



ISSN 1726-9784



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



Russian Journal
of Biotherapy

1/2014

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№1 Том 13 2014 г.

УДК 616-085.2/3

Учредители

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

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

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

Редколлегия

М.А. Барышникова, канд. фарм. наук (отв. секретарь),
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.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),
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)

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

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

Регистрационный номер:

ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.

Почтовый адрес:

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

НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

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

E-mail: biotherapy_rbi@mail.ru

Интернет-версия: www.ronc.ru/1915

Подписной индекс 81679

Объем 6 усл.-печ. листов,
подписано в печать 20.02.2014
Тираж 1000 экз.

Издательская группа РОНЦ:

115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24.

Тел. +7 (499) 324 24 70; ronc@list.ru

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

Принт-менеджмент:

«Практическая медицина»

Тел.: +7 (495) 981-91-03

www.medprint.ru

СОДЕРЖАНИЕ

№1 2014

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>Н.К. Клаан, Т.А. Пронина, Л.П. Акинъшина, В.В. Решетникова</i> ЯДЕРНЫЙ ФАКТОР КАППА В (NF-κB) В КАЧЕСТВЕ МИШЕНИ ДЛЯ ДЕЙСТВИЯ ПРИРОДНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ	3
--	---

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>В.А. Мисюрин, А.Е. Лукина, А.В. Мисюрин, Л.А. Кесаева, Е.Н. Мисюрина, Ю.П. Финашутина, И.Н. Солдатова, А.А. Крутов, И.В. Санникова, М.Н. Ротанова, В.А. Лапин, О.А. Рукавицын, С.В. Шаманский, Н.К. Хуажева, В.Л. Иванова, Н.В. Архипова, Ю.А. Лесная, О.В. Шитова, Е.А. Борисенкова, Т.М. Толстокожая, Е.Н. Голубева, Н.А. Бычкова, Н.А. Вовилина, И.И. Гуцанская, Г.Н. Михайлова, А.Ю. Барышников</i> ОСОБЕННОСТИ СООТНОШЕНИЯ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ PRAME И PML/RARα В ДЕБЮТЕ ОСТРОГО ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА	9
<i>Е.Н. Захарова, П.К. Иванов, Т.Н. Заботина, Н.В. Голубцова, И.В. Чинарева, А.С. Гриневич, Д.Ю. Блохин</i> ДВУХЦВЕТНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МКА СЕРИИ ISO, КОНЪЮГИРОВАННЫХ С ЦИАНИНОВЫМ КРАСИТЕЛЕМ IMD-306	17
<i>И.Ю. Филюшкина, Н.В. Голубцова, В.В.Новиков, М.А. Барышникова, З.А. Соколова, А.И. Чкалина, Е.В. Борисова, П.К. Иванов, И.К. Воротников, А.Ю. Барышников</i> ИЗМЕНЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИМЫХ ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АНТИГЕНОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	23
<i>А.Н. Хочанский, А.Е. Земляков, О.В. Калюжин, В.В. Решетникова</i> ВЛИЯНИЕ β-ГЛИКОЗИДОВ МУРАМИЛДИПЕПТИДА НА NK-АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ И ФАГОЦИТАРНУЮ ФУНКЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА	27
<i>М.В. Дмитриева, Н.А. Оборотова, О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, И.И. Агапов, М.П. Кирпичников</i> ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА БОРХЛОРИНА	31
<i>Н.В. Грищенко, М.А. Барышникова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников</i> ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ НЕ ИСПОЛЬЗУЮТ CD95-ЗАВИСИМЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ АПОПТОЗА	37
<i>Г.К. Герасимова, Н.П. Яворская, И.С. Голубева, Г.Н. Апрышко, Ю.Ю. Солодунов, Б.В. Страдомский, А. Ю. Барышников</i> ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА СТЕЛЛАНИН® НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ	43
<i>Н.В. Грищенко, Б. Альбассит, М.А. Барышникова, Л.В. Ланцова, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, В.П. Краснов, А.Ю. Барышников</i> СРАВНЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ КЛАССА НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ	49
<i>В.А. Горбунова, Л.В. Манзюк, Л.В. Демидов Г.Ю. Харкевич</i> ЛИЗОМУСТИН – ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ ИЗ ГРУППЫ ПРОИЗВОДНЫХ НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ В ЛЕЧЕНИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ	55
Правила оформления статей для публикации.....	22; 42; 54
Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике» Москва, 20-21 марта 2014 года ТЕЗИСЫ.....	57

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 615.277.3.015.1:539.1

Н.К. Клаан¹, Т.А. Пронина¹, Л.П. Акиншина¹, В.В. Решетникова²**ЯДЕРНЫЙ ФАКТОР КАППА В (NF-κB) В КАЧЕСТВЕ МИШЕНИ
ДЛЯ ДЕЙСТВИЯ ПРИРОДНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ**¹ВИНИТИ РАН, Москва²ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва**Контактная информация**

Клаан Наталья Константиновна, старший научный сотрудник отдела научной информации проблем наук о жизни ВИНИТИ РАН

адрес: 125190, Москва, ул. Усиевича, 20; тел. +7(499)152-57-78

e-mail: klaannat@mail.ru

Статья поступила 29.08.2013, принята к печати 27.01.2014.

