNG по указанной схеме.

Под эфирным наркозом животных забивали на 62, 90, 240, 320 сутки эксперимента. При вскрытии трупов хомяков, проводили макроскопическое исследование внутренних органов.

Материал фиксировали в жидкости Карнуа, 10% растворе нейтрального формалина и спирте. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, альциановым синим, реактивами Шиффа по МакМанусу и по Ван-Гизону. Митотический индекс подсчитывали в %. Молекулярно-генетические исследования выполнены в ООО «Центр молекулярно-генетической диагностики А.Х. Сабирова» (г. Тюмень). VEGFR определяли в плазме крови сирийских хомяков с описторхозной инвазией (62 сут) посредством микросорбентного анализа ELISA (тест-система Biosource фирмы Invitrogen) на микропланшетном ридере Anthos 2020.

Состояние эпидермального фактора роста выявляли с использованием праймеров для 18, 19, 20, 21 экзонов гена EGFR и праймеров для 9, 11, 13, 17 экзонов гена *c-kit*, выделение ДНК из ткани опухоли проводили по классической фенольно-хлороформной методике, амплификацию и секвенирование выполняли методом ПЦР на генетическом анализаторе 313 XL.Applera фирмы Applied Biosystems (США) с 160 сут эксперимента.

Определяли локализацию, размеры, гистологические варианты ГИСО, подсчитывали индекс митотической активности в промилях, в 10 полях зрения при увеличении 400 выявляли экспрессию маркеров пролиферативной активности клеток по Ki-67 в процентах. Иммуноморфологическим методом выявляли экспрессию CD117, виментина, цитокератинов, CD34, гладкомышечного актина, десмина, белка S100, NSE.

Исследование выполнено с антителами производства фирмы «Dako» (Дания). Статистический анализ полученных результатов проводили посредством программы SPSS 9.0 (SPSS Inc., USA, 1999).

Результаты и обсуждение

Патоморфологические изменения желудка и печени в острой фазе СО и в сочетании с затравкой MNNG и N – DMNA описаны ранее [3; 6]. Выявлено, что СО является промотором при индуцировании канцерогенеза печени и слизистой желудка.

Ophiorhynchus felineus вызывает пролиферацию коммитированных клеток печени с 10 сут инвазии, дифференцирующихся преимущественно в холангиоциты. С 180 сут после поступления канцерогенов у сирийских хомяков развивались эпителиальные опухоли, у животных с СО без канцерогенов и с канцерогенами без паразитов опухоли не возникали [6].

С 62 сут суперинвазионного описторхоза в стенке желудка выявляются клетки овальной или неправильной формы с медианой по длине 36,72±2,17 Pиx, CV – 3,01±1,12, в поперечнике 17,32±2,01 Pиx, CV-14,04±2,13, не секретирующие слизь. Клеточные элементы образовали отдельные узелки в мышечном слое желудка, отесняя волокна. В слизистой и подслизистой оболочках желудков животных всех групп определяются однотипные изменения, описанные ранее [3].

На 90 сут эксперимента у хомяков 3 группы (СО + MNNG) в слизистой пилорического отдела желудка наблюдались дистрофические, пролиферативные, диспластические и воспалительные изменения с тканевой эозинофилией.

Наиболее выраженные изменения в стенке желудка возникали после 280 сут после введения канцерогена. На фоне СО в теле и пилорическом отделе желудка пальпаторно определялись мягковатой консистенции образования серовато-розового цвета, размером 0,4×2,6, 1,3×2,6 см (2 наблюдения опухолей на 240 сут после затравки канцерогеном); после 320 сут эксперимента на малой кривизне, ближе к пилорическому отделу желудка выявлена опухоль плотной консистенции с четкими границами, округлой формы диаметром 2,3 см; другое новообразование расположено на расстоянии 1,5 см, в пилорическом отделе желудка, мягковатой консистенции с четкими границами, кроме того, в одной из лопастных долей печени обнаружено образование с четкими границами, округлой формы, диаметром 1,7 см.

За весь период эксперимента (320 сут) у 18 животных выявлено образование 22 опухолей (коэффициент множественности равен 1,22), все опухоли не приводили к летальному исходу; метастазы обнаружены только в печени в 2 наблюдениях (9,09%).

Гистологическое изучение опухолевых новообразований позволило разделить ГИСО на 4 варианта: 1) веретенноклеточный вариант – 9 (45,0%) наблюдений; 2) эпителиоидноклеточный вариант – 9 (45,0%); 3) миксоидный тип строения – 1 наблюдение; 4) смешанный вариант – 1 наблюдение. С очень низким риском агрессивности было 7 опухолей (35,0%), низким риском 9 (45,0%), со средним риском 2 новообразования (10,0%), метастазы которых обнаружены в печени. Индекс пролиферации клеток опухолей по Ki-67 варьировал от 2 до 14%, индекс митотической активности составил 2–8 на 10 полях зрения при большом увеличении (×400).

В парафиновых срезах опухолей выявили положительную реакцию с антигенами CD117, причем наиболее часто (16 случаев, 72,7%) выявлены мутации в 11 экзоне, в 6 наблюдениях – в 9 и 17 экзонах. В плазме крови обнаружены экспрессии генов *c-kit*, VEGFR и EGFR (18; 9; 20 экзоны).

Иммуногистохимическая характеристика экспериментальных ГИСО желудка представлена в таблице и на рис. 1–4 (см. вклейку).

Таблица

Иммуногистохимический профиль ГИСО желудка

Варианты опухолей	Иммуногистохимические маркеры								
	CD117	белок S100	CD 34	виментин	десмин	PanCk	актин	NFP	NSE
Веретенноклеточный	+	+/-	+/-	+	-/+	-	+/-	+/-	-
Эпителиоидно-клеточный	+	+/-	+/-	+	-/+	-	+/-	+/-	-
Миксоидный	-/+	-	-	+	-/+	-	-/+	-/+	-
Смешанный	+	-	+/-	+	-/+	+	+/-	+/-	-

Заключение

Получена оптимальная модель ГИСО посредством канцерогена (MNNG), являющегося инициатором онкогенеза, и промотора – суперинвазионного описторхоза, обеспечивающего перманентную пролиферацию пейсмекерных клеток Кахаля на фоне генных мутаций, прежде всего, гена *c-kit*, экспресси-

рующего белок CD117 – маркера ГИСО. Следует отметить, что в экспериментальных моделях встретились CD117-негативные опухоли, поэтому в практике следует применять более специфичные для ГИСО маркеры, например, DOG1 [10]. Моделирование ГИСО ЖКТ позволит расширить поиск наиболее эффективных средств для лечения больных при данной онкологической нозоформе.

Литература

1. Анурова О.А., Снизур П.В., Филиппова Н.А., Сельчук В.Ю. Морфологическая характеристика стромальных опухолей желудочно-кишечного тракта // Архив патологии. – 2006. – 68(1). – С. 10–3.
2. Братанчук С.Ю., Мацко Д.Е., Имянитов Е.Н и др. Гастроинтестинальная стромальная опухоль пищевода // Архив. патол. – 2007. – 69. – Вып. 1. – С. 47–8.
3. Зуевский В.П. Патоморфология поражений желудка при различных формах описторхоза и их роль в канцерогенезе. Автореф. дис. ...д-ра мед. наук. – Тюмень-Сургут, 1995. – 36 с.
4. Кадушев Б.К. Неэпителиальные опухоли желудка (клиника, диагностика, лечение). Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М, 2004. – 24 с.
5. Кравцов В.Г., Зайратьянц О.В., Ширин Х. и др. Иммуноморфологическая характеристика и критерии прогноза гастроинтестинальных стромальных опухолей // Архив патологии. – 69(5). – С. 25–8.
6. Хадиева Е.Д. Цито- и морфогенез первичного рака печени на фоне описторхоза. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Тюмень, 2010. – 14 с.
7. Homburger F. Chemical carcinogenesis in Syrian hamsters // Progresexp. Tumor Res. (Basel). – 1972. – 16. – P. 152–75.
8. Miettinen M., Lasota J. Gastrointestinal Stromal tumors: review on morphology,
9. molecular pathology, prognosis and differential diagnosis // Arch. Med. – 2006. – 130. –P. 1466–78.
10. Sommer G., Agosti V., Ehlers I. et. al Gastrointestinal stromal tumors in a mouse model by targeted mutation of the Kit receptor tyrosine kinase // Proc. Nat. Acad. Sci USA. – 2003. – 100. – P. 6706–11.
11. West R.B., Corless C.L., Chen X. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status // Am. J. Pathol. – 2004. – 165. – P. 107–13.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.37-006.6-036:577.2.088

*Е.В. Степанова, И.А. Файнштейн***ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМАХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ***РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация***Степанова Евгения Владиславовна, д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории НИИ ЭДнТО*

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24; тел. +7(495)324-10-65

e-mail: e_stepanova@nm.ru

Статья поступила 15.02.2011., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Цель исследования – изучить различия в экспрессии молекулярно-биологических маркеров при аденокарциномах ПЖЖ различной локализации. Иммуногистохимическим методом на парафиновых блоках, полученных от 53 больных, изучали экспрессию 7 молекулярно-биологических маркеров. Для аденокарциномы головки ПЖЖ характерна высокая экспрессия в опухолевых клетках ангиогенных факторов ТФ (77,3 %) и VEGF (59,1 %), тогда как для аденокарцином, локализованных в теле и хвосте ПЖЖ, характерна высокая пролиферативная активность опухоли (52,6 %), высокая частота экспрессии ЦОГ-2 (68,4 %) и ТФ (57,9 %). Среди молекулярно-биологических маркеров только экспрессия Bcl-2 показала прогностическую значимость. Ни один из Bcl-2⁻ больных не прожил более 1 года, тогда как среди Bcl-2⁺ пациентов таких больных оказалось 50 %. Медиана общей выживаемости для Bcl-2⁻ больных составила 5±2 мес., а для Bcl-2⁺ – 12±4 мес. (p=0,069). Дальнейшие исследования по оценке роли молекулярно-биологических маркеров у больных раком ПЖЖ являются перспективными для оптимизации тактики лечения пациентов и выбора рациональной терапии.

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, молекулярно-биологические маркеры, прогноз течения болезни.*E.V. Stepanova, I.A. Fanshtein***EXPRESSION OF BIOMOLECULAR MARKERS IN PANCREATIC ADENOCARCINOMA***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

Pancreatic adenocarcinoma is generally considered to be incurable by available treatment modalities with a 5-year survival rate of less than 4 %. Existing biomarkers are often inadequate. This article focuses on identification of biomarkers depending on the localization of cancer in pancreas. 53 patients were enrolled in this study. The high expression of angiogenic factors including TP (77,3 %) and VEGF (59,1 %) was observed in head of pancreas. The high proliferative activity of tumor (52,6 %) was the feature of piece and tail of pancreatic adenocarcinoma. In this region, we have also observed the high expression COX-2 (68,4 %) and TP (57,9 %). Among the tested biomarkers the expression of Bcl-2 was of prognostic significance. 50 % of Bcl-2⁺ patients passed one year survival. The median of survival for Bcl-2⁻ patients was 5±2 months, for Bcl-2⁺ patients – 12±4 months (p=0,069). Based on data obtained, we conclude that the expression of these and other biomarkers will be valid to optimize the treatment of patients with pancreatic adenocarcinoma of different cancer localization.

Key words: pancreatic adenocarcinoma, biomarkers, disease prognosis.**Введение**

Аденокарциномы поджелудочной железы относятся к группе опухолей плохого прогноза с 5-летней выживаемостью менее 3 % [3]. В настоящее время только полная хирургическая резекция рака поджелудочной железы является оптимальным лечением. Химиотерапия и лучевая терапия являются малоэффективными. Актуальность поисков дополнительных критериев злокачественности опухолей и прогностических факторов несомненна.

Современные наиболее значимые достижения в лечении различных злокачественных опухолей связаны с пониманием молекулярно-биологических изменений. Различия в экспрессии определенных маркеров могут объяснить, почему сравнимые по распространенности и гистологической структуре опухоли различаются по агрессивности течения заболевания. Изучение изменений в экспрессии молекулярно-биологических маркеров позволит выявить новые диагностические и прогностические факторы

для постановки раннего диагноза, оценки риска возникновения рецидивов и метастазов, назначения рациональных режимов комбинированной терапии и препаратов направленного действия [4; 7]. Особое внимание исследователей привлекает возможность получить сведения о нарушениях механизмов пролиферации, апоптоза и ангиогенеза в опухоли.

Регуляция апоптоза является комплексным многоступенчатым процессом, в который вовлечены большое количество белков. Ключевыми являются p53 и семейство белков Bcl. Белок p53 получил образное название «стража генома» [6]. Мутации p53 приводят к нечувствительности к ингибирующим рост сигналам, ослаблению чувствительности к апоптозу, генетической нестабильности. Кроме того, мутированный p53 может участвовать в блокировании клеточной дифференцировки, стимуляции ангиогенеза, иммортализации, увеличении инвазивных свойств клетки. В большинстве случаев мутации p53 можно определить по накоплению белка в ядрах опухолевых клеток.

Семейство белков Bcl-2 (Bcl-2, Bax, Bcl-x и другие) играет ключевую роль при запуске гибели клетки [8]. Различная экспрессия белков семейства Bcl-2 позволяет очень тонко регулировать апоптоз, запускаемый разнообразными вне- и внутриклеточными сигналами в различных типах тканей.

Ангиогенез – формирование сети капилляров из эндотелиальных клеток, выступающих мелкие вены – необходимое условие для дальнейшего роста опухолевого узелка, достигшего в диаметре 1–2 мм² [2]. Прорастание новых микрососудов является необходимым процессом, способствующим росту опухоли, а также увеличивающим ее метастатические способности. Ангиогенная активность опухоли обусловлена сложным балансом между ангиогенными стимулами и природными ингибиторами ангиогенеза. В опухолях находят повышенный уровень стимуляторов ангиогенеза (VEGF, тимидин фосфофилаза, циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2) и др.), тогда как уровень эндогенных ингибиторов (тромбоспондин 1, ангиостатин, эндостатин и др.) снижен [5].

Цель исследования – изучить различия в экспрессии молекулярно-биологических маркеров при аденокарциномах ПЖЖ различной локализации.

Материалы и методы

В исследование включены данные о 53 больных раком ПЖЖ, получавших хирургическое лечение в отделении радиохимики РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в период с 1993 по 2006 г. Из них 28 мужчин и 25 женщин. Средний возраст больных составил 58,6±9 лет (42÷77 лет). Опухоль локализовалась либо в головке ПЖЖ (54,7 % больных), либо в теле и/или хвосте ПЖЖ (45,3 % больных). Всем больным было проведено хирургическое удаление первичной опухоли. У всех больных диагноз рак ПЖЖ был подтвержден гистологическим исследованием опухоли. Оценивались также размеры опухоли, гистологический тип, степень злокачественности, количество пораженных аксиллярных лимфоузлов и другие параметры.

I стадия заболевания выявлена у 3,7 % пациентов, II – у 20,8 %, III – 15,1 %, IV – у 41,5 %. При этом аденокарцинома была диагностирована у большинства больных – в 77,4 % (41 человек) случаев, а нейроэндокринный рак – у 11,3 % пациентов, гистологический тип опухоли не был определен у 6 больных. Большинство имели умеренную степень дифференцировки опухоли (37,7 % больных). Дополнительного адьювантного химиотерапевтического лечения больным не проводилось.

Иммуногистохимическое исследование

В качестве первичных антител использовали МКА к Ki-67 (клон KiS5, разведение 1:50, DAKO Corp, Дания), p53 (клон DO7, разведение 1:200, DAKO Corp), Bcl-2 (клон 124, разведение 1:50, DAKO Corp), ТФ (клон Ab-1, разведение 1:500, Oncogene Research Products, США), VEGF (клон A-3, разведение 1:1000, Santa Cruz Biotech), ЦОГ-2 (клон, разведение 1:300, Santa Cruz Biotech, США) и кроличьи поликлональные антитела к Bax (разведение 1:500, DAKO Corp).

Иммуногистохимическое исследование проводили по стандартной методике. Для выявления антигенных детерминант проводили обработку срезов в 10 мМ цитратном буфере, рН 6,0 (DAKO Corp) в течение 30 мин при 95 °С. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при 4 °С. Для визуализации реакции антиген-

антитело использовали стрептавидин-биотиновую тест-систему LSAB+kit (DAKO Corp). Хромогеном служил ДАБ+ (DAKO Corp). Срезы докрашивали гематоксилином и заключали в полимерную среду.

В исследовании применяли следующие критерии результатов:

- 1) опухоль считали положительной по p53, Bcl-2, Bax, ЦОГ-2 или VEGF, если в ткани опухоли было окрашено более 25 % опухолевых клеток;
- 2) опухоль оценивали как положительную по ТФ, если более 5 % опухолевых клеток имели среднее окрашивание;
- 3) для оценки пролиферативной активности опухоли подсчитывали количество Ki-67⁺ опухолевых клеток, приходящиеся на 200–300 опухолевых клеток; индекс Ki-67 определяли по формуле:

$$Ki-67 = \frac{\text{число Ki-67}^+ \text{ клеток} \times 100}{\text{общее количество клеток}}$$

Опухоль оценивали как низкой пролиферативной активности при индексе Ki-67 ≤ 10 %, и высокой пролиферативной активности при индексе Ki-67 > 10 %.

Статистический анализ проводили на персональном компьютере с использованием программы «SPSS» (v 9.0. for Windows 2001).

Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали тесты «хи-квадрат» (χ²) и точный критерий Фишера. Различия считались статистически достоверными при p < 0,05 (95 % точности).

Результаты и обсуждение

Данные об экспрессии молекулярно-биологических маркеров при раке ПЖЖ приведены в табл. Средняя пролиферативная активность опухолей составила 24±28. Все опухоли были разделены на две группы:

- опухоли высокой пролиферативной активности (индекс Ki-67 ≥ 25%) – 30,2 % больных;
- опухоли низкой пролиферативной активности (индекс Ki-67 < 25 %) – 69,8 % больных.

Накопление p53 в ядрах опухолевых клеток, что по данным литературы коррелирует с наличием мутаций в гене, наблюдалось в 11 (20,8 %) случаях РПЖЖ. Экспрессия маркеров апоптоза Bcl-2 (ингибитора) и Bax (индуктора) выявлена у 9 (17,0 %) и 10 (18,9 %) больных соответственно.

Обнаружена высокая экспрессия ангиогенных факторов в опухолях ПЖЖ:

- экспрессия VEGF – в 23 (43,4 %) случаях;
- ТФ – в 31 (58,5 %);
- ЦОГ-2 – в 29 (54,7 %) случаях.

Экспрессия всех трех стимуляторов ангиогенеза отсутствовала только у 10 (18,9 %) больных, у 11 (20,6 %) больных наблюдалась экспрессия всех трех стимуляторов. Проанализирована экспрессия молекулярно-биологических маркеров в зависимости от локализации опухоли.

Для аденокарциномы головки ПЖЖ в опухолевых клетках характерна высокая экспрессия ангиогенных факторов ТФ (77,3 %) и VEGF (59,1 %), тогда как для аденокарцином, локализованных в теле и хвосте ПЖЖ, характерна высокая пролиферативная активность опухоли (52,6 %), высокая частота экспрессии ЦОГ-2 (68,4 %) и ТФ (57,9 %).

Проведенный статистический анализ показал различия в экспрессии маркеров среди опухолей различных локализаций. Среди пациентов, страдающих аденокарциномами тела и хвоста ПЖЖ, 52,6 % больных имели ПИ выше 30 %, а среди страдающих опухолями головки органа – только 13,6 % ($p=0,017$). Накопление p53 было выше при опухолях головки ПЖЖ (36,6 %) по сравнению с таковым при опухолях тела и хвоста органа (10,5 %); $p=0,075$. Среди клинических характеристик прогностическую значимость показала степень распространенности опухоли ($p=0,019$). Так, среди больных стадии T₃ умерли 61,5 % больных (медиана времени смерти составила 12 мес., а стадии T₄ – умерли все больные (медиана времени – 5 мес.). Степень дифференцировки опухоли не оказывала статистически значимого влияния на выживаемость больных раком ПЖЖ. Среди молекулярно-биологических маркеров только экспрессия Bcl-2 показала прогностическую значимость (см. рис.).