Резюме

Представлен краткий обзор, посвященный роли ядерного фактора каппа В (NF-κB) в патогенезе опухолей, опухолевой прогрессии, опухолевом ангиогенезе и метастазировании опухолей. Особое внимание уделено возможности использования NF-κB в качестве мишени для терапии опухолей. Приведены примеры противоопухолевых средств, действие которых реализуется через ингибирование NF-κB.

Ключевые слова: ядерный фактор каппа В (NF-κB), опухоли злокачественные, противоопухолевые средства.

N.K. Klaan¹, T.A. Pronina¹, L.P. Akinshina¹, V.V. Reshetnikova²**NUCLEAR FACTOR KAPPA B (NF-κB) AS A TARGET
FOR ACTION OF NATURAL ANTITUMOR SUBSTANCES**¹All-Russian Institute of Scientific and Technical Information RAS, Moscow²FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow**Abstract**

There is a review about the role of kappa B nuclear factor (NF-κB) in the pathogenesis of tumors, tumor progression, tumor angiogenesis and tumor metastasis. Special focus is on the possibility of using NF-κB as a target for cancer therapy. The examples of anticancer agents are given which action is realized through the inhibition of NF-κB.

Key words: nuclear factor kappa B, cancer, anticancer drug.

Введение

Развитие и прогрессия злокачественных опухолей жестко связаны с нарушением регуляции апоптотических путей, которые в норме защищают многоклеточный организм от неконтролируемой клеточной пролиферации. Один из важнейших регуляторов процесса апоптоза – ядерный фактор κB (NF-κB), фактор транскрипции ряда генов, ответственных за различные клеточные функции, был открыт [12] в 1986 г. В настоящее время накоплено множество экспериментальных данных о том, что он играет важную роль в патогенезе и прогрессии злокачественных опухолей человека. NF-κB представляет собой гомодимерные или гетеродимерные комплексы белков семейства Rel: RelA (p65), RelB, cRel, NF-κB1 (p105) и NF-κB2 (p100). В большинстве типов покоящихся клеток NF-κB существует в виде гетеродимера, состоящего из субъединиц p50 и RelA. NF-κB играет решающую роль в регуляции экспрессии множества генов, вовлеченных в пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток, а также генов воспалительного и иммунного ответа. В покоящихся клетках NF-κB инактивирован вследствие взаимодействия с ингибиторными белками IκB (IκB-альфа, -бета, -гамма, -эпсилон), а

также белками p105 и p100 (предшественниками p50 и p52 соответственно) и локализован в цитоплазме. Высвобождение NF-κB из комплекса с IκB приводит к быстрому появлению активной формы NF-κB в клеточных ядрах. Свободный NF-κB связывается с промоторами регулируемых генов и увеличивает эффективность их транскрипции. Транскрипция генов, регулируемых NF-κB, может быть активирована через минуты после воздействия на клетки соответствующим индуктором.

Активация NF-κB происходит или каноническим (для NF-κB1) или неканоническим путем (для NF-κB2) [22]. Активация и ядерная транслокация димеров NF-κB по каноническому пути зависит от ИКК-бета, в то время как неканонический путь зависит от NIK и ИКК-альфа. Клеточная стимуляция различными сигналами индуцирует фосфорилирование IκB посредством IκB-киназы (IKK, включающей ИКК-альфа, ИКК-бета или NEMO), которая в некоторых типах клеток регулируется путями P13K через PKB/AKT (активация P13K приводит к увеличению транскрипции NF-κB). Расщепление NF-κB1(p105) до p50 происходит конститутивно, тогда как расщепление NF-κB2 (p100) до p52 жестко контролируется. При активации путей NF-κB2 NIK фосфорилирует ИКК-альфа, которая, в свою очередь,

фосфорилирует p100. Это приводит к убиквитинированию и протеасомной деградации домена, подобного IκB p100, что дает возможность гетеродимеру p52/Rel транслоцироваться в ядро. Фосфорилирование IκK