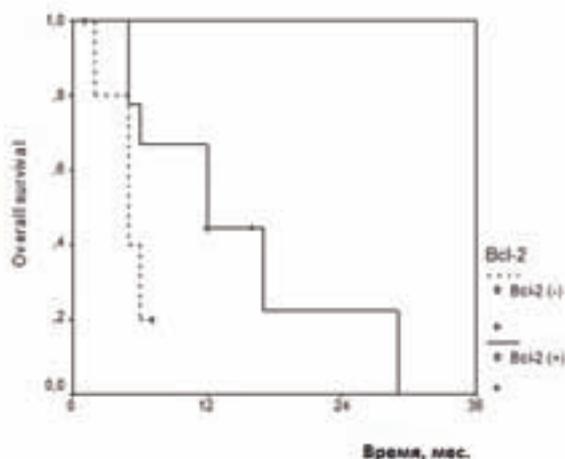


Рис. Зависимость общей выживаемости больных РПЖЖ от экспрессии Bcl-2 в первичной опухоли.

Ни один из Bcl-2⁻ больных не прожил более 1 года, тогда как среди положительных случаев – таких больных оказалось 50%. Медиана общей выживаемости для Bcl-2⁻ больных составила 5±2 мес., а для Bcl-2⁺ больных – 12±4 мес. ($p=0,069$).

Таким образом, проведенное исследование показало, что при аденокарциномах ПЖЖ встречается высокая экспрессия ТФ, VEGF и ЦОГ-2, что делает перспективным клиническое изучение их ингибиторов. ТФ является скоростью-лимитирующим ферментом активации Капецитабина.

Селективное накопление 5-ФУ в опухолевой ткани обеспечивается высокой активностью ТФ в опухолевых клетках по сравнению с клетками нормальных тканей. Экспрессия ТФ в нашем исследовании была обнаружена в 58,5 % случаев, что делает актуальным использование Капецитабина (Кселоды) у этой группы больных. Нами также обнаружены различия в экспрессии молекулярно-биологических маркеров (K-67 и p53) в опухолевых клетках аденокарцином, локализованных в головке или теле и хвосте ПЖЖ. Требуется проведение дополнительных исследований по изучению значимости данного феномена. В нашем исследовании показано, что Bcl-2 может являться благоприятным прогностическим фактором при аденокарциномах головки ПЖЖ. Требуется проведение дополнительных исследований по подтверждению прогностической роли Bcl-2 при аденокарциномах ПЖЖ. По другим данным экспрессия Bcl-2 не связана с прогнозом течения болезни [1]. При этом в хорошо дифференцированных опухолях (G1 степень) экспрессия Bcl-2 встречается чаще, чем в низкодифференцированных.

Заключение

Дальнейшие исследования по оценке роли молекулярно-биологических маркеров у больных раком ПЖЖ являются перспективными для оптимизации тактики лечения пациентов и выбора рациональной терапии.

Таблица

Экспрессия молекулярно-биологических маркеров при раке ПЖЖ различной локализации

Маркер	Экспрессия маркеров в группе, n (%)		
	Общая группа	Рак головки	Рак тела и хвоста
Ki67			
отриц	28 (68,3)	19 (86,4)	9 (47,4)
полож	13 (58,5)	3 (13,6)	10 (52,6)
P53			
отриц	31 (75,6)	14 (63,4)	17 (89,5)
полож	10 (24,4)	8 (36,6)	2 (10,5)
Bcl			
отриц	34 (82,9)	17 (77,3)	17 (89,5)
полож	7 (17,1)	5 (22,7)	2 (10,5)
Vax			
отриц	32 (78,0)	15 (68,2)	17 (89,5)
полож	9 (22,0)	7 (31,8)	2 (10,5)
ТФ			
отриц	13 (31,7)	5 (22,7)	8 (42,1)
полож	28 (68,3)	17 (77,3)	11 (57,9)
ЦОГ2			
отриц	17 (41,5)	11 (50,0)	6 (31,6)
полож	24 (58,5)	11 (50,0)	13 (68,4)
VEGF			
отриц	22 (53,7)	9 (40,9)	13 (68,4)
полож	19 (46,3)	13 (59,1)	6 (31,6)

Литература

1. *Campani D., Esposito I., Boggi U. et al.* Bcl-2 expression in pancreas development and pancreatic cancer progression // *J Pathol.* – 2001. – 194(4). – P. 444–50.
2. *Folkman J.* Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*, JF. Holland, RC.Bast, DL.Morton, E.Frei, DW.Kufe, RR.Weichselbaum, eds. – Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1997. – P. 181–204.
3. *Jemal A., Murray T., Samuels A. et al.* Cancer Statistics // *CA Cancer J Clin.* – 2003. – 53. – P. 5–26.
4. *Jimeno A., Hidalgo M.* Molecular biomarkers: their increasing role in the diagnosis, characterization, and therapy guidance in pancreatic cancer. – *Mol Cancer Ther.* – 2006. – 5. – P. 787–96.
5. *Kuwahara K., Sasaki T., Kuwada Y. et al.* Expressions of angiogenic factors in pancreatic ductal carcinoma: a correlative study with clinicopathologic parameters and patient survival // *Pancreas.* – 2003. – 26(4). – P. 344–9.
6. *Lane D.P.* p53 and human cancers // *Br. Med. Bull.* – 1994. – 50. – P. 582–99.
7. *Mimeault M., Brand R.E., Sasson et al.* Recent advances on the molecular mechanisms involved in pancreatic cancer progression and therapies // *Pancreas.* – 2005. – 31. – P. 301–16.
8. *Reed J.C.* Bcl-2 and the regulation of programmed cell death // *J. Cell Biol.* – 1994. – 124. – P. 1–6.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОИЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 618.19-006.6:612.42

*О.В. Короткова, Т.Н. Заботина, Л.В. Скотаренко, А.А. Борунова, Н.Ю. Очевва, И.К. Воротников, З.Г. Кадагидзе***СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РМЖ***РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация***Короткова Ольга Витальевна, старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей
Централизованного клиничко-лабораторного отдела***Адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-17-14**e-mail:** olgakortkova@yandex.ru

Статья поступила 19.04.2011., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Изучены линейные маркеры клеточного звена иммунитета и оценена субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови больных раком молочной железы с использованием многопараметрового анализа иммунофенотипа лимфоцитов. В исследование было включено 77 первично операбельных больных. Распределение больных по стадиям было следующим: I (T₁N₀) – 31,2 %, II (T₁N₁, T₂N₀₋₁) – 49,3 %, III (T₂₋₄, N₀₋₂) – 19,5 %. В результате исследования было выявлено, что у 58,4% пациенток имеются нарушения структуры Т-лимфоцитов по сравнению со здоровыми донорами. Хирургическое лечение не оказало влияния на динамику распределения основных популяций лимфоцитов при анализе общей группы больных. Индивидуальный анализ иммунограмм в зависимости от исходного уровня CD3 показал, что у 28,5 % больных было исходно снижено содержание CD3⁺-лимфоцитов, у 41,5% – исходно нормальное число CD3⁺-лимфоцитов, у 30,0 % – исходно повышенное количество. У больных со сниженным содержанием CD3⁺-лимфоцитов было исходно повышено количество NK-клеток с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺, в то время как у пациентов с нормальным и высоким числом CD3⁺-лимфоцитов было значительно увеличено количество NKT-клеток с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺ – 14,0±1,1 и 19,3±1,4 соответственно.

Ключевые слова: рак молочной железы, субпопуляции лимфоцитов.*O.V. Korotkova, T.N. Zabolina, L.V. Skotarenko, A.A. Borunova, N.Yu. Ocheeva, I.K. Vorotnikov, Z.G. Kadagidze***LYMPHOCYTES SUBPOPULATION
FROM BREAST CANCER PATIENT'S PERIPHERAL BLOOD***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Abstract**

The linear markers of cellular immunity of peripheral blood lymphocytes in breast cancer patients have been identified. We have also estimated the subpopulation structure of peripheral blood lymphocytes using multiparameter analysis of lymphocytes' immunophenotype. 77 patients with primary operable tumors were enrolled in this study: I (T₁N₀) – 31.2 %, II (T₁N₁, T₂N₀₋₁) – 49.3 %, III (T₂₋₄, N₀₋₂) – 19.5 %. The study revealed that 58.4 % of patients are violations of the structure of T lymphocytes compared with healthy donors. Surgical treatment had no effect on the dynamics of the distribution of major lymphocyte populations in the analysis of the total group of patients. Individual analysis immunograms based on the initial level of CD3 showed that 28.5 % of patients had initially reduced level of CD3⁺ lymphocytes, 41.5% had initially normal level of CD3⁺ lymphocytes and 30.0 % had initially high level. Here we show that the patients with reduced level of CD3⁺ lymphocytes had initially increased number of NK cells with the phenotype CD3⁺CD16⁺CD56⁺, whereas the patients with normal and high level of CD3⁺ lymphocytes had significantly increased number of NKT cells with phenotype CD3⁺CD16⁺CD56⁺ – 14,0±1,1 and 19,3±1,4, respectively.

Key words: breast cancer, lymphocyte subpopulation.**Введение**

РМЖ занимает лидирующее место в структуре онкологической заболеваемости и смертности в России среди женщин; при этом 10,3% пациенток погибают от дальнейшего прогрессирования болезни в течение первого года после постановки диагноза [2]. Ранее было показано, что большинство злокачественных новообразований сопровождаются значительными нарушениями различных звеньев иммунной системы (уменьшение числа Т-лимфоцитов и их субпопуляций, числа и функциональной активности естественных киллеров и т.д.). Выраженность этих процессов неодинакова в исследованных группах больных, однако те или иные нарушения, а также их сочетания встречаются практически у всех больных РМЖ. Кроме того, было показано, что полные или частичные ремиссии встречаются чаще у больных

РМЖ с нормальными показателями клеточного иммунитета по сравнению с пациентами со сниженными показателями [1; 10]. В противоопухолевой защите организма играют большую роль различные популяции клеток, включающие в себя как клетки-эффекторы, так и клетки-супрессоры. В настоящее время большое внимание уделяется исследованию регуляторных клеток. Это гетерогенная популяция, в которой можно выделить CD4⁺- и CD8⁺-субпопуляции лимфоцитов, а также NKT-клетки [9]. Данные клетки обладают способностью угнетать развитие клеточного иммунного ответа, а также участвовать в модуляции противоопухолевого иммунитета [5; 6; 8]. Исследования особенностей функционирования иммунной системы и взаимосвязи изменений в иммунном статусе с клиническими проявлениями болезни у женщин с диагнозом РМЖ достаточно актуальны.

Изменения субпопуляционной структуры Т-лимфоцитов диктуют необходимость иммунокоррекции клеточного звена иммунитета для проведения адъювантной химио- и ЛТ в полном объеме.

Целью исследования было изучение субпопуляционной структуры лимфоцитов больных РМЖ.

Материалы и методы

В исследование включено 77 женщин первичных больных раком молочной железы. Распределение по стадиям: I (T₁N₀) – 31,2 %, II (T₁N₁, T₂N₀₋₁) – 49,3 %, III (T₂₋₄, N₀₋₂) – 19,5 %. Всем больным были выполнены радикальные операции: (мастэктомия с сохранением грудных мышц – 76,6 % случаев или органосохраняющая операция – 23,3 %). Средний возраст пациенток составил 56,4±1,1 лет. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили методом многопараметрового цитометрического анализа до и через 2 недели после хирургического лечения с использованием коммерческих наборов моноклональных антител, конъюгированных FITC, PE, PE-Cy5, PC5 (BD Biosciences, Becton Coulter, США). Использовали следующие двух- и трехцветные реагенты: CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/CD19, CD3/CD16⁺56, CD3/HLA-Dr, CD4/CD25, CD4/CD127/CD25. В качестве контрольных образцов использовали периферическую кровь 25 практически здоровых женщин в возрасте 25–58 лет. Многопараметровый количественный цитометрический анализ проводили на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences). В каждом образце накапливали и анализировали не менее 5000 событий в гейте CD45⁺/CD14⁻ лимфоцитов, количество клеток с фенотипом CD45⁺/CD14⁻ составляло не менее 95–97 %. Использовали Dotplot-анализ, учитывали относительное число позитивных клеток (%). Для дискриминации неспецифического связывания использовали конъюгат IgG₁FITC/IgG₂aPE. Цитотоксический потенциал клеток-эффекторов изучали с использованием коммерческой тест-системы, содержащей моноклональные антитела к внутриклеточному белку перфорины (BD Biosciences). Применяли комбинированное окрашивание поверхностных антигенов в сочетании с окрашиванием внутриклеточного белка CD8/Perforin, CD16/Perforin. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения “Sigma Plot 11.0” for Windows 2003. Достоверность различий в исследовании оценивали по t-критерию Стьюдента и непараметрическим критериям Вилкоксона – Манна – Уитни и Фишера. Для выявления различий в частоте распределения нормальных и измененных величин отдельных показателей в сравниваемых группах использовали критерий χ^2 . Различия считали достоверными при P<0,05. Все результаты представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки.

Результаты

При анализе показателей иммунологического статуса до начала лечения и после операции у всех больных выявлено, что практически все средние значения основных линейных показателей CD3, CD4, CD8, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD19, находились в пределах физиологической нормы. Однако количество CD3⁺CD8⁺, CD8⁺CD16⁺ и CD3⁺CD16⁺CD56⁺ клеток у данной группы пациенток статистически достоверно отличалось от аналогичных показателей здоровых женщин (табл.1).

В настоящее время известно несколько систем реализации цитотоксической функции лимфо-

цитами. Одним из основных путей является экзоцитоз литических гранул – перфорины и гранзимов. При взаимодействии клетки-эффектора с клеткой-мишенью происходит высвобождение перфорины, который, встраиваясь в мембрану клетки-мишени полимеризуется в присутствии ионов кальция, образуя большие трансмембранные поры, вызывая тем самым осмотический «взрыв» и лизис клетки. Через эти поры в клетку проникают гранзимы, довершающие разрушение клетки, которые опосредуют деградацию ДНК клетки-мишени путем активации каспазы 3. Действие тандема этих молекул необратимо [7; 11; 12]. В связи с этим нами были исследованы основные субпопуляции эффекторных лимфоцитов, содержащих перфорин – CD45⁺CD8⁺Perforin⁺ Т-лимфоциты и CD45⁺CD16⁺Perforin⁺ NK-клетки.

При оценке содержания перфорины в CD16⁺ и CD8⁺-лимфоцитах было установлено, что количество CD45⁺CD8⁺Perforin⁺-лимфоцитов и их цитотоксический потенциал статистически значимо превышает показатели доноров и составляет 17,5±0,7 и 12,1±1,2; 52,0±1,4 и 36,5±2,5 соответственно. Цитотоксический потенциал CD16⁺-лимфоцитов не отличался от показателей доноров (табл. 2-3). Ранее было показано, что наличие высокого содержания перфорин-позитивных клеток в структуре CD45⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов можно рассматривать как фактор неблагоприятного прогноза основного заболевания [3; 4].

В результате исследования было выявлено, что у 58,4 % пациенток имеются нарушения в линейной структуре Т-лимфоцитов по сравнению со здоровыми донорами. Индивидуальный анализ иммунограмм в зависимости от исходного уровня CD3 показал, что у 28,5 % больных было исходно снижено содержание CD3⁺-лимфоцитов (группа 1), у 41,5 % – исходно нормальное число CD3⁺-лимфоцитов (группа 2), у 30,0 % – исходно повышенное (группа 3). Количество CD3⁺CD19⁺ В-лимфоцитов соответствовало норме у всех больных. У больных со сниженным содержанием CD3⁺-лимфоцитов было исходно повышено количество NK-клеток с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (30,0±1,3). Известно, что отличительной особенностью NK-клеток является их способность лизировать клетки-мишени без предварительной сенсibilизации. По всей вероятности в условиях дефицита CD3⁺ Т-лимфоцитов увеличение естественных киллеров носит компенсаторный характер и играет определенную роль в противоопухолевой и противовирусной защите. У пациентов с нормальным и высоким числом CD3⁺-лимфоцитов было значительно увеличено количество NKT-клеток с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺ – 14,0±1,1 и 19,3±1,4 соответственно, кроме того у больных с исходно высоким уровнем CD3⁺ Т-клеток количество NK-лимфоцитов было значительно ниже показателей доноров. Увеличение NKT-клеток, представляющих минорную популяцию Т-лимфоцитов, является плохим прогностическим признаком, поэтому данная группа больных будет взята под пристальное наблюдение.

Особо следует отметить, что у больных 1 и 2 групп было статистически значимо понижено содержание CD4⁺-лимфоцитов и незначительно повышено число CD8⁺-лимфоцитов, и как следствие этого снижен иммунорегуляторный индекс (соотношение CD4⁺/CD8⁺), который составил 0,8±0,07 и 0,9±0,06 соответственно (табл. 4). Кроме того, у больных 1 группы было статистически значимо понижено количество цитотоксических лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD8⁺. Проведенное хирургическое лечение не оказало влияния на динамику распределения основных популяций лимфоцитов при анализе общей группы больных.

Таблица 1

Популяции лимфоцитов периферической крови больных РМЖ до и после хирургического лечения (% антиген⁺ клеток)

Маркер	До операции (M±m)	После операции (M±m)	Доноры (M±m)
CD3 ⁺	67,3±1,4	68,3±1,5	73,8±1,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺	35,6±1,0	37,3±1,3	43,4±1,6
CD3 ⁺ CD8 ⁺	25,4±1,0	24,9±1,0	26,9±1,1
CD3 ⁺ CD8 ⁺	13,8±1,0*	12,9±0,9*	7,7±0,6
CD8 ⁺	39,2±1,1	37,8±1,0	34,6±1,4
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	7,7±0,5	7,6±0,5	5,8±0,6
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	19,5±1,0	19,1±1,2	16,7±1,3
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	14,8±0,8*	14,4±0,8*	8,7±1,1
CD3 ⁺ CD19 ⁺	6,8±0,4	6,7±0,4	6,6±0,9
CD8 ⁺ CD16 ⁺	10,3±0,6*	10,9±0,7*	6,4±0,6
CD4/CD8	0,98±0,04*	1,1±0,06	1,4±0,1

*различия статистически достоверные по сравнению с донорами (p<0,05)

Таблица 2

Относительное содержание (%) антиген (белок)-позитивных лимфоцитов периферической крови больных раком молочной железы до и после хирургического лечения

Маркер	До операции (M±m)	После операции (M±m)	Доноры (M±m)
CD45 ⁺ CD16 ⁺ Perforin ⁺	19,4±0,8	18,5±0,9	15,5±1,4
CD45 ⁺ CD8 ⁺ Perforin ⁺	17,5±0,7*	16,7±0,7*	12,1±1,2

* различия статистически достоверные по сравнению с донорами (p<0,05)

Таблица 3

Цитотоксический потенциал эффекторных лимфоцитов больных раком молочной железы

Маркер	До операции (M±m)	После операции (M±m)	Доноры (M±m)
Цитотоксический потенциал CD16 ⁺ лимфоцитов	82,0±1,6	80,7±1,8	75,9±5,5
Цитотоксический потенциал CD8 ⁺ лимфоцитов	52,0±1,4*	51,4±1,6*	36,5±2,5

* различия статистически достоверные по сравнению с донорами (p<0,05)

Таблица 4

Относительное (%) содержание популяций лимфоцитов периферической крови больных раком молочной железы до и после операции в зависимости от исходного количества CD3⁺ Т клеток (M±m)

Маркер	Операция	Группа 1 (n=22)	Группа 2 (n=32)	Группа 3 (n=23)	Доноры (n=25)
CD3 ⁺	До	52,1±1,3*	67,4±0,8	81,6±1,0*	73,8±1,5
	После	56,5±2,2*	67,7±1,6	80,3±2,2	
CD3 ⁺ CD4 ⁺	До	29,0±1,3*	33,7±1,2*	44,5±1,6	43,4±1,6
	После	32,3±1,3*	36,6±0,9	43,0±1,8	
CD3 ⁺ CD8 ⁺	До	17,6±1,3*	25,9±1,3	32,2±1,8	26,9±1,1
	После	17,7±1,4*	24,9±1,4	31,6±1,8	
CD3 ⁺ CD8 ⁺	До	21,3±2,2*	13,7±0,9*	6,7±0,7	7,7±0,6
	После	19,3±2,1*	12,7±1,1*	7,1±1,0	
CD8 ⁺	До	38,9±2,6	39,6±1,4	38,9±1,9	34,6±1,4
	После	36,9±2,5	37,6±1,3	38,7±1,8	
CD3 ⁺ HLADR ⁺	До	5,7±0,9	7,1±0,7	10,4±0,8*	5,8±0,6
	После	6,8±1,2	6,9±0,7	9,4±1,0*	
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	До	30,0±1,3*	19,1±1,1	10,1±0,8*	16,7±1,3
	После	29,4±2,2*	18,2±1,6	10,4±1,1*	
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	До	11,3±1,3	14,0±1,1*	19,3±1,4*	8,7±1,1
	После	11,4±1,3	13,1±1,1*	19,2±1,5*	
CD19 ⁺ CD3 ⁻	До	7,4±0,6	7,9±0,8	4,8±0,4	6,6±0,9
	После	6,4±0,4	8,1±0,8	4,8±0,6	
CD8 ⁺ CD16 ⁺	До	11,7±1,5*	9,9±0,9	9,5±0,9	6,4±0,6
	После	13,6±1,8*	9,9±1,0	9,6±1,0	
CD4/CD8	До	0,8±0,07*	0,9±0,06*	1,2±0,1	1,4±0,1
	После	1,0±0,1	1,1±0,09	1,2±0,1	

*различия статистически достоверные по сравнению с донорами (p<0,05)

Таким образом, с целью дальнейшей коррекции субпопуляционной структуры Т-клеточного звена иммунитета и обеспечения возможности проведения

адьювантной химио- и лучевой терапии в полном объеме необходимо проводить индивидуальный мониторинг состояния иммунной системы больных РМЖ.

Литература

1. Артамонова Е.В., Короткова О.В., Заботина Т.Н. и др. Результаты применения полиоксидония у больных раком молочной железы // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, №1. – С. 96–7.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Сб. «Злокачественные новообразования в России и странах СНГ» – 2010 –
3. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г. Перфоринный потенциал эффекторных клеток у онкологических больных при вакцинотерапии // Вестник Вестник ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2005. – № 3–4. – С. 3–4.
4. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Арустамян Л.Ю. Перфорин-опосредованная цитотоксичность лимфоцитов // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, №. 2–3. – С. 273.
5. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Славина Е.Г. NKT-клетки и противоопухолевый иммунитет // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С.
6. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Славина Е.Г. Регуляторные Т клетки и их роль в противоопухолевом иммунном ответе // Вопросы онкологии. – 2009. – Т. 55, № 3. – С. 269–77.
7. Кадагидзе З.Г., Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н. Субпопуляции Granzyme-B⁺ лимфоцитов у больных меланомой при вакцинотерапии // Иммунология. – 2008. – № 2. – С. 87–94.
8. Baecher-Allan C., Viglietta V. and Hafler D.A. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells // Semin. Immunol. – 2004. – 16. – P. 89–98.
9. Jiang H. and Chess L. An integrated view of suppressor T cells subsets in immunoregulation // J. Clin. Investigation. – 2004. – 114(9). – P. 1198–208.
10. Knutson K.L., Krco C.J., Erskine C.L. et al. T-Cell Immunity to the Folate Receptor Alpha Is Prevalent in Women With Breast or Ovarian Cancer // J Clin Oncol. – 2006. – 24. – С. 4254–61.
11. Law R.H., Lukoyanova N., Voskoboinik I. et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin // Nature. – 2010. – 468(7322). – С. 447–51.
12. Rousalova I., Krepela E. Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation // Int J Oncol. – 2010. – 37(6). – С. 1361–78.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 615.277.3.015.44:576.5

Д.В. Соколова, Е.В. Тазина, М.А. Кортава, П.К. Иванов, Е.В. Игнатьева, А.П. Полозкова,

Е.М. Трещалина, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников

АНТИ-MUC-1 ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДОКСОРУБИЦИНА ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛЬ

РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контактная информация

Соколова Дарина Вадимовна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

Адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(495)324-10-65

e-mail: d.v.sokolova@gmail.com

Статья поступила 19.04.2011., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Направленная доставка цитостатиков с помощью иммунолипосомальных транспортных систем – один из путей реализации таргетной стратегии в противоопухолевой химиотерапии. MUC-1 – антиген, экспрессируемый на поверхности наиболее распространенных злокачественных опухолей человека, является привлекательной мишенью для действия «адресных» противоопухолевых препаратов. Целью настоящей работы являлось получение и изучение специфической активности *in vitro* иммунолипосомальной конструкции противоопухолевого антибиотика доксорубина, обладающей избирательностью действия по отношению к опухолям, экспрессирующим MUC-1 антиген-мишень. Иммунолипосомы получали методом обращения фаз из фосфолипидов, ПЭГ-липидов, холестерина, активированного *p*-нитрофенилкарбонил-ПЭГ липида и с последующей загрузкой доксорубина против градиента сульфата аммония. Включение доксорубина в везикулы составило 87–94 %, диаметр везикул 140 ± 5 нм. Выявлен высокий уровень антигенспецифичности и цитотоксической активности полученных конструкций.

Ключевые слова: доксорубин, иммунолипосомальные конструкции, моноклональные антитела, антиген-мишень, культуры клеток опухолей человека.

D.V. Sokolova, E.V. Tazina, M.A. Kortava, P.K. Ivanov, E.V. Ignatieva,

A.P. Polozkova, E.M. Treshalina, N.A. Oborotova, A.Yu. Baryshnikov

ANTI-MUC-1 IMMUNOLIPOSOMAL CONSTRUCTION LOADED WITH DOXORUBICIN FOR THE DIRECTED DELIVERY IN A TUMOR

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

Abstract

The directed delivery anticancer drugs by immunoliposomal transport systems are one of the ways to realize the target strategies. The MUC-1 antigen expressed on the surface of the most common human cancer is one of the attractive targets for directed delivery of anticancer drugs. The purpose of present work was preparation anti-MUC-1 immunoliposomal construction loaded with doxorubicin and assessment their specific activity *in vitro*. Immunoliposomal constructions were prepared by reverse evaporation method using phospholipids, lipid-grafted PEG cholesterol and activated PNp-PEG3000 lipid with their subsequent loading by doxorubicin based on the formation of ammonium gradient between the internal and external aqueous phase of liposomes. The efficacy of doxorubicin encapsulation in immunoliposomes was 87–94 % the diameter of vesicles was 140 ± 5 nm. The high level of antigen specificity and cytotoxic activity of this construction was obtained.

Key words: doxorubicin, immunoliposomal construction, monoclonal antibodies, human tumor cell cultures, target antigen.

Введение

Побочные эффекты ряда цитостатиков связаны с низкой избирательностью тумороцидного действия из-за отсутствия специфичности доставки в опухоль. Для достижения избирательности актуальными в настоящее время являются два направления:

- 1) поиск новых лекарственных препаратов, избирательно связывающихся с опухолевыми клетками (мишень-ориентированные, таргетные препараты), активная доставка;
- 2) совершенствование ЛФ, обеспечивающее иммобилизацию лекарственного вещества по пути доставки к мишени и улучшение биодоступности за счет особенностей неопластогенеза в опухоли, пассивная доставка.

Последнее реализовалось в липосомальных ЛФ [1–4; 11]. В частности, созданы ЛФ доксорубина (Докс) – Doxil (ALZA Corporation, США), Caelyx (Schering-Plough, Бельгия), Myocet (Elan Corporation, США), Липодокс (ЗАО Биолек, Украина), даунорубин – DaunoXome (Gilead Sciences, Inc., США), винкристина – VincaXome (Gilead Sciences, Inc., США), Marqibo (Inex Pharmaceuticals Corporation, Канада; Enzon Pharmaceuticals, Inc., США; Hana Biosciences, Inc., США), цисплатина – Lipoplatin (Regulon, Inc., США), Липоплат (ЗАО Биолек, Украина), оксалиплатина – LipoXal (Regulon, Inc., США), митоксантрона – LEM (NeoPharm, Inc., США), которые в настоящее время интенсивно изучаются в эксперименте [5–7; 12]. Для осуществления стратегии направленного транспорта лекарственного агента активно изучаются ИК, направленные к опухолеассоциированным поверхностным антигенам или рецепторам на опухолевых клетках.

В качестве векторных лигандов лучшими признаны МКА, пептиды или факторы роста, которые избирательно связываются с соответствующей мишенью [13; 14]. Одной из привлекательных мишеней для направленной доставки противоопухолевых препаратов представляет собой муциноподобный антиген MUC-1. Экспрессия гликопротеина выявлена в малигнизированных тканях молочной, щитовидной и предстательной желез, яичников, толстой и прямой кишок, матки, легких, пищевода, желудка и почек. Гиперэкспрессия антигена, как правило, сопровождается плохим прогнозом, что может быть обусловлено антиадгезивным действием гликопротеина, облегчающим процесс метастазирования. Данная работа посвящена получению и изучению специфической активности *in vitro* ИК Докс, направленной против MUC-1⁺ опухолей.

Материалы и методы

Препараты и реактивы

- 1) Доксорубин гидрохлорид (ОАО ОНОВ, РФ);
- 2) п-нитрофенилкарбонил-ПЭГ-липид 3000 (PNP-PEG3000-lipid), (УнифектГрупп, РФ);
- 3) 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (DSPE-PEG-2000) аммониевая соль;
- 4) холестерин (Avanti Polar Lipids, Inc., США);
- 5) фосфатидилхолин (ЕРС) (Lipoid, Германия);
- 6) аммоний сернокислый (х.ч.), натрия хлорид (х.ч.) (Химмед, РФ);
- 7) НЕРЕС(N-2-гидрокси-этилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота), (AppliChem, Германия);
- 8) Sephadex G-50 superfine (Amersham Biosciences, Швеция);
- 9) МКА ICO-25 (НПЦ «МедБиоСпектр», РФ).

Приборы и аппаратура

Испаритель ротационный Rotavapor R-200 (BÜCHI Labortechnik AG, Швейцария), наносайзер Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США), мини-экструдер Avanti Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, Inc., США), поликарбонатные фильтры Whatman (Великобритания), спектрофотометр СФ-46 (ЛОМО, Россия), хроматографическая колонка С 10/20, детектор UVIS-920, рекордер REC 111 (Amersham Biosciences, Швеция), перистальтический насос Liposomat (Dianorm Geräte, Германия), рН-метр Sartorius PP-20 (Sartorius, Германия), весы Sartorius LA 1200 S (Sartorius AG, Германия), анализатор Униплан (ЗАО Пикон, Россия), проточный цитофлуориметр FACS Calibur (Becton Dickinson, США), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия).

Клеточные линии опухолей человека

В работе использовали линии карциномы молочной железы Т-47D и аденокарциномы яичников SKOV3 из Коллекции опухолевых штаммов и культур клеток РОНЦ. Клеточные линии культивировали в полной питательной среде при 37 °С в атмосфере 5%-ного CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста.

Статистическая обработка данных выполнялась с использованием компьютерной программы BioStat 2008 (v5.2.5.0), Microsoft Excel. Статистически достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Получение ИК Докс

Для приготовления липосом использовали метод обращения фаз.

Точные навески фосфатидилхолина, холестерина, 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (DSPE-PEG-2000) аммониевой соли и п-нитрофенилкарбонил-ПЭГ-липида (PNP-PEG3000-lipid) в мольных соотношениях 7,0 : 4,0 : 0,15 : 0,05 растворяли в хлороформе.

Смесь упаривали в круглодонной колбе на ротационном испарителе под вакуумом при температуре не выше 32±2 °С до образования липидной пленки, которую гидратировали 125 мМ раствором сульфата аммония.

Полученную дисперсию многослойных липосом экструдировали через поликарбонатные мембраны с диаметром пор 400; 200 и 100 нм при помощи ручного мини-экструдера. Инкапсулирование Докс в ИК осуществляли по принципу активной загрузки [10] с одновременной конъюгацией МКА ICO-25, добавленных исходя из мольного соотношения белок/pNP-PEG3000-lipid 1:40.

Весовое соотношение препарат : липиды составило 0,16 : 1,0. Очистку дисперсий от невключившегося в везикулы препарата и не присоединившихся МКА проводили методом гель-фильтрации. Анализ среднего диаметра везикул и оценка их распределения по размерам проведена методом корреляционной спектроскопии светорассеяния.

Определение белка, связанного с поверхностью пустых пэгиллированных ИК, очищенных от несвязавшихся МКА, проводили по общепринятому методу с использованием медного комплекса бидинхиновой кислоты. Количественное содержание Докс в ИК определяли методом спектрофотометрии с использованием РСО Докс при $\lambda = 252$ нм.

Исследование специфической активности ИК Докс *in vitro*

Специфичность связывания с клетками-мишенями. Использовали метод непрямой РИФ. Анализ результатов реакции проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur с использованием программного обеспечения CELL Quest. В каждой пробе анализировали не менее 5000 событий.

Цитотоксическая активность (МТТ-тест). Для оценки способности ИК, загруженных Докс, избирательно доставлять лекарственный препарат к клеткам-мишеням исследуемые образцы инкубировали с клетками 1 ч при 4 °С.

После этого клетки отмывали и оставляли в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5 %-ном содержании CO₂ на 71 ч. Контролем служили интактные клетки, которые инкубировали в тех же условиях.

Результаты и обсуждение

Разработка технологии получения стерически стабилизированной ИК Докс

Технология включает получение больших многослойных и малых однослойных липосом; инкапсулирование препарата в везикулы с одновременной конъюгацией молекул векторных лигандов, очистку иммунолипосом от невключившегося препарата и несвязавшихся МКА и определение основных параметров полученных ИК, как то: размер везикул, включение препарата и количество МКА, связанных с липосомой.

Нами предложено молярное соотношение компонентов 7:4:0,15:0,05. В табл. 1 представлены значения концентрации липидов, использованных для получения модели многослойных липосом и их мольные соотношения.

Таблица 1

Липидный состав больших многослойных липосом

Липид	Молярная масса, г/моль	Концентрация, г/мл	Мольный %
Фосфатидилхолин	760,09	47,4	62,5
Холестерин	386,7	13,34	35,7
DSPE-PEG2000	2805	3,73	1,3
pNP-PEG3000-lipid	3850	1,67	0,44

Таблица 2

Содержание доксорубина в различных фракциях

Образец	D _{ср} *	D _{ср} **	Докс		
			m PCO, мг	Содержание в образце	Эффективность включения препарата в везикулы, %
Исходная дисперсия липосом с Докс					
1	0,624	0,63	0,7	$\bar{x} = 0,691$ мг/мл $\Delta x = 0,002$	89,5-91,0
2	0,623				
3	0,62				
Исходная дисперсия ИК Докс					
1	0,623	0,63	0,7	$\bar{x} = 0,695$ мг/мл $\Delta x = 0,002$	92,0-94,9
2	0,627				
3	0,628				
I фракция липосом Докс					
1	0,474	0,630	0,7	$\bar{x} = 0,622$ мг $\Delta x = 0,005$	89,5-91,0
2	0,490				
3	0,497				
I фракция ИК Докс					
1	0,505	0,630	0,7	$\bar{x} = 0,649$ мг $\Delta x = 0,005$	92,0-94,9
2	0,507				
3	0,486				

*Среднее значение оптической плотности образца;

**оптическая плотность PCO Докс.

Таблица 3

Концентрации лекарственных форм, использованные в исследовании цитотоксического действия ИК Докс

Лекарственная форма	Стоковые		Стах в лунке, мкг/мл	Шаг разведения
	C*, мг/мл	объем, мл		
Липосомальный Докс	0,2	2,0	0,018	2
ИК Докс	0,2	2,0	0,018	2
Докс	0,2	2,0	0,018	2

*Концентрация препарата

Дисперсию больших многослойных липосом получали гидратацией липидной пленки 125 мМ раствором (NH₄)₂SO₄. Для получения малых однослойных липосом с узким распределением по размерам, соответствующим диаметру пор фильтра, выбран метод экструзии. Загрязну препарат в ИК проводили с использованием ионного градиента сульфата аммония, который стабилен во времени, не требует изменения pH внешней среды и универсален для липосом различного состава независимо от метода получения. Встраивание в состав везикул п-нитрофенилового эфира pNP-PEG3000-lipid позволило эффективно в одну стадию конъюгировать молекулы МКА. Использование в составе конъюгата PEG3000 предотвратило экранирование молекул МКА цепями DSPE-PEG-2000, также входящего в состав везикул. Очистку ИК от невключенного Докс и не связавшихся МКА проводили методом гель-фильтрации, основанном на различной скорости диффузии молекул с разной молекулярной массой. Регистрировали четкое разделение на 2 пика, соответствующие чистой фракции ИК с ИК Докс и буферу, состоящему из 10 мМ HEPES и 145 мМ NaCl (рис. 1). Сошедшие фракции собирали в стерильные флаконы и подвергали спектрофотометрическому анализу. Средний размер полученных ИК составил 140±5 нм (рис. 2).

Оценку эффективности включения Докс в везикулы проводили путем определения содержа-

ния препарата в исходной дисперсии, внесенной в колонку, а также в первых фракциях, полученных на выходе из колонки. Результаты анализа представлены в табл. 2.

Среднее количество белка во всей очищенной фракции пустых ИК составило 0,292 мг. Известно, что одну липосому диаметром 100 нм составляют 100 тыс. молекул липидов [8; 9], тогда на липосому диаметром 140 нм приходится 140 тыс. молекул липидов.

Если учесть, что количество липидов в препарате составило, в среднем, 9,48 мг, а Мм IgG₁ составляет 146 тыс. Да, то, зная соотношение фосфолипидов и белка в полученном препарате, можно вычислить число молекул антител на одну липосому по формуле:

$$N = \frac{m N_A}{M}, \text{ где}$$

N – число молекул,

m – масса вещества, взятого согласно методике приготовления ИК,

M – Мм.

Таким образом, в среднем на одну ИК приходилось ~23 молекулы конъюгированных антител.

Исследование специфической активности ИК Докс *in vitro*

Специфичность связывания с клетками-мишенями. Для снижения неспецифического связывания липосом с клетками инкубацию с везикулами проводили при +4 °С. На рис. 3А представлено распределение неокрашенных клеток линии SKOV3. При использовании МКА к MUC-1 – антигену в популяции выявлено 98% клеток-мишеней (рис. 3Б). При инкубации с липосомальной формой Докс специфическое связывание не отмечали (рис. 3В), тогда как пустые липосомы связывались с 95% клеток (Рис. 3Г). После инкубации клеток с ИК без последующей инкубации с F(ab)₂, меченными FITC, в канале FL2 за счет аутофлуоресценции Докс регистрировали 98% связывание с клетками (рис. 3Д). Специфическое связывание ИК с инкапсулированным препаратом, выявляемое как за счет аутофлуоресценции препарата, так и за счет метки FITC F(ab)₂ фрагментов, составило 97 ± 2% (рис. 3Е).

Оценка цитотоксической активности ИК Докс. Использовали очищенные ИК с Докс, липосомальную форму, препарат в традиционной ЛФ, а также пустые ИК и нативные МКА ISO-25, так как они сами по себе могут оказывать цитотоксическое действие. Разведения пустых ИК и МКА готовили, исходя из концентрации липидов и МКА в ИК Докс. Каждый препарат исследовали в 5 концентрациях (табл. 3). По результатам теста строили кривые выживаемости клеток и определяли значения IC₅₀. На рис. 4 представлены результаты МТТ-теста на клетках линии SKOV3.

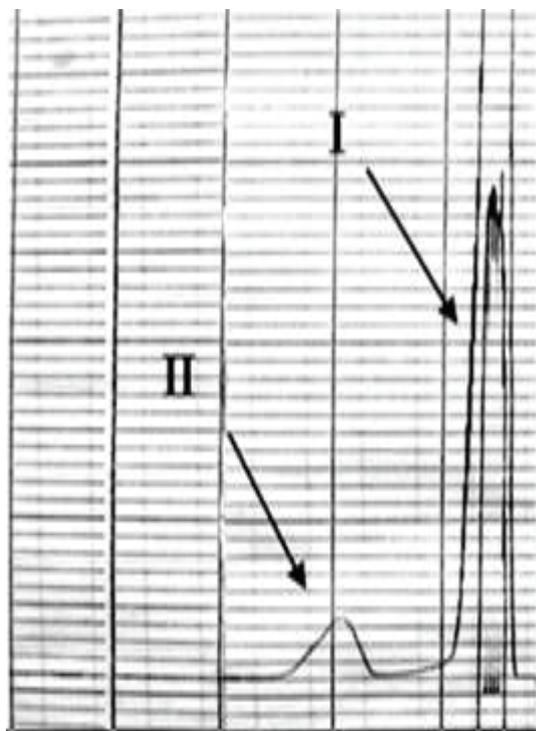


Рис. 1. Хроматограмма очистки ИК с инкапсулированным Докс (скорость движения бумаги в рекордере 1 мм/мин., элюент – 0,15 М NaCl). I – фракция очищенных ИК с инкапсулированным Докс; II – буфер HEPES с NaCl.

Как видно из рисунка, МКА ISO-25, используемые в качестве направляющего вектора в ИК в исследованном диапазоне концентраций не проявляют цитотоксического действия, а Докс в ИК был цитотоксичным соизмеримо с традиционной ЛФ: выживаемость клеток при концентрации Докс 18 мкг/мл составила 45,8 ± 5,5% и 49,9 ± 12%, для 7,5 мкг/мл – 60,6 ± 3,05% и 66,8 ± 5,23% соответственно (различия недостоверны).

Для липосомального Докс в изученных концентрациях IC₅₀ не достижима.

Таким образом, получена иммунолипосомальная конструкция Докс с высокой степенью включения действующего вещества и выраженной специфической активностью *in vitro*.

Заключение

В результате проведенного исследования разработана технология получения стерически стабилизированной анти-MUC-1 иммунолипосомальной конструкции доксорубина с размером частиц 140±5 нм и высокой степенью загрузки препарата (до 94 %).

Полученная конструкция характеризуется выраженной специфической активностью в отношении антиген-положительных клеток *in vitro* – эффективность связывания с мишенью составила 97 ± 3%. Иммунолипосомальный доксорубин достоверно (p<0,05) более цитотоксичен по сравнению с липосомальной формой препарата.

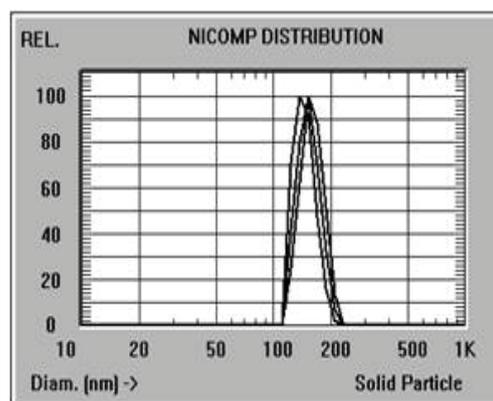


Рис. 2. Распределение ИК Докс по размерам, полученное на наносайзере Nicomp 380 Submicron Particle Sizer.

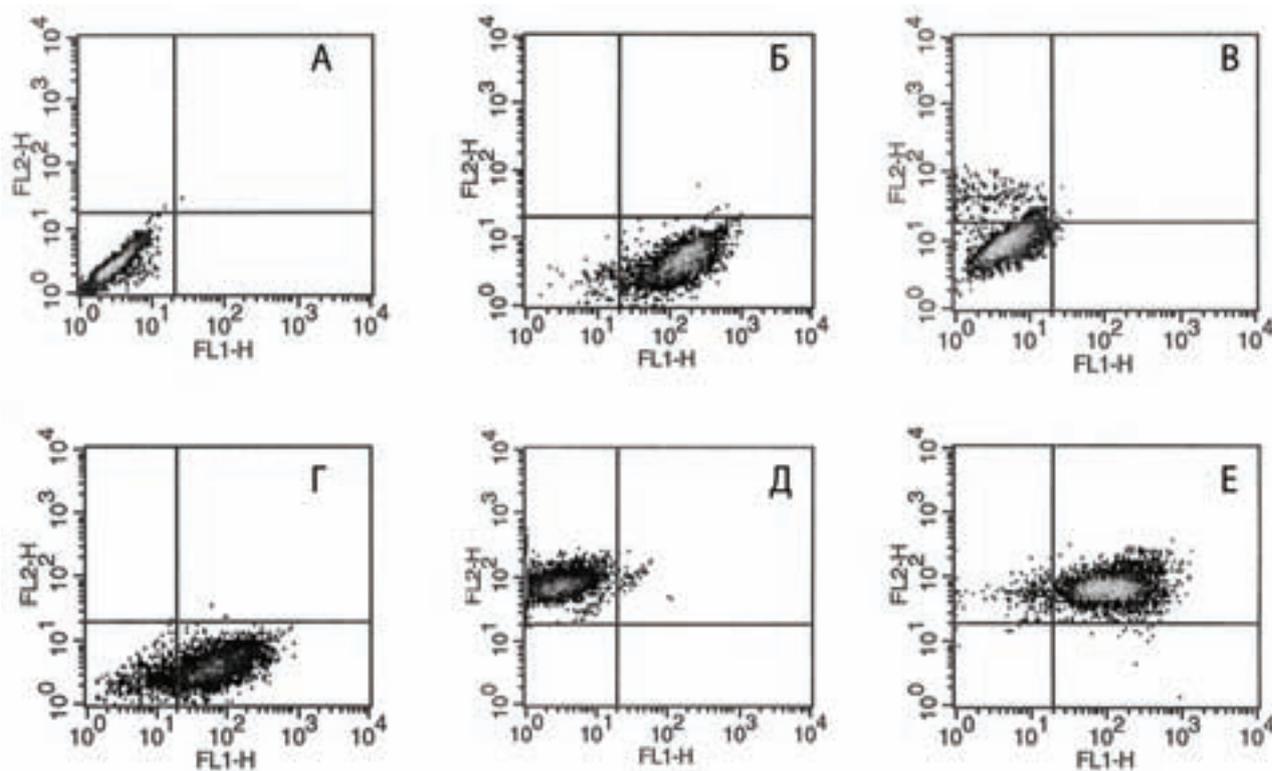


Рис. 3. Анализ специфического связывания ИК с клетками линии SKOV3 методом проточной цитофлуориметрии:

- А: неокрашенные клетки;
 Б: клетки, инкубированные с МКА ИКО-25;
 В: клетки, инкубированные с липосомальным Докс;
 Г: клетки, инкубированные с пустыми ИК;
 Д: клетки, инкубированные с ИК Докс без обработки F(ab)₂/FITC;
 Е: клетки, инкубированные с ИК Докс и F(ab)₂, меченными FITC.

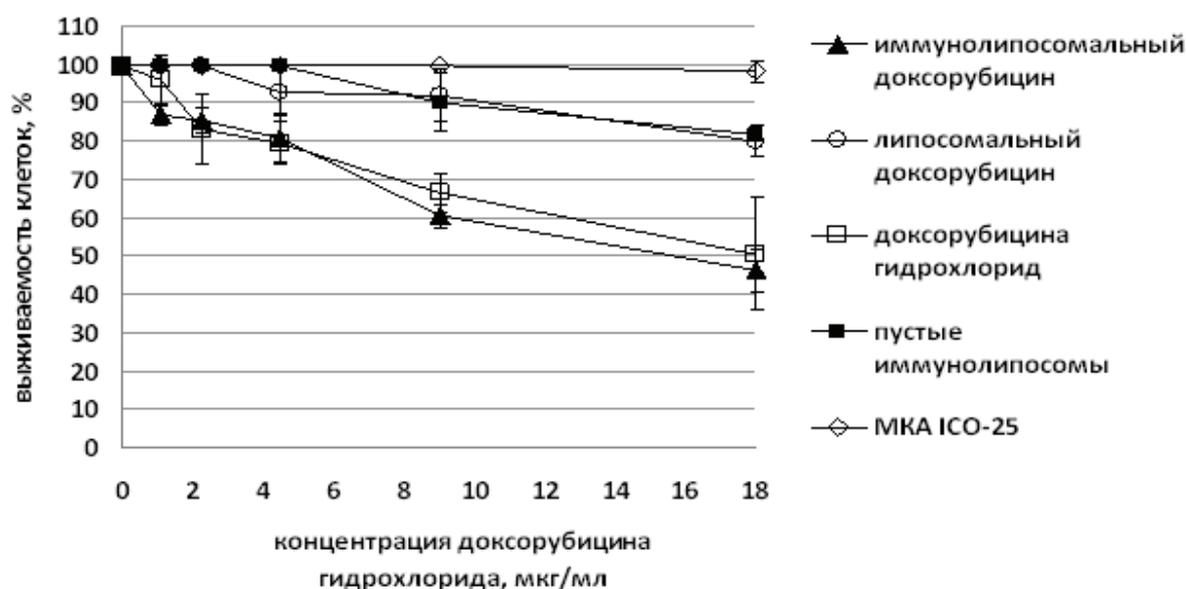


Рис. 4. Цитотоксический эффект Докс в различных формах в отношении клеток SKOV3.

Литература

1. Баллюзек Ф.В., Куркаев А.С., Сенте Л. Нанотехнологии для медицины // ООО «Сезам-Принт». – 2008. – С. 44–56.
2. Барсуков Л.И. Липосомы // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 2–9.
3. Барышников А.Ю., Степанова Е.В., Личиницер М.Р. Оценка ангиогенеза опухолей человека // Успехи современной биологии. – 2000. – Т. 120, № 6. – С. 599–604.
4. Давыдов М.И. Экспериментальная онкология на рубеже веков / Под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. – М.: Изд. группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. – 2003. – 552 с.
5. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, №4. – С. 32–8.
6. Шалимов С.А., Литвиненко А.А., Дудниченко А.С. Использование липосомальной формы антибиотиков антрациклинового ряда в лечении экспериментальных форм опухолевых процессов // Украинский химиотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 19, № 1–2. – С. 65–8.
7. Шубина Д.А., Ганьшина И.П. Применение Келикса в онкологической практике // Фарматека (Онкология). – 2006. – № 18. – С. 25–33.
8. Цибулькина Е.А. Иммунолипосомальные системы направленного транспорта малых интерферирующих РНК в клетки-мишени: Автореф. дис. канд. хим. наук: 03.00.23., 03.00.04. – 2008. – 24 с.
9. Enoch H.G., Strittmatter P. Formation and properties of 1000-angstrom-diameter, single bilayer phospholipids vesicles // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1979. – 76(1). – P. 145–9.
10. Haran G., Cohen R., Bar L.K. et al. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposome produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1993. – 115(2). – P. 201–15.
11. Hobbs S.K., Monsky F., Yuan F. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1998. – 95. – P. 4607–12.
12. Martin F., Boulikas T. The challenge of liposomes in gene therapy // Gene Ther. Mol. Biol. – 1998. – 1. – P. 173–214.
13. Mastrobattista E. Koning G.A., Storm G. et al. Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs // Adv. Drug Deliv. – 1999. – 40. – P. 103–27.
14. Park Y.S. Tumor-directed targeting of liposomes // Bioscience Reports. – 2002. – 22. – P. 267–81.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616.317-006.61-073.524:615.831

*В.Н. Капинус, М.А. Каплан, И.С. Спиченкова, Е.В. Ярославцева-Исаева, А.М. Шубина***ФДТ БАЗАЛЬНО-КЛЕТОЧНОГО И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ВЕРХНЕЙ И НИЖНЕЙ ГУБЫ***Медицинский радиологический научный центр, Обнинск***Контактная информация***Капинус Виктория Николаевна, канд. мед. наук*

Адрес: 249036, Обнинск, Калужская обл., ул. Королева, 4; тел. +7(4843)99-30-26

e-mail: kapinusv@rambler.ru

Статья поступила 14.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

Работа посвящена клиническому исследованию эффективности фотодинамической терапии с фотосенсибилизаторами 2 поколения (Фотосенс, Фотолон, Фотодитазин) у 43 больных базально-клеточным и плоскоклеточным раком верхней и нижней губы. Общая эффективность лечения больных базально-клеточным и плоскоклеточным раком губы составила 100 %, включая полную регрессию 86,0 % и частичную – 14,0 %. При лечении рецидивных опухолей процент полных регрессий составил 69,2, частичных – 30,8 %. Местные рецидивы после ФДТ выявлены у 3 (7,3 %) пациентов из 41. Анализ отдаленных результатов выявил прогрессирование заболевания у 1 больного (2,4 %). 5-летняя безрецидивная выживаемость при фотодинамической терапии базально-клеточного и плоскоклеточного рака губы в исследуемой группе пациентов составила 79,3±11,1 %.

Ключевые слова: рак губы, флюоресцентная диагностика, Фотосенс, Фотолон, Фотодитазин.*V.N. Kapinus, M.A. Kaplan, I.S. Spichenkova, E.V. Yaroslavtseva-Isaeva, A.M. Shubina***PHOTODYNAMIC THERAPY OF BASAL CELL AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA OF THE UPPER AND LOWER LIP***Medical Radiological Research Center, Obninsk***Abstract**

This work is dedicated to the clinical investigation and photodynamic therapy (PDT) with photosensitizers (Photosens, Photolon, Photoditazin) with 43 patients basal cell and squamous cell carcinoma of the upper and lower lips. Complete tumor regression is registered in 37 of 43 cases (86,0 %), a partial regression – in 6 (14,0 %) cases, an absence of the effect was not registered. Next we examined the effect of PDT on recurrent carcinoma. Here we show that complete response was observed in 69,2 % of patients, partial response – in 30,8 % of patients. During the follow-up period from 6 months till 6 years recurrence of the disease was observed in 3 (7,3 %) patients and progression of disease in 1 patient. Based on the data obtained, we conclude that the 5-years recurrence-free survival rate after PDT of an upper and lower lip carcinoma was 79,3±11,1 % in investigated group of patients.

Key words: carcinoma of lip, fluorescence diagnostics, Photosens, Photolon, Photoditazin.**Введение**

Рак губы – злокачественная опухоль из многослойного плоского эпителия красной каймы нижней или верхней губы. Кожа и слизистая оболочка поражаются опухолевым процессом вторично. Рак верхней губы по отношению к раку нижней губы составляет 2–5 % и наблюдается чаще у женщин.

В структуре заболеваемости по отношению ко всем злокачественным новообразованиям рак губы составляет 1,8 % (15 ранговое место) у мужчин и 0,53 % (20 ранговое место) у женщин России [7]. Для рака губы характерно лимфогенное метастазирование: подбородочные, подчелюстные, лицевые, околоушные, глубокие шейные – верхние и средние яремные лимфатические узлы. Метастазирование при раке нижней губы отмечено в 2–6 % при I стадии, в 15–20 % – при II стадии, в 35 % – при III стадии и в 70 % – при IV стадии. Отдаленные метастазы рака нижней губы наблюдаются редко (2 %), в основном – в легкие [5].

Традиционные методы лечения рака нижней губы достаточно эффективны: 5-летняя выживаемость достигает 92–99 %, а 5-летняя выживаемость без рецидива – 83 % [8; 9; 11; 12]. Однако существуют определенные проблемы и недостатки используемых

стандартных методов: сложность выполнения оперативных вмешательств, продолжительность лучевого лечения, возможность развития осложнений.

Новейшим органосохраняющим методом лечения опухолей, и в частности рака губы, является ФДТ. При ФДТ происходит селективное разрушение злокачественных новообразований благодаря избирательному накоплению предварительно введенного ФС и локальному воздействию лазерного облучения определенной длины волны [10]. Глубина поврежденной ткани при ФДТ с использованием ФС первого поколения (производные геметапорфирина) составляет 1,0 см, а при применении ФС второго поколения (фталоцианины, хлорины) достигает 1,5–2,0 см, что является адекватным при лечении новообразований губы с учетом ее анатомо-физиологического строения. Более того, при ФДТ отсутствует системная токсичность и лучевая нагрузка, поэтому ФДТ может применяться не только для лечения первичных опухолей, но и для лечения рецидивов и остаточных опухолей после ЛТ, когда резерв последней исчерпан. Хорошая переносимость ФДТ позволяет использовать данный метод лечения у пожилых пациентов и у больных с тяжелой сопутствующей патологией, у которых применение традиционного лечения сопровождается ВР осложнений.

Первоначально в качестве ФС при проведении ФДТ использовались препараты Фотогем (производное гематопорфирина IX) и Фотосенс (сульфированный фталоцианин алюминия). При проведении ФДТ они показали достаточно высокую терапевтическую активность, но в то же время обладали рядом побочных действий (в частности – длительный период кожной фототоксичности).

В последние годы хлорины и хлориноподобные соединения стали активно использоваться в качестве фотосенсибилизаторов. Структурно хлорин представляет собой порфирин, но имеет на одну двойную связь меньше. Это ведет к существенно большему поглощению на длинах волн, смещенных дальше в область красного спектра, по сравнению с порфиринами, что в определенной степени увеличивает глубину проникновения света в ткани.

Проведено обширное экспериментальное изучение основных механизмов и закономерностей фотохимической реакции при ФДТ с производными хлоринового ряда и, в частности, с ФС Фотодитазин, на клеточном и тканевом уровнях [4; 6].

Задачами настоящего исследования были оценка эффективности фотодинамической терапии у больных базально-клеточным и плоскоклеточным раком губы с использованием фотосенсибилизаторов Фотосенс, Фотолон и Фотодитазин.

Материалы и методы

Исследование по изучению эффективности фотодинамической терапии у больных раком верхней и нижней губы проведено в группе из 43 пациентов, находившихся на лечении в отделе лазерной и фотодинамической терапии МРНЦ (г. Обнинск, Калужская область).

В число больных вошли 34 (79,1 %) мужчины и 9 (20,9 %) женщин в возрасте от 40 до 82 лет. Средний возраст больных составил $65,2 \pm 1,8$ лет.

У 35 (81,4 %) пациентов был диагностирован плоскоклеточный рак нижней губы, у 3 (7,0 %) – базально-клеточный рак нижней губы и у 5 (11,6 %) – базально-клеточный рак верхней губы.

Все диагнозы имели морфологическую верификацию и по распространенности соответствовали $T_{1-4}N_0M_0$, из них T_1 – у 14 (32,6 %), T_2 – у 23 (53,5 %), T_3 – у 5 (11,6 %), T_4 – у 1 (2,3 %) человека. Регионарное метастазирование было выявлено в 3 случаях, отдаленное у пациентов исследуемой группы диагностировано не было.

Кроме того, 13 (30,2 %) пациентов были ранее лечены, т.е. имели место неполный регресс опухоли или ее рецидив после лучевой терапии, хирургического иссечения, криодеструкции или комплексного лечения.

При проведении ФДТ в качестве фотосенсибилизаторов были использованы отечественные препараты Фотосенс – у 5 больных, Фотолон – у 30 и Фотодитазин – у 8 пациентов. Фотосенсибилизаторы вводили внутривенно капельно, Фотосенс в дозе 2,0 мг/кг веса, Фотолон – 1,2–2,5 мг/кг веса и Фотодитазин – 0,7–0,8 мг/кг веса.

Флюоресцентную спектроскопию проводили на специальном техническом комплексе «Lesa-6» (производитель фирма «Biospec», Москва). В качестве источника излучения, возбуждающего флюоресценцию фотосенсибилизатора в биологических тканях, использовалось излучение He-Ne лазера (633 нм). Полученные путем точечных измерений спектры тканей центра и периферии опухоли, а также визуально здоровой кожи анализировали по форме, ве-

личине и амплитуде сигнала. Определяли площадь интенсивности флюоресценции (S_2) и площадь отраженного от тканей лазерного излучения (S_1), а также их отношение (S_2/S_1), называемое индексом контрастности, по которому оценивали уровень флюоресценции различных участков кожи (центр и периферия опухоли, здоровые ткани), что позволяло определять накопление фотосенсибилизатора в тканях и распространение опухолевого процесса.

Кроме того, всем пациентам после введения ФС проводили визуализацию и мониторинг всей области поражения с использованием матричного светодиодного облучателя (длина волны 665 нм, мощность излучения 40 мВт/см²) с встроенной специальной высокочувствительной видеокамерой – «Камин-видео-3» («Biospec», Москва). Контроль изображения и границ опухолевого процесса осуществляли в флюоресцентном и рассеянном свете в технике сканирования, в том числе и поиск новых областей с сильной флюоресценцией.

Сеанс локального облучения опухоли проводили через 24 ч после введения Фотосенса на лазерном аппарате «ЛД 680-2000» (670 нм), через 2–3 ч после введения Фотолона и Фотодитазина на лазерных аппаратах «Аткус-2» (662 нм) и «Латус-2» (662 нм) с плотностью мощности 200–400 мВт/см² с помощью гибких моноволоконных торцевых световодов и световодов с линзой.

К опухолям подводилась световая энергия от 300 до 600 Дж/см² в течение одного сеанса облучения с одного или нескольких полей, в зависимости от клинической и морфологической формы, глубины инфильтрации опухолевого процесса. Большинству пациентов проводили один сеанс ФДТ для достижения полной регрессии опухоли, но 5 пациентам было проведено 2, а одному – 3 сеанса с интервалом 2–6 нед.

Непосредственные результаты лечения больных раком губы оценивались через 2 мес. после окончания лечения по критериям ВОЗ:

1. Полная регрессия – полное исчезновение всех проявлений болезни, установленное как визуально, так и пальпаторно и подтвержденное негативными результатами морфологических исследований в течение 1–2 мес. после лечения.
2. Частичная регрессия – уменьшение размеров опухоли на 50 % и более, а также когда при внешнем полном отсутствии опухоли при морфологическом исследовании выявились опухолевые клетки.
3. Уменьшение опухоли меньше, чем на 50 % или отсутствие изменения размеров опухоли расценивалось как отсутствие эффекта БЭ.

Отдаленные результаты лечения больных раком губы методом ФДТ были оценены методом динамического анализа на основании построения таблиц дожития [1; 3].

Результаты и обсуждение

При проведении спектро-флюоресцентной диагностики у пациентов в исследуемой группе была отмечена флюоресценция всех клинически определяемых опухолевых очагов с пиком на длине волны 670 нм после введения ФС Фотосенс и на длине волны 662 нм после введения ФС хлоринового ряда. В ходе исследования было установлено, что после введения фотосенсибилизаторов индекс контрастности «опухоль(центр)/здоровая ткань» варьировал в пределах 2:1 – 4:1.

При проведении визуализации области поражения после введения фотосенсибилизатора опухолевая ткань на экране выглядела, как ярко светящийся очаг на темном фоне здоровых тканей. После сеанса ФДТ зона облучения, соответствующая опухоли, визуализировалась как более темное пятно на фоне здоровых тканей.

Таким образом, визуализация уровня флюоресценции предоставляет возможность для определения границ, пораженных опухолевым процессом, благодаря тому, что накопление фотосенсибилизатора в тканях злокачественных новообразований выше, чем в здоровых тканях.

В процессе фотодинамической терапии больные ощущали жжение от незначительного до выраженного и боль различной степени, которые купировались приемом ненаркотических анальгетиков и наркотических.

Кроме того, у некоторых больных использовалась иглорефлексотерапия для потенцирования действия анальгетиков.

У всех больных в последствии в зоне облучения через 7–10 дней формировался сухой струп, который самостоятельно отторгался через 3–4 недели с последующим формированием рубца.

Непосредственные результаты

Полная регрессия опухолевых очагов после проведения ФДТ с фотосенсибилизаторами Фотосенс, Фотодитазин, Фотолон была зарегистрирована у 37 из 43 больных (86,0 %), частичная регрессия – у 6 (14,0 %) пациентов, отсутствие эффекта не отмечалось. Более высокий уровень ПР (100,0 %) был получен при лечении базально-клеточного рака, хотя в группе больных плоскоклеточным раком процент полных регрессий также достаточно высок и составил 82,9 %. При лечении рецидивных опухолей процент ПР составил 69,2 %, частичных – 30,8 %, что свидетельствует о достаточно успешном применении метода ФДТ у больных, ранне получавших другие виды лечения по поводу рака губы. Данные об эффективности ФДТ рака губы приведены в табл.

Таблица 1

Данные об эффективности ФДТ рака губы

Характеристика опухолевого процесса на губе	n больных	Эффективность лечения		
		ПР	ЧР	БЭ
Всего больных	43	37 (86,0 %)	6 (14,0 %)	0
Давность опухолевого процесса				
Первичный рак губы	30	28 (93,3 %)	2 (6,7 %)	0
Рецидивный рак губы	13	9 (69,2 %)	4 (30,8 %)	0
Тип опухоли				
Базально-клеточный рак	8	8 (100,0 %)	0 (0,0 %)	0
Плоскоклеточный рак	35	29 (82,9 %)	6 (17,1 %)	0

После проведения ФДТ двум больным по поводу регионарного метастазирования проводилось лечение: лучевая терапия или хирургическое иссечение лимфатических узлов шеи (операция Крайля). Остальным пациентам исследуемой группы дополнительное лечение не проводилось, и на сроках наблюдения от 3 мес. до 6 лет не было диагностировано регионарное и отдаленное метастазирование.

Отдаленные результаты

После курса ФДТ наблюдение за больными проводилось через 3; 6; 12 мес. и далее ежегодно. У 41 больного сроки наблюдения составили от 3 мес. до 6 лет, о 2 нет сведений. За наблюдаемый период у 2 пациентов диагностирован рецидив плоскоклеточного рака нижней губы через 3 мес. (дальнейшее лечение не было проведено из-за тяжелой сопутствующей патологии), еще у 1 больного – через 4,5 года был выявлен рецидив базально-клеточного рака верхней губы с распространением на кожу носогубного треугольника. На сроке наблюдения от 1 года до 6 лет умерло 4 больных, 3 – от сопутствующих заболеваний, 1 пациент – от прогрессирования заболевания, но при этом ни в одном случае не был отмечен местный рецидив рака губы.

Таким образом, общая эффективность лечения больных базально-клеточным и плоскоклеточным раком губы составила 100 %, включая полную регрессию в 86,0 и частичную – в 14,0 % случаев. Местные рецидивы после ФДТ выявлены у 3 (7,3 %) пациентов из 41. Анализ отдаленных результатов выявил прогрессирование заболевания у 1 больного (2,4 %) в виде метастазирования в регионарные лимфатические узлы даже после проведения хирургического иссечения и дистанционной лучевой терапии на лимфатические узлы шеи, но в тоже время признаков местного рецидива заболевания не было диагностировано.

У большинства пациентов в исследуемой группе проводилось лечение методом ФДТ только первичного очага с полным эффектом без последующего лечебного воздействия из зоны регионарного метастазирования, т.к. при комплексном обследовании не были выявлены метастазы в лимфоколлекторы и внутренние органы.

Таким образом, эффективное лечение первичного очага методом ФДТ возможно в самостоятельном варианте, т.к. при динамическом наблюдении отдаленное метастазирование не выявляется.

Следует отметить, что проведение ФДТ не сопровождалось развитием осложнений как при проведении одного сеанса, так и при повторных процедурах, которые были необходимы для поэтапного разрушения больших опухолевых образований. 5-летняя БРВ при ФДТ базально-клеточного и плоскоклеточного рака губы в исследуемой группе пациентов составила $79,3 \pm 11,1$ %.

Заключение

При проведении спектро-флюоресцентной диагностики у пациентов в исследуемой группе визуализация уровня флюоресценции предоставляет возможность для определения границ, пораженных опухолевым процессом, благодаря тому, что накопление фотосенсибилизатора в тканях злокачественных новообразований выше, чем в здоровых тканях.

Применение ФДТ с фотосенсибилизаторами Фотосенс, Фотолон, Фотодитазин позволяет эффективно лечить как первичный, так и рецидивный рак верхней и нижней губы в самостоятельном варианте, полная резорбция опухоли может быть достигнута при однократном воздействии; но возможны повторные сеансы для поэтапного разрушения опухоли без развития побочных эффектов.

Технически процедура ФДТ выполнима достаточно просто, не требует анестезиологического пособия, может применяться у пожилых пациентов и у соматически ослабленных больных.

Лечение непродолжительное: сеанс ФДТ длится около 2 часов, в стационаре больные находятся в течение 7–10 дней, возможно и амбулаторное проведение ФДТ.

После лечения пациенты могут самостоятельно делать перевязки с учетом рекомендаций врача. До полной эпителизации тканей ведется амбулаторное наблюдение.

Анализ косметических и органосохраняющих результатов (последствий) лечения опухолей губы методом ФДТ показал, что после проведенного лечения у всех больных формировались неглубокие рубцы, имеющие меньшие размеры, чем первоначальная опухоль, которые практически не деформировали окружающие ткани, речь и функции губ не были изменены. Таким образом, на сегодняшний день фотодинамическая терапия с современными фотосенсибилизаторами расширила возможности оказания эффективной медицинской помощи больным раком верхней и нижней губы.

Литература

1. Березкин Д.П. Метод расчета показателей наблюдаемой и скорректированной выживаемости онкологических больных // Вопросы онкологии. – 1982. – Т. 28, № 11. – С. 12–9.
2. Гельфонд М.Л., Барчук А.С., Васильев Д.В., Стуков А.Н. Возможности фотодинамической терапии в онкологической практике // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 67–71.
3. Двойрин В.В. Статистическая оценка эффекта лечения онкологических больных // Вопросы онкологии. – 1982. – Т. 28, № 12. – С. 29–37.
4. Каплан М.А., Пономарев Г.В., Баум Р.Ф. и др. Изучение специфической фотодинамической активности Фотодитазина при фотодинамической терапии у экспериментальных животных-опухоленосителей // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 23–30.
5. Любаев В.Л., Таболинская Т.Д. Злокачественные новообразования головы и шеи. – Основные средства и методы диагностики и лечения злокачественных новообразований. – М.: ООО «РЛС-2004», 2004. – С. 140–2.
6. Цыб А.Ф., Каплан М.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В. Влияние фотодинамической терапии с Фотодитазином на морфофункциональные характеристики саркомы М-1 // Бюлл. экспер. биологии и медицины. – 2004. – № 12. – С. 658–64.
7. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2003г. (заболеваемость и смертность). – М.: Антид, 2005.
8. Gooris P.J.J., Maat B., Vermey A. et al. Radiotherapy for cancer of the lip. A long-term evaluation of 85 treated cases // Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Endodontology. – 1998. – 86(3). – P. 325–33.
9. McGregor G.I., Davis N.L., Hay J.H. Impact of cervical lymph node metastases from squamous cell cancer of the lip // The Amer. J. of Surg. – 1992. – 163(5). – P. 469–71.
10. Pass H.J. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use // J. Nat. Cancer Inst. – 1993. – 85(6). – P. 443–56.
11. Squamous cell cancer of the lip: analysis of the Princess Margaret Hospital experience // Radiotherapy and Oncology. – 1993. – 28(2). – P. 142–7.
12. Zitsch R.P., Lee B.W., Smith R.B. Cervical lymph node metastases from squamous cell cancer of the lip // Head Neck. – 21(5) – P. 447–53.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 618.19-006.6-033.2:616.419

*Беришвили А.И., Тупицын Н.Н., Лактионов К.П., Левкина Н.В., Кочоян Т.М., Керимов Р.А.***ОСОБЕННОСТИ МИКРОМЕТАСТАЗИРОВАНИЯ
ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНОЙ ФОРМЫ РМЖ В КОСТНЫЙ МОЗГ***РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва***Контактная информация***Беришвили Александр Ильич, к.м.н., с.н.с., хирургического отделения опухолей женской репродуктивной системы***Адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495) 226-48-23**e-mail:** aberishvili@yandex.ru

Статья поступила 14.12.2010., подписана в печать 05.05.2011.

Резюме

ОИФ РМЖ является редкой и крайне агрессивной формой рака. Из-за малого количества больных с данной патологией и их гетерогенности практически отсутствуют крупные рандомизированные исследования, посвященные изучению микрометастазирования рака в костный мозг, а также его влиянию на безрецидивную и общую выживаемость больных ОИФ РМЖ. Установленная нами при иммуноцитологическом исследовании частота микрометастатического поражения костного мозга при ОИФ РМЖ в 7 раз выше, чем при стандартном цитологическом исследовании (36,8% vs 5,3%). Не выявлено взаимосвязи между гистологическим строением опухоли, ее рецепторным статусом и частотой микрометастазирования в костный мозг ОИФ РМЖ. Нами не получено статистически достоверных различий в результатах БРВ и ОВ больных ОИФ РМЖ при наличии или отсутствии микрометастазов в костный мозг.

Ключевые слова: отечно-инфильтративная форма рака молочной железы, микрометастазы в костный мозг, безрецидивная выживаемость, общая выживаемость.

*Berishvili A.I., Tupizyn N.N., Laktionov K.P., Levkina N.V., Kochoyan, T.M., Kerimov R.A.***BONE NARROW METASTASES
IN INFLAMMATORY BREAST CANCER***N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of RAMS, Moscow***Resume**

IBC is both the least frequent and the most aggressive form of epithelial breast cancer. Because of small number of patients and their heterogeneity, micrometastatic bone narrow involvement in IBC is not investigated in randomized trials and little is known about its influence on disease-free survival and overall survival. In immunocytological study micrometastatic bone narrow involvement was 7 times higher than in standard cytological examination (36,8% vs 5,3%). We found no correlation between histological types of IBC, its hormone receptor status and micrometastatic bone narrow involvement. Our data demonstrated no influence of micrometastatic bone narrow involvement on DFS and OS of patients with IBC.

Key words: inflammatory breast cancer, micrometastatic bone narrow involvement, disease-free survival, overall survival.

Введение

В настоящее время правильное стадирование рака молочной железы вместе с другими факторами прогноза является определяющим фактором в выборе тактики лечения больных РМЖ. Исследование костного мозга на предмет метастатического поражения до настоящего времени зачастую оставалось за пределами стандартного онкологического обследования. Сегодня пришло время расширить рамки стандартно выполняемых тестов и включить в арсенал используемых методов диагностики исследование костного мозга, который представляет собой идеальную мишень для гематогенного метастазирования опухолей.

Из-за низкой частоты ОИФ РМЖ практически отсутствуют крупные рандомизированные исследования, посвященные изучению микрометастазирования рака в костный мозг, а также его влиянию на БРВ и ОВ больных ОИФ РМЖ.

Обнаружение малых количеств метастатических клеток в костном мозге больных РМЖ служит показателем гематогенной диссеминации процесса и многими учеными расценивается как неблагоприятный

признак, свидетельствующий о дальнейшем формировании метастазов, прежде всего в кости [1–3].

Существуют диаметрально противоположные точки зрения относительно связи между выявлением опухолевых клеток в костном мозге и основными факторами риска, такими как размер опухоли и поражение регионарных лимфоузлов.

Так, I. Diel et al. [4] обнаружили связь между метастатическим поражением костного мозга и размером опухоли ($p < 0,001$), состоянием регионарных лимфоузлов ($p = 0,001$), степенью злокачественности ($p = 0,002$) и постменопаузальным статусом больных ($p = 0,01$). Исследователи из London Ludwig Cancer Institute установили, что наличие ЕМА⁺ клеток в костном мозге тесно связано с поражением региональных лимфоузлов, перитуморальной сосудистой инвазией и размерами первичного опухолевого очага [3].

S. Braun et al. [1] указали на наличие корреляции между обнаружением микрометастазов в костном мозге и ОИФ РМЖ, размером опухолевого очага, обширным поражением региональных лимфоузлов (для каждого фактора $p < 0,0001$) и степенью злокачественности ($p = 0,0044$).

В настоящее время отсутствует единая точка зрения относительно роли и места иммуноцитологического исследования в диагностике микрометастазов ОИФ РМЖ, а также их прогностическом влиянии на БРВ и ОВ данной категории больных, что и послужило целью настоящего исследования.

Материал и методы

Совместно с лабораторией иммунологии гемопозза нами проведено проспективное исследование микрометастатического поражения костного мозга у 19 больных ОИФ РМЖ, получавших лечение в хирургическом отделении опухолей женской репродуктивной системы РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в 2003–2005 гг. В исследуемую группу вошли женщины в возрасте от 29 до 73 лет. Средний возраст пациенток составил 52 года.

Распределение по стадиям:

T₄N₁M₀ – 10 (52,6%) больных,

T₄N₂M₀ – 4 (21,0%) больных,

T₄N₃M₀ – 2 (10,5%) больных,

T₄N₂M₁ – 3 (15,8%) больных.

Первичная ОИФ РМЖ выявлена у 6 (31,6%) больных, вторичная ОИФ РМЖ – у 13 (68,4%) больных. Стернальная пункция выполнялась всем больным до начала лечения. Исследование выполнялось как стандартным цитологическим методом, так и иммуноцитологическим методом с использованием реакции иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител к цитокератинам САМ 5.2 (Vecton Dickinson, США) и KL-1 (Immunotech, Франция). При проведении исследования методом проточной цитофлуориметрии использована тройная флуоресцентная метка CD45-EМА-CD326.

Положительной считали реакцию при наличии опухолевых клеток, причем за пороговые значения нами принимались 2 или не менее 10 метастатических клеток среди 1 млн. миелокариоцитов.

При использовании МКА к цитокератинам пораженные клетки выявлялись по наличию яркого специфического цитоплазматического флуоресцентного свечения (рис.).



Рис. Комплекс метастатических клеток в костном мозге. Цитоцентрифужный препарат. Окраска МКА KL-1. × 400.

При иммунофенотипировании выделяли 3 типа взаимодействия антител с опухолевыми клетками:

- *Отрицательная реакция* (–) – менее 10% антигенположительных опухолевых клеток.
- *Мозаичная реакция* (+/–) – антиген присутствовал на части (от 10 до 80%) опухолевых клеток.
- *Мономорфная реакция* (+) – антиген экспрессируется большинством (более 80%) опухолевых клеток.

При иммунофенотипировании иммунокомпетентных клеток в гистологических срезах опухоли выделяли 3 типа иммунных реакций:

- *Отрицательная реакция* – антигенположительные клетки не определяются или определяются небольшое их количество в препарате.
- *Умеренная реакция* – умеренное количество антигенположительных клеток, расположенных разрозненно или мелкими группами.
- *Выраженная реакция* – множество антигенположительных клеток в срезе, могут встречаться крупные группы и инфильтраты из этих клеток.

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

Результаты

В репродуктивном периоде находились 8 (42,1%) больных, в менопаузе – 11 (57,9%) женщин. Ранее беременели, рожали 18 (94,7%) пациенток, а 1 (5,3%) страдала бесплодием.

По гистологическому строению чаще встречался инфильтративный протоковый рак (ИПР) – у 13 (68,4%), реже – инфильтративный дольковый рак (ИДР) (6 (31,6%) больных).

Следует пояснить, что в работе мы использовали два термина: макро- и микрометастазы. Под макрометастазами нами подразумевались метастазы, выявляемые при цитологическом или гистологическом исследовании, а под микрометастазами – метастазы, выявляемые при иммуноцитологическом исследовании.

Макрометастазы выявлены с помощью цитологического метода у 1 (5,3%) больной, а микрометастазы с пороговым значением 2 и более опухолевых клеток – у 7 (36,8%) и с пороговым значением 10 и более опухолевых клеток – у 5 (26,3%) больных. Считается, что пороговая опухолевая нагрузка в 10 и более опухолевых клеток в костном мозге резко увеличивает вероятность возникновения отдаленных метастазов. Примечательно, что с помощью реакции иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител нами выявлялись даже единичные эпителиальные клетки в костном мозге больных ОИФ РМЖ, что, несомненно, отражает высокую чувствительность данной методики по сравнению со стандартным цитологическим исследованием. Таким образом, применение иммуноцитологического исследования позволяет в 5–7 раз повысить эффективность диагностики метастазов в костный мозг по сравнению со стандартным цитологическим исследованием, что, в свою очередь, позволяет адекватно стадировать и индивидуализировать тактику лечения больных ОИФ РМЖ.

Нами исследован ряд клинико-морфологических признаков на предмет установления возможной связи с частотой развития микрометастазов при пороговой частоте более 2 опухолевых клеток.

Микрометастазы выявлены у 7 (36,8%) больных, микрометастазы отсутствовали у 12 (63,2%) больных ОИФ МЖ. При анализе частоты развития микрометастазов в зависимости от гистологического строения опухоли статистически достоверных различий не получено: из 12 больных без поражения костного мозга у 4 (33,3%) выявлен ИДР, у 8 (66,7%) – ИПР, аналогичная тенденция отмечается и у больных с микрометастатическим поражением костного мозга – 2 (28,6%) и 5 (71,4%) больных соответственно ($p=0,8$).

Анализ частоты развития микрометастазов в зависимости от рецепторного статуса опухоли также не выявил статистически достоверных различий. Так, из 12 больных без метастатического поражения у 6 (50,0%) были эстрогенпозитивные опухоли, а еще у 6 (50,0%) – эстрогеннегативные опухоли, а из 7 больных с метастатическим поражением эстрогенпозитивные опухоли отмечены у 2 (28,6%), а эстрогеннегативные – у 5 (71,4%) больных ($p=0,3$).

Аналогичная тенденция обнаружена и по рецепторам прогестерона: из 12 пациенток без микрометастатического поражения костного мозга у 3 (25,0%) были прогестеронпозитивные опухоли, у 9 (75,0%) – прогестероннегативные, а в группе пациенток с метастатическим поражением костного мозга – 3 (42,9%) и 4 (57,1%) соответственно ($p=0,4$).

Анализ в зависимости от HER-2/neu статуса опухоли показал в группе пациенток без метастатического поражения следующие результаты: HER-2/neu 0 выявлялся у 5 (41,7%) пациенток, HER-2/neu 1+ – у 4 (33,3%), HER-2/neu 2+ – у 2 (16,7%), HER-2/neu 3+ – у 1 (8,3%) пациентки, а в группе пациенток с микрометастазами – у 2 (28,6%), 1 (14,3%), 0 и 4 (57,1%) пациенток соответственно ($p=0,085$).

Нами проведен анализ иммунофенотипов опухоли и рассмотрена их связь с развитием микрометастазов у 10 больных ОИФ РМЖ. Исследовали экспрессию на опухолевых клетках молекул гистосовместимости I и II классов, трансферринового рецептора CD71, MUC-1, общелейкоцитарных антигенов – ЕрСАМ или панцитокератинов (KL-1).

Из 5 больных без микрометастазов при анализе иммунофенотипов по HLA-I у 2 (40,0%) отмечалась отрицательная реакция, у 1 (20,0%) – мозаичная, у 2 (40,0%) – мономорфная реакция, а из 5 больных с микрометастазами распределение составило 2 (40,0%); 2 (40,0%) и 1 (20,0%) соответственно ($p=0,7$).

Аналогично не получено статистически достоверных различий распределения по HLA-II по выраженности реакции, которое составило 2 (40,0%); 2 (40,0%); 1 (20,0%) и 2 (40,0%); 1 (20,0%); 2 (40,0%) при отсутствии или наличии микрометастазов соответственно ($p=0,7$).

Анализ по MUC-1 показал, что из 5 больных без микрометастазов у 1 (20,0%) отмечена мозаичная реакция, у 4 (80,0%) – мономорфная, а из 5 больных с микрометастазами у 1 (20,0%) отмечена отрицательная реакция, у 1 (20,0%) – мозаичная, у 3 (60,0%) больных – мономорфная реакция ($p=0,5$).

При изучении CD71 и в подгруппе без микрометастазов и в подгруппе с микрометастазами выявлено одинаковое распределение реакций: у 1 (20,0%) пациентки мозаичная реакция, а у 4 (80,0%) – мономорфная ($p=0,7$). Сопоставление проведено также с уровнями инфильтрации опухоли субпопуляциями лимфоцитов и макрофагами.

При изучении интратуморальных макрофагов (МКА D11) в подгруппе 4 пациенток без микрометастазов у 3 (75,0%) отмечена незначительная инфильтрация, у 1 (25,0%) – умеренная, а в подгруппе 4 пациенток с микрометастазами у 1 (25,0%) пациентки отмечена незначительная реакция, у 1 (25,0%) – умеренная и у 2 (50,0%) пациенток – выраженная реакция ($p=0,2$).

Статистически достоверные различия получены при исследовании CD7, где из 5 больных без микрометастазов у 4 (80,0%) отмечено практически полное отсутствие Т-клеток в опухолевой ткани, а у 1 (20,0%) – выраженная Т-клеточная инфильтрация, тогда как из 5 больных с микрометастазами у 4 (80,0%) выявлена умеренная и у 1 (20,0%) – выраженная реакция ($p=0,018$).

Данная тенденция просматривалась и для CD45, где у 5 пациенток распределение было следующим: 2 (40,0%); 2 (40,0%) и 1 (20,0%), а из 5 пациенток с микрометастазами у 1 (20,0%) отмечена умеренная, а у 4 (80,0%) – выраженная инфильтрация ($p=0,055$).

Для CD4 таких тенденций не выявлено. Так, при исследовании CD4 из 5 пациенток без микрометастазов у 4 (80,0%) отмечена умеренная реакция, у 1 (20,0%) – выраженная, а из 4 пациенток с микрометастазами – у 1 (25,0%) и у 3 (75,0%) соответственно ($p=0,1$).

Исследование CD8 показало, что в подгруппе без микрометастазов практически полное отсутствие инфильтрации имело место у 3 (60,0%) больных, умеренная реакция – у 1 (20,0%) и выраженная – у 1 (20,0%), а в подгруппе с микрометастазами – у 1 (25,0%); 2 (50,0%) и 1 (25,0%) больной соответственно ($p=0,4$).

Для CD16 различия также не достигали статистически значимых и было установлено, что в подгруппе без микрометастазов у всех 5 (100,0%) пациенток отсутствовали данные клетки, а в подгруппе с микрометастазами – у 3 (60,0%) пациенток реакция CD16-клеток отсутствовала, а 2 (40,0%) – а у 2 была умеренной ($p=0,2$). Нами проведен анализ БРВ и ОВ больных ОИФ РМЖ с и без микрометастазов в костный мозг.

Анализ выживаемости при пороговом значении более 2 метастатических клеток не выявил статистически достоверных различий в БРВ и ОВ больных ОИФ РМЖ в зависимости от наличия или отсутствия микрометастазов в костный мозг.

Установлено, что средняя БРВ больных без микрометастазов составила $20,3 \pm 3,6$ мес. (95%-ный ДИ, 13,3–27,2 мес.) с медианой $15 \pm 3,1$ мес., а у больных с микрометастазами – $25,1 \pm 3,5$ мес. (95%-ный ДИ, 18,3–31,9 мес.) с медианой $24 \pm 2,1$ мес. ($p=0,7$) Средняя ОВ больных без микрометастазов составила $23,7 \pm 3,5$ мес. (95%-ный ДИ, 16,8–30,5 мес.), медиана не достигнута, а у больных с микрометастазами – $24,4 \pm 3,8$ мес. (95%-ный ДИ, 16,9–31,9 мес.) с медианой $24 \pm 2,2$ мес. ($p=0,8$)

Обсуждение

Следует отметить, что в современной литературе практически отсутствуют работы по изучению микрометастазирования ОИФ РМЖ в костный мозг. Это во многом объясняется низкой частотой данной нозологической патологии, а также недостаточным внедрением иммуноцитологического метода с использованием реакции иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител к цитокератинам в повседневную онкологическую практику.

Один из первых исследователей метастатического поражения КМ W. Redding (1983) использовал антитела против ЕМА и выявил клетки РМЖ в КМ на момент выполнения хирургического вмешательства у 28% больных при отсутствии очевидных отдаленных метастазов [5]. По данным ряда авторов, частота микрометастазов, выявленных иммуноцитохимическим методом, возрастает с увеличением стадии [6; 7]. В работе M. Osborne et al. [8] микрометастазы в КМ обнаруживались у 38% пациенток с IV стадией РМЖ при наличии метастазов в кости, у 20% больных с неместными отдаленными метастазами и у 10% больных с первично операбельным раком молочной железы. Проведенное нами пилотное проспективное исследование показало высокую эффективность иммуноцитологического исследования КМ у больных ОИФ РМЖ по сравнению со стандартным цитологическим исследованием. В частности обнаружено, что частота микрометастатического поражения КМ, выявляемая при иммуноцитологическом исследовании, в 7 раз выше, чем при стандартном цитологическом исследовании (36,8 vs 5,3%). Аналогичные результаты получены и в исследовании О. Крохиной и соавт. [7]. Частота микрометастазирования ОИФ РМЖ в КМ в нашем исследовании составила 36,8%, что совпадает с данными отечественных и зарубежных авторов [2; 6; 9]. Особый интерес представляют исследования по изучению прогностического влияния метастазов в КМ на показатели БРВ и ОВ. Ряд ученых считает, что такая связь существует [2; 4; 10; 11], другие придерживаются диаметрально противоположной точки зрения [5; 12]. J. Mansi et al. [11] отметили существенное сокращение продолжительности безрецидивного периода у больных с микрометастазами в костный мозг в течение 28-месячного периода наблюдения. При медиане наблюдения 76 мес. многофакторный статистический анализ показал, что у больных с микрометастазами в костный мозг увеличивается вероятность развития костных ($p < 0,01$) и других отдаленных метастазов ($p < 0,001$), а также сокращается общая выживаемость ($p < 0,005$). Многофакторный анализ с использованием 6-летнего и более чем 12-летнего сроков клинического наблюдения показал, что наличие ЕМА⁺ клеток в КМ является независимым основополагающим прогностическим фактором наравне с размером опухоли, степенью злокачественности и состоянием региональных лимфоузлов.

Литература

1. Braun S. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer / S. Braun, K. Pantel, P. Muller et al. // N. Engl. J. Med. – 2000. – Vol. 34. – № 2. – p. 525-33.
2. Harbeck N. Tumor cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up / N. Harbeck, M. Untch, L. Pache et al. // Br. J. Cancer. – 1994. – Vol. 69. – p. 566-71.
3. Pantel K. Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow / K. Pantel, G. Schlimok, M. Angstwurm et al. // J. Hematother. – 1994. – Vol. 3. – p. 165-73.
4. Diel I. Micrometastatic breast cancer cells in bone marrow at primary surgery: prognostic value in comparison with nodal status / I. Diel, M. Kaufmann, S. D. Costa et al. // J. Natl. Cancer Inst. – 1996. – Vol. 88. – p. 1652-64.
5. Redding W. Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer / W. Redding, R. Coombes, P. Monaghan P. et al. // Lancet. – 1983. – Vol. 2. – p. 271-74.
6. Берензон Д.П. Поражение костного мозга при солидных опухолях / Д.П. Берензон, А.В. Колосков, В.А. Тарасов // Гематология и трансфузиология. – 2000. – Т. 45., №5 – с. 42–6.
7. Крохина О.В. Иммуноцитологическая диагностика микрометастазов рака молочной железы в костный мозг / О. В. Крохина, В. П. Леягин, Н. Н. Тупицын и др. // Иммунология гемопоза. – 2007. – Т. 4., №2. – с. 116–30.
8. Osborne M. Detection and management of... / M. Osborne, P. Rosen // Oncology. – 1994. – Vol. 8. – p. 25-36
9. Funke I. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated / I. Funke, W. Schraut // J. Clin. Oncol. – 1998. – Vol. 16. – p. 557–66.
10. Landys K. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: results of a 20-year median follow-up / K. Landys, S. Persson, J. Kovarik et al. // Breast Cancer Res. Treat. – 1998. – Vol. 49. – p. 27-33.
11. Mansi J. Outcome of primary breast cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up / J. Mansi, H. Gogas, J. Bliss et al. // Lancet. – 1999. – Vol. 354. – p. 197-202
12. Schwartz G. Induction chemotherapy followed by breast conservation for locally advanced carcinoma of the breast / G. Schwartz, C. Birchansky, L. Komarnicky et al. // Cancer. – 1994. – Vol. 73 (2). – p. 362–9.
13. Braun S. et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer // N. Engl. J. Med. – 2005. – Vol. 353. – p. 793-802.

В одном из проспективных исследований S. Braun et al. изучали состояние КМ 552 первичных больных РМЖ с I-III стадиями заболевания с использованием антител к цитокератинам [1]. Метастазы в КМ были диагностированы у 199 больных (36%). Как показали результаты исследования, наличие опухолевых клеток в КМ после 4 лет наблюдения было ассоциировано с высоким риском развития отдаленных метастазов и увеличением смертности от прогрессирования заболевания ($p < 0,001$), но не с риском развития местного рецидива ($p = 0,77$). Одновременно многофакторный регрессионный анализ показал, что наличие метастатических клеток в КМ является прогностическим фактором неблагоприятного прогноза независимо от состояния региональных лимфоузлов. Поражение КМ встречалось так же часто при метастазах в региональные лимфоузлы, как и без таковых ($p = 0,13$).

А метаанализ результатов лечения и наблюдения 2494 больных РМЖ не выявил убедительных доказательств независимой прогностической роли метастатического поражения КМ в отношении показателей общей и БРВ [13]. Однако необходимо отметить ряд ограничений данного анализа, таких как, например, существенно отличающиеся между собой методы диагностики опухолевых клеток в КМ. Обнаружение микрометастазов в костном мозге, а соответственно и прогностическая значимость данного фактора во многом зависят от множества технических причин, таких как выбор антител, лабораторного оборудования, кроме того, имеет значение число исследуемых клеток, так же как и количество пациентов, включенных в исследование.

В проведенном нами исследовании статистически достоверных различий в результатах ОВ и БРВ больных ОИФ РМЖ при наличии или отсутствии микрометастазов в КМ не получено. Подводя итог вышесказанному, следует отметить, что с позиции современных представлений о биологии опухоли представляется безусловно целесообразным ввести в клиническую практику исследования КМ для выявления диссеминации опухолевого процесса, а для более детального изучения различных клинико-морфологическим и биологических особенностей микрометастазирования РМЖ в КМ необходимо проведение крупного мультицентрового проспективного исследования.

ТСХ – тонкослойная хроматография
ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
ТЭОС – тетраэтилортосиликата
ТЭС – телячья эмбриональная сыворотка
УЗКТ – ультразвуковая компьютерная томография
ФГА – фитогемагглютинин
ФД – флуоресцентная диагностика
ФР – факторы роста
ФС – фотосенс
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ФСП – фармакопейная статья предприятия
ФТС – фетальная телячья сыворотка
ХГ – хорионический гонадотропин
ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз
ХТ – химиотерапия
ЛСП – лимфосаркома Плисса
ЦП – цисплатин
ЦТАБ – цетилтриметиламмонийбромид
ЦФ – циклофосфан
ЧО – частичный ответ
ШМ – шейка матки
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭФР – эпидермальный фактор роста
ЭК – эндотелиальные клетки
ЭМ – электронная микроскопия
ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

МНС – major histocompatibility complex
РСa – prostate cancer
Pr – проспидин
PSA – prostate-specific antigen
tPSA – prostate-specific antigen, total form
fPSA – prostate-specific antigen, free form
Ph – филадельфийская хромосома
RA – rheumatoid arthritis
RF – rheumatoid factor
ROC – анализ – Receiver Operating Characteristics curve analysis
SCCA – антиген плоскоклеточной карциномы
TGF – Transforming Growth Factors
(трансформирующие факторы роста)
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor
VM – vasculogenic mimicry

%fPSA – fPSA/tPSA
ADMET – drug administration, distribution, metabolism, excretion, and toxicological studies
ASCUS – atypical squamous cells of undetermined significance
AUC – Area Under the Curve
BDFI – bioactivity-directed fractionation and isolation
CFSE – carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CIN – cervical intraepithelial neoplasia
(цервикальные интраэпителиальные неоплазии)
COX – циклооксигеназа
CRC – colorectal cancer
EPCAM – adhesion molecule of epithelial cells
EPR effect – enhanced permeability and retention effect
(эффект повышения проницаемости и удерживания)
EMT – Epithelio-mezenhimal transition
FLICE – cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme
GAP – Good Agricultural Practice
GMP – Good Manufacturing Practice
GCP – Good Clinical Practice
IC₅₀ – 50% -ной ингибирующей концентрации (.)
LDCI – Lomustine-Dacarbazine-Cisplatin-Ingaron
LLC – lung Lewis carcinoma (карцинома легких Льюис)
LSIL – low-grade intraepithelial lesions
MNNG – N-methyl-N¹-nitro-N-nitrosoguanidine
Mw – molecular weight (молекулярный вес)
N-DMNA – N-dimethylnitrosoamine
NSE – нейроспецифической энлазы
NTA – nitril triacetate acid (нитрилтрехуксусная кислота)
IGFBP – insulin-like growth factor binding protein
HER – human epidermal growth factor receptor
HSIL – high-grade intraepithelial lesions

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

К 80-летию Петра Вячеславовича Лопатина

19 сентября 2011 г. исполняется 80 лет со дня рождения профессора П.В. Лопатина – организатора и первого заведующего лабораторией разработки лекарственных форм Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН.

Доктор фармацевтических наук, профессор кафедры организации и экономики фармации Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Петр Вячеславович Лопатин руководил лабораторией разработки лекарственных форм Онкологического научного центра РАМН с 1974 по 1988 г.

Под руководством П.В. Лопатина на базе лаборатории сформировалась научная школа создания противоопухолевых лекарств, защищены докторские и кандидатские диссертации. Петр Вячеславович является автором методологии создания рациональных лекарственных форм и проведения доклинического изучения противоопухолевых препаратов. Суть методологии заключается в системном, комплексном подходе к созданию готовых лекарств, включающем решение фармако-аналитических, технологических, биофармацевтических, токсикологических и фармакокинетических аспектов поиска рациональных лекарственных форм отобранных в эксперименте противоопухолевых веществ. В дальнейшем эта методология была реализована при создании алгоритмов разработки конкретных типов и видов лекарственных форм, в том числе в виде растворов, эмульсий и сублимационно высушенных препаратов для инъекций и таблеток. Профессором П.В. Лопатиным теоретически и экспериментально разработаны методы направленной доставки лекарственных веществ к биологическим мишеням, в том числе с использованием ультраэмульсий и липосом.

По результатам его исследований опубликовано несколько сотен работ в отечественных и зарубежных научных изданиях, научные разработки защищены патентами РФ.

В настоящее время созданная П.В. Лопатиным лаборатория является ведущим научным коллективом в области изучения лекарственных форм противоопухолевых препаратов и обладает полным технологическим циклом для их создания.

Сотрудники РОНЦ им. Н.Н. Блохина и редакция «Российского биотерапевтического журнала» сердечно поздравляют с 80-летием Петра Вячеславовича и желают ему крепкого здоровья и активного долголетия.



Рисунки к статье *И.Н. Григорьевой и соавт.*
**«ВАСКУЛОГЕННАЯ МИМИКРИЯ:
АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕХАНИЗМ КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ ОПУХОЛИ?»**

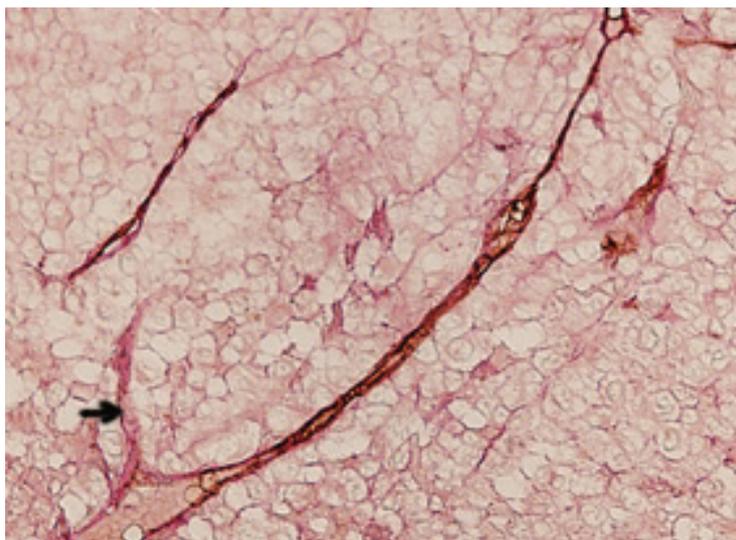


Рис. 1. Комбинированное CD31/CD34/PAS-окрашивание ткани меланомы кожи, хромоген DAB. Структуры VM (стрелка). Увеличение $\times 400$.

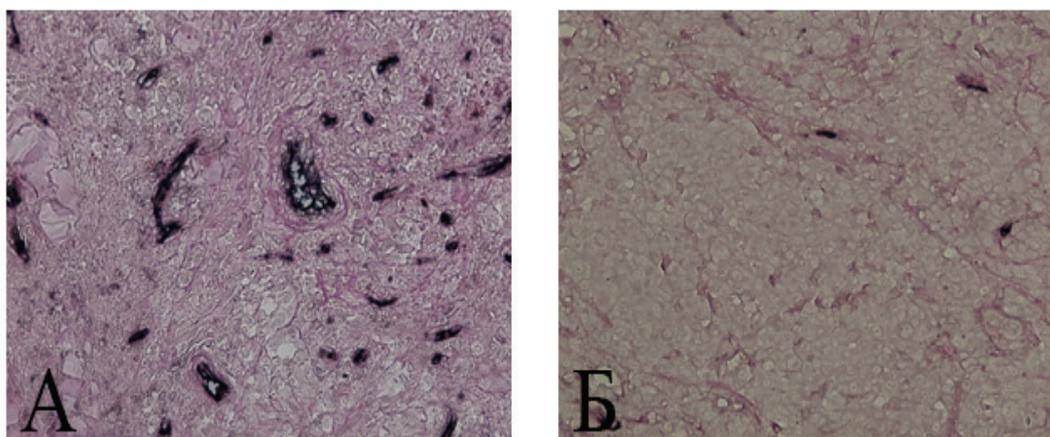


Рис. 2. Комбинированное CD31/CD34/PAS-окрашивание ткани меланомы кожи, хромоген BCIP/NBT. Увеличение $\times 200$:
А: зона максимальной плотности микрососудов в опухоли;
Б: плотность микрососудов в зоне васкулогенной мимикрии.

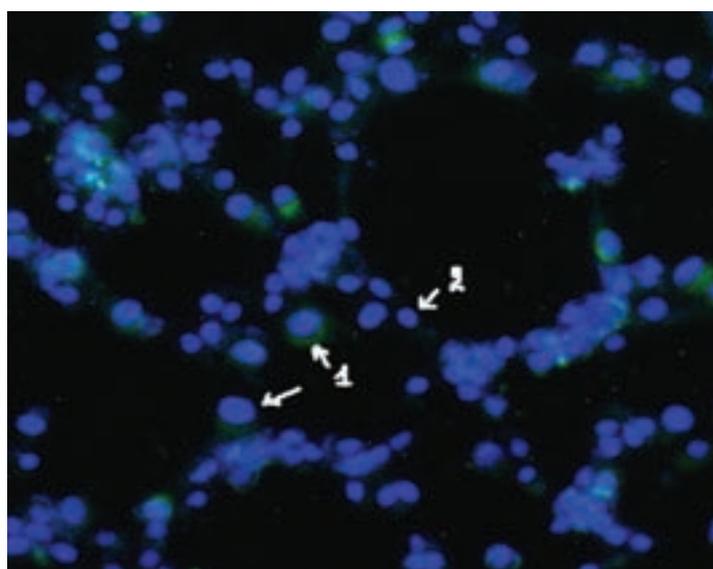


Рис. 3. Формирование сосудистоподобных структур, окрашивание флуоресцентными красителями Hoechst 33342 и CFSE.
1 – опухолевые клетки клеточной линии метастатической меланомы кожи mel Cher;
2 – эндотелиальные клетки линии SVEC-4-10.

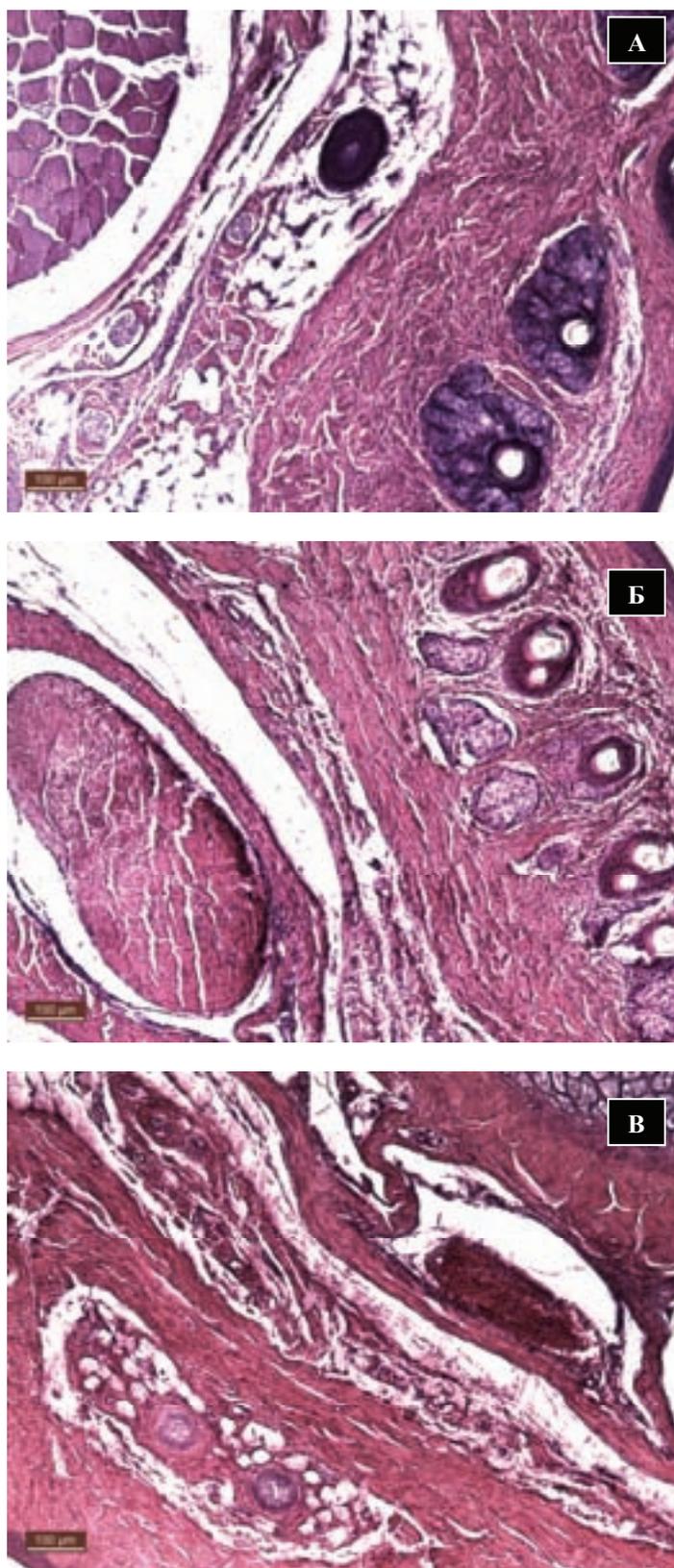
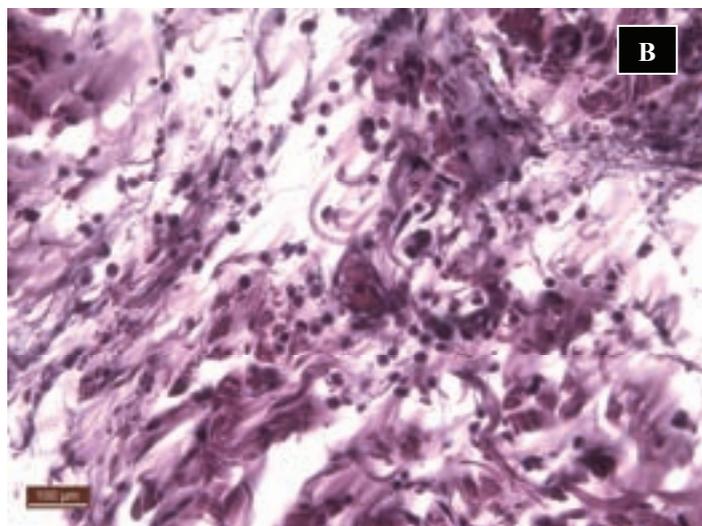
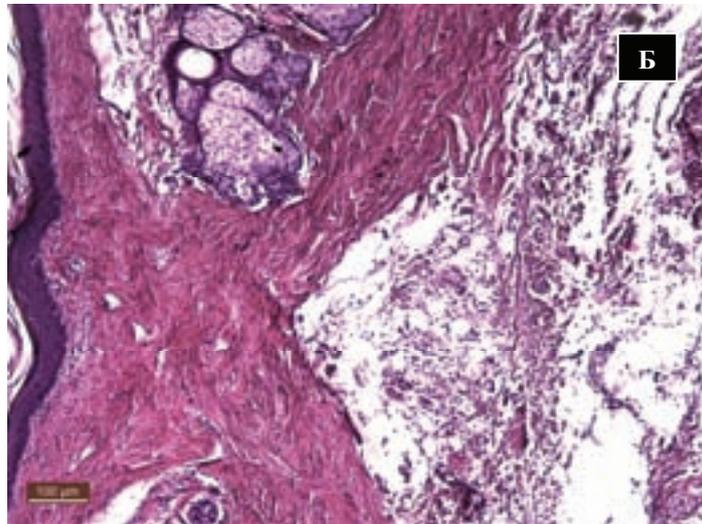
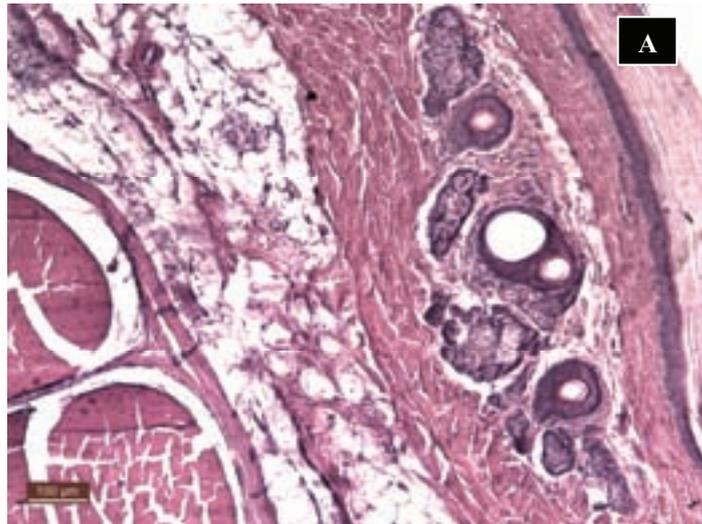


Рис.1. Поперечные срезы хвостов интактных крыс. Контроль×100, окраска гематоксилином и эозином:

А: кожа с эпидермисом, дермой и волосяными фолликулами, подкожная клетчатка с мелкими кровеносными сосудами и волосяным фолликулом, мышечный пучок, состоящий из пучков мышечных волокон меньшего калибра;

Б: в коже большое число волосяных фолликулов с сальными железами, подкожная соединительная ткань неширокая с грубыми коллагеновыми волокнами, сухожилие, покрытое плотной соединительной тканью;

В: кожа с волосяными фолликулами, подкожная соединительная ткань неширокая с грубыми коллагеновыми волокнами, вена с пристеночным сгустком крови, вверху – участок хряща.



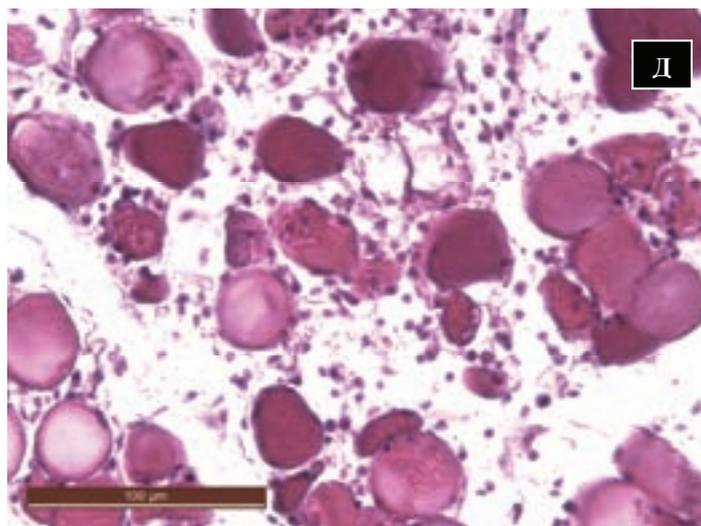
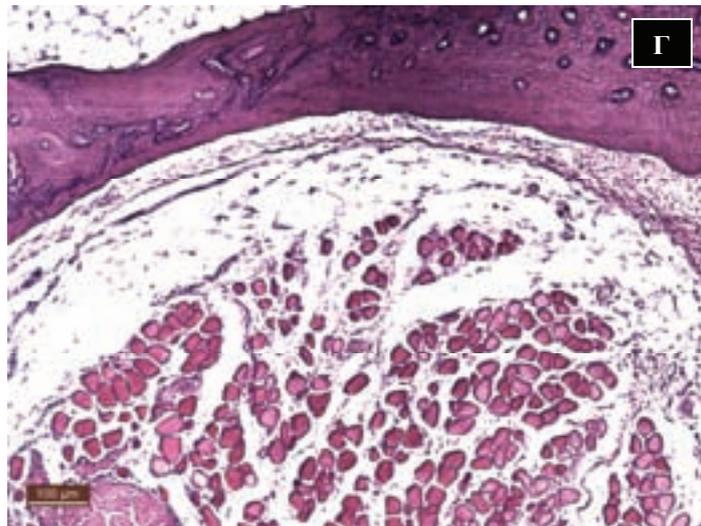


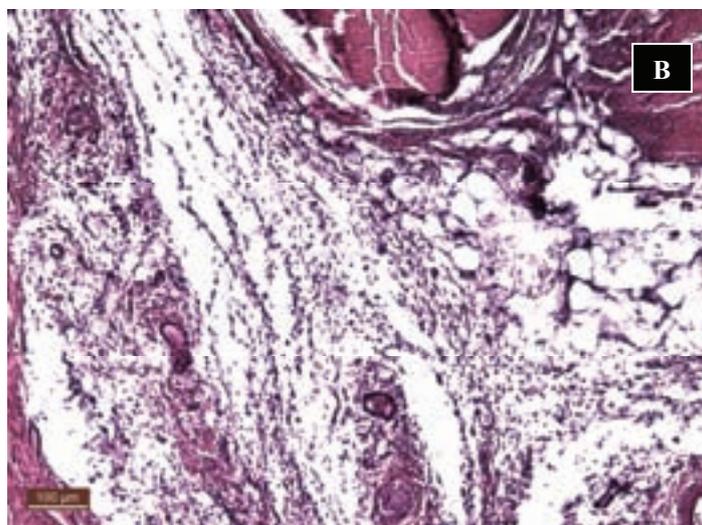
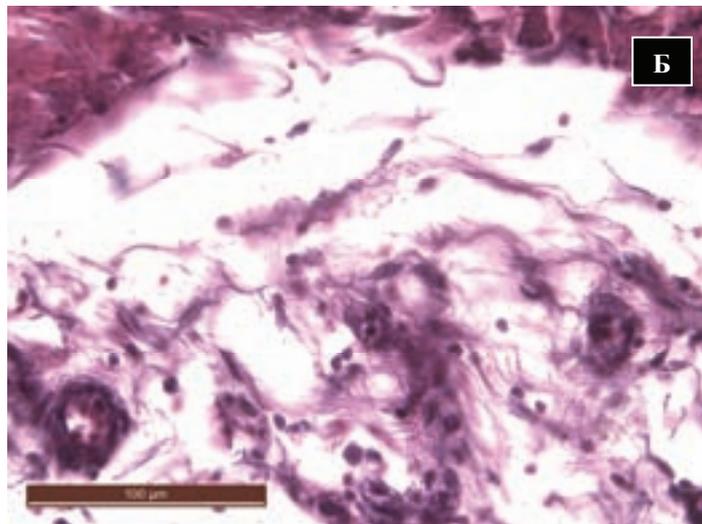
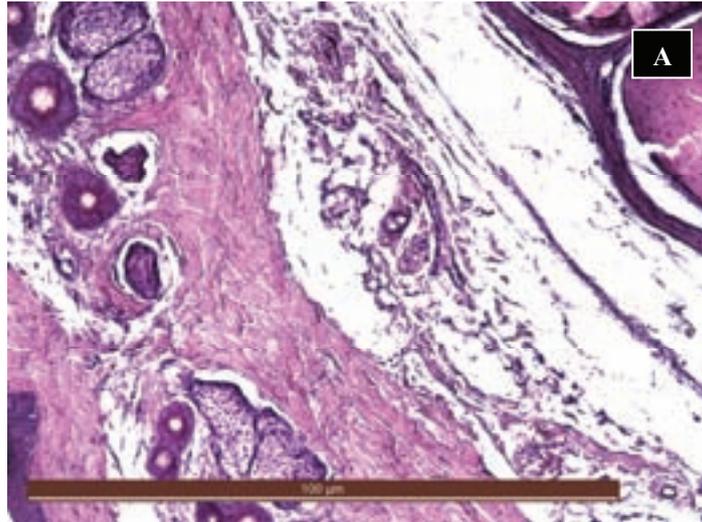
Рис. 2. Поперечные срезы хвоста крыс после однократного применения УЗ-установки «УСДТ» в сканирующем режиме. Окраска гематоксилином и эозином:

А: 1 сутки после УЗ-воздействия интенсивностью 3 Вт/см²: кожа, подкожная клетчатка, сухожилия;

Б-В: 1 сутки после УЗ-воздействия интенсивностью 4,5 Вт/см² и 6 Вт/см²: отек и клеточная инфильтрация в подкожной клетчатке;

Г-Д: 1 сутки после УЗ-воздействия интенсивностью 4,5 Вт/см² и 6 Вт/см²: выраженный отек и мононуклеарная инфильтрация мышечных волокон, деструкция пучков мышечных волокон;

А-Б, Г: $\times 100$; в, д – $\times 400$.



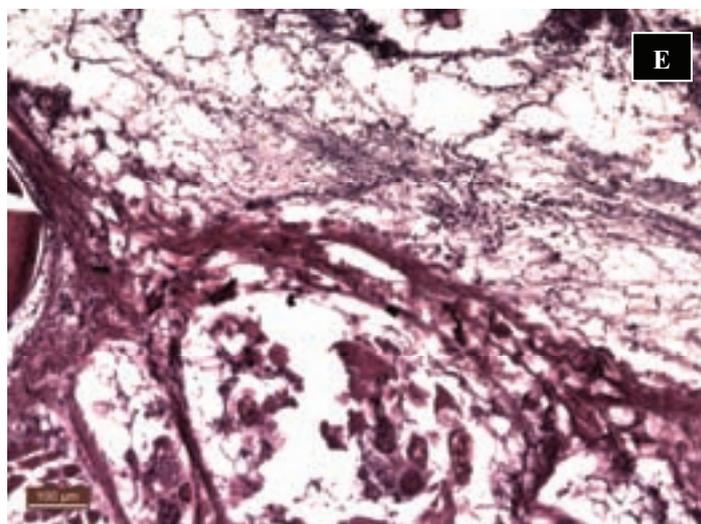
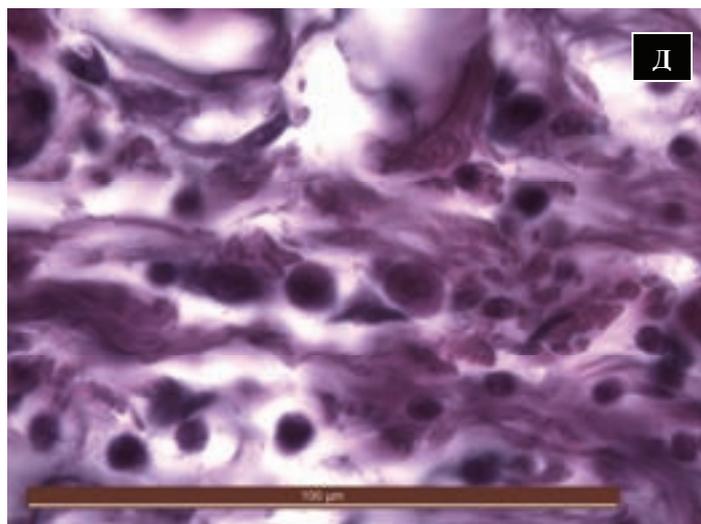
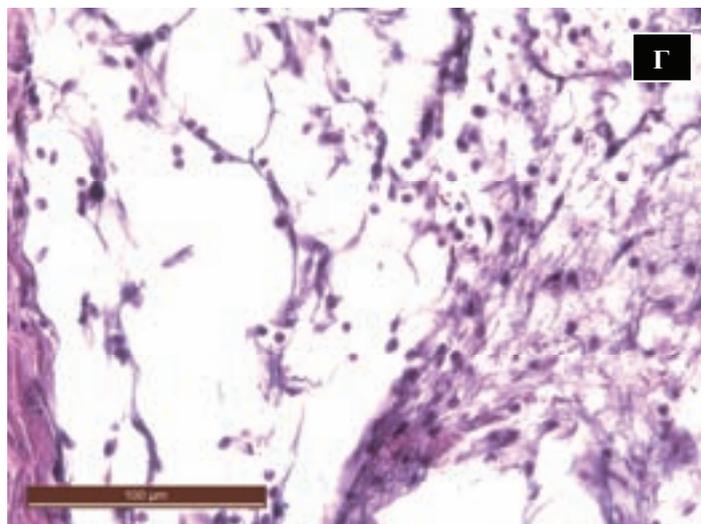


Рис. 3. Поперечные срезы хвостов крыс после однократного применения УЗ-установки «УСДТ» в направленном режиме. Окраска гематоксилином и эозином:

А: повреждение отдельных волосяных фолликулов;

А–Б: 1 сутки после применения УЗ интенсивностью 3 Вт/см²: отек и клеточная инфильтрация в подкожной соединительной ткани;

В–Г: 1 сутки после применения УЗ интенсивностью 4,5 Вт/см²: выраженные отек и клеточная инфильтрация в подкожной соединительной ткани;

Д–Е: 30 суток после применения УЗ интенсивностью 6 Вт/см²: д – отек и мононуклеарная инфильтрация в подкожной рыхлой соединительной ткани, Е – деструкция мышечных волокон, макрофаги с фагоцитированными обломками погибших клеток в цитоплазме;

А, В, Е: ×100;

Б, Г: ×400; д – ×1000.

Рисунки к статье *И.В. Маниной и соавт.*
**«ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ЦЕЛНОКЛЕТОЧНОЙ GM-CSF-СЕКРЕТИРУЮЩЕЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНЫ
ПУТЕМ ПРЕИНКУБАЦИИ С ЦИТОКИНАМИ»**

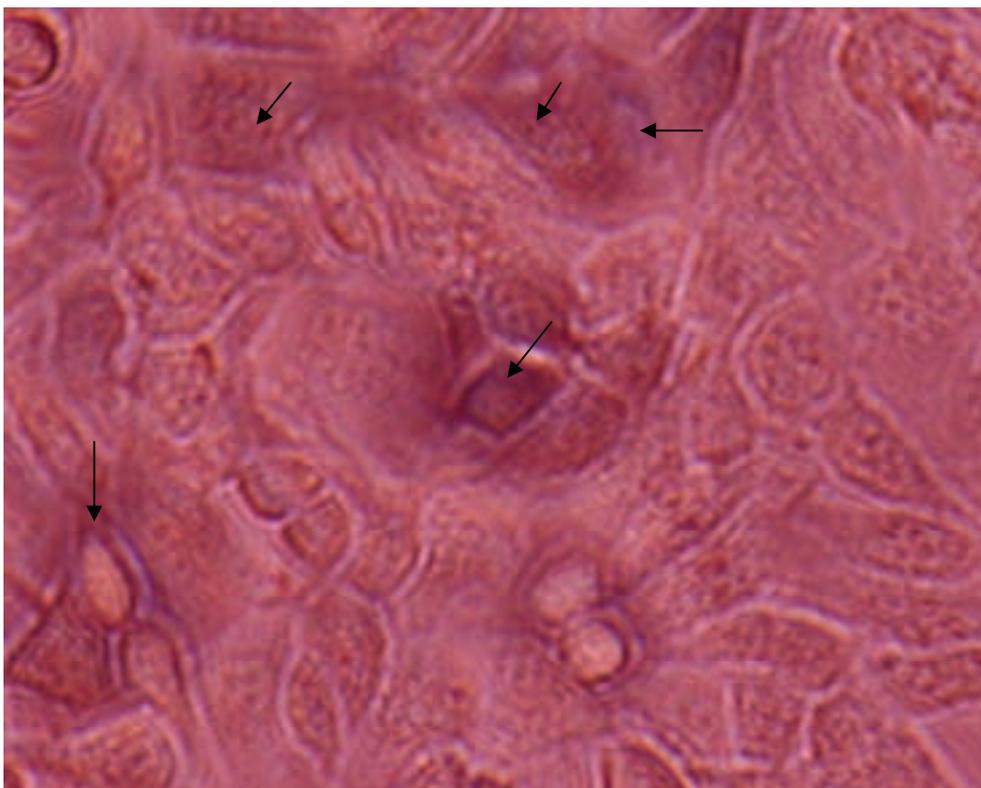


Рис. 1. Клетки GM-CSF-секретирующего клона BG, культивированные 48ч в присутствии INF- γ (концентрация 10 нг/мл культуральной среды).

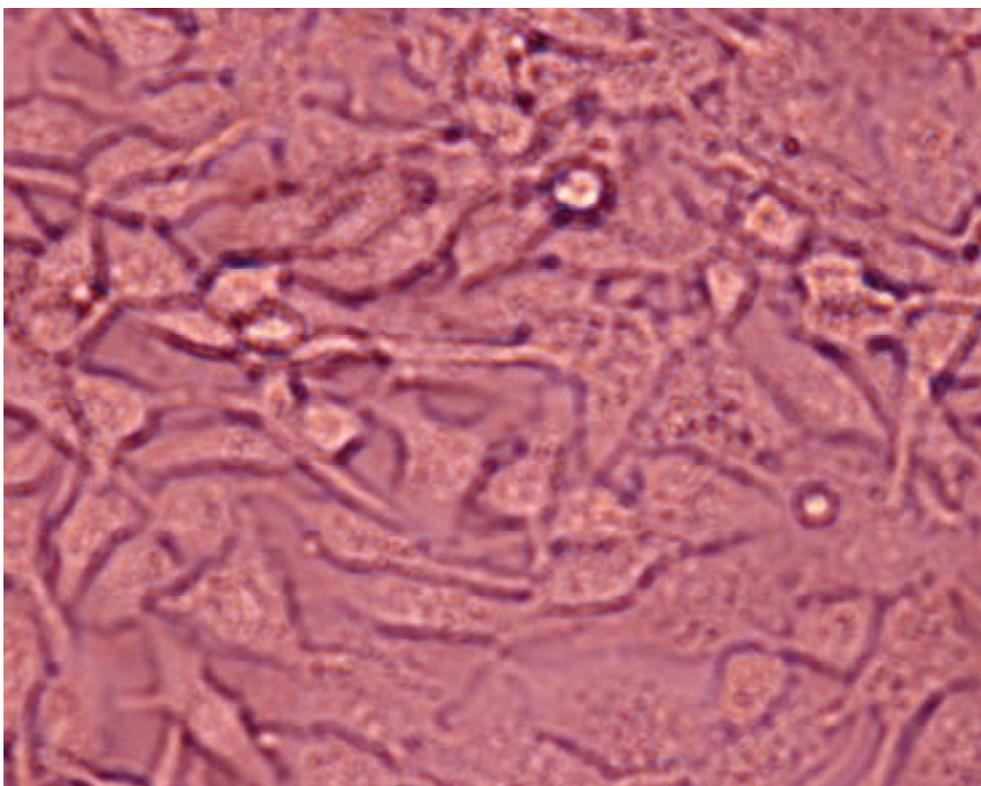


Рис. 2. Клетки GM-CSF-секретирующего клона BG, культивированные без присутствия INF- γ в среде (контроль).

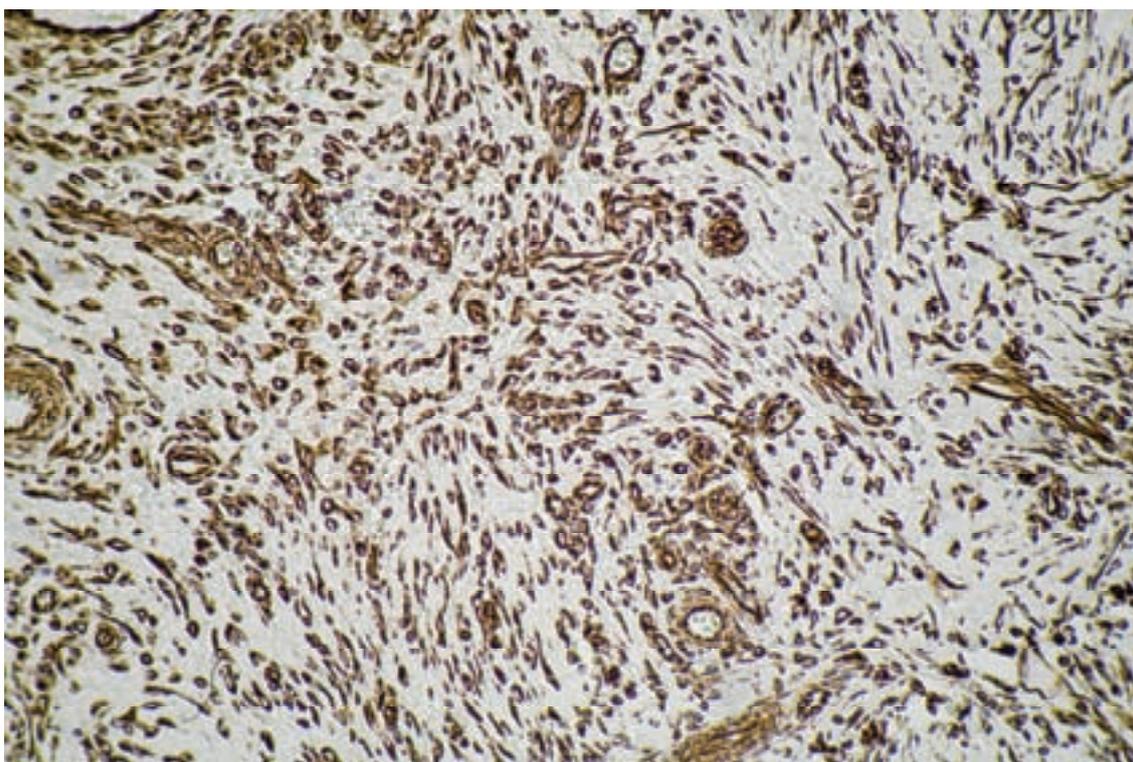


Рис. 1. Веретенноклеточный вариант ГИСО желудка, позитивная реакция с антителами к виментину. Об.40 × Ок.10.

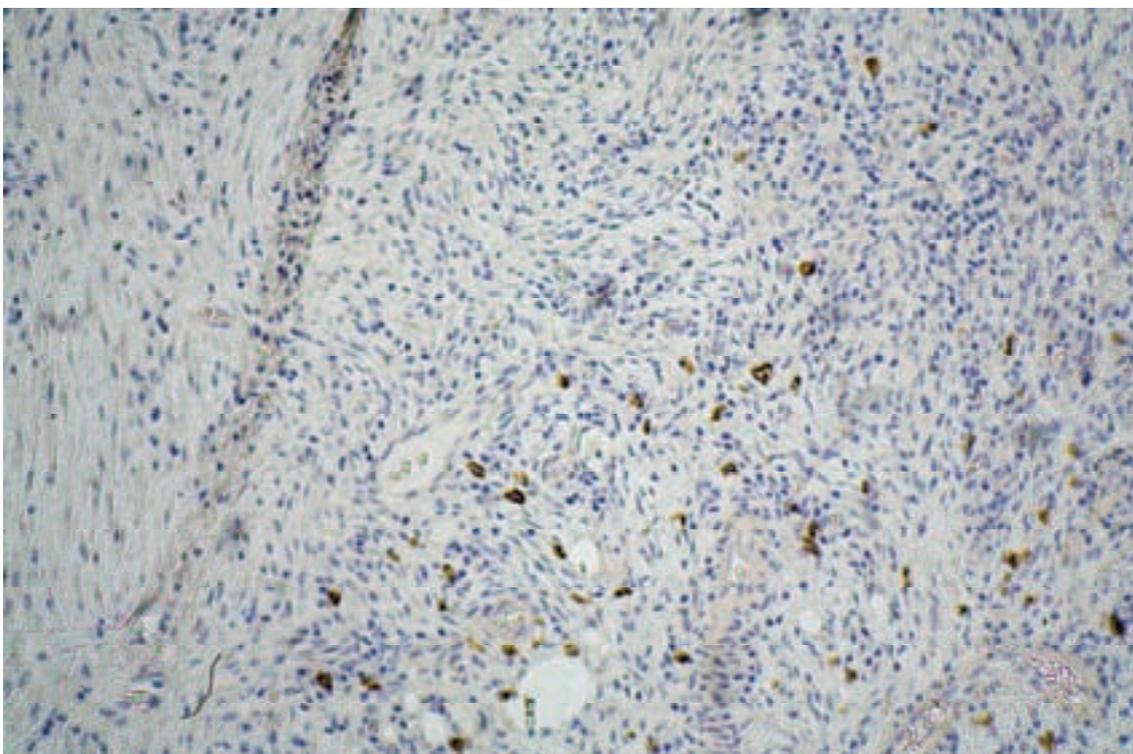


Рис. 2. Веретенноклеточный вариант ГИСО желудка позитивная реакция с антителами к CD117 в клетках опухоли. Об.40 × Ок.5.

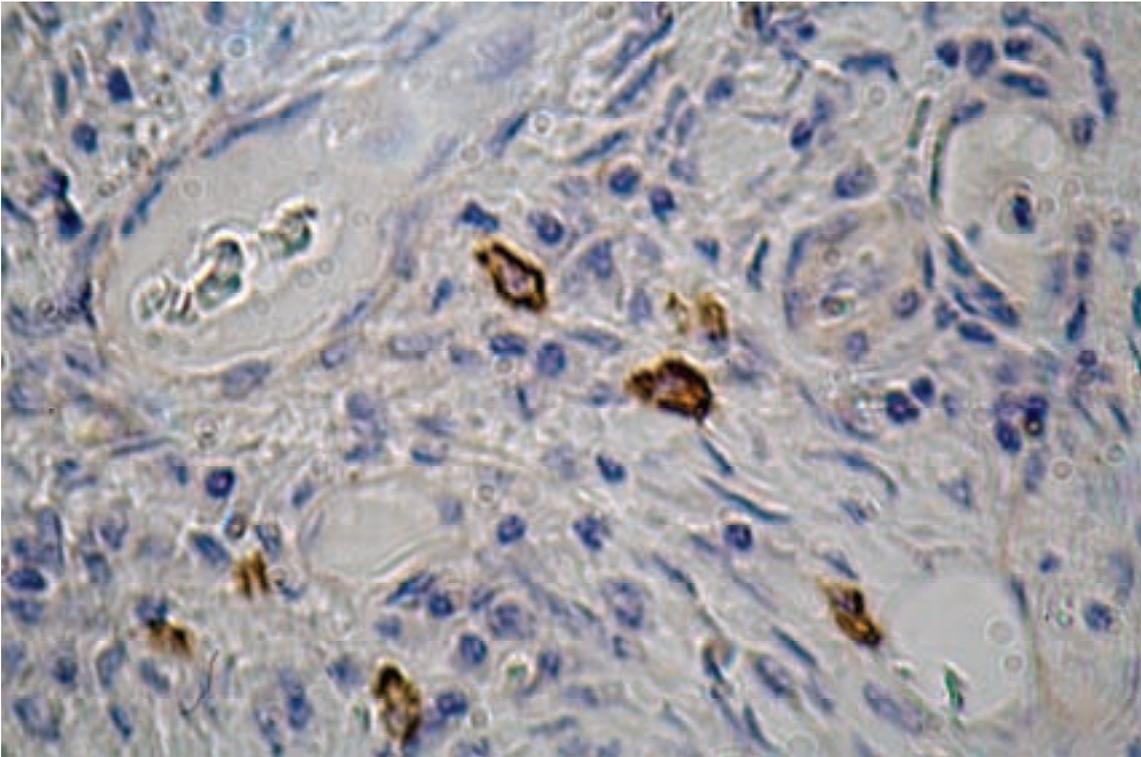


Рис. 3. Эпителиодноклеточный вариант ГИСО желудка, позитивная реакция с антителами к CD34 в клетках опухоли. Об.100 × Ок.10.

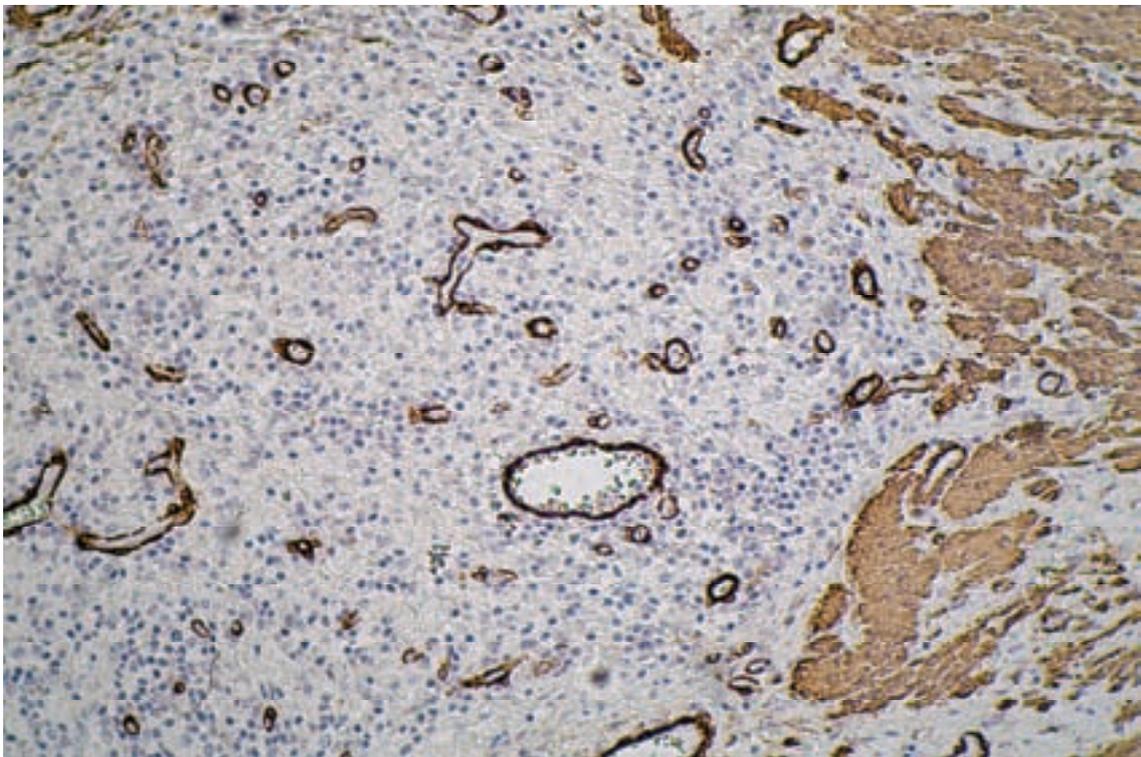


Рис. 4. Веретенноклеточный вариант ГИСО желудка, позитивная реакция с антителами к протеину S-100. Об.40 × Ок.10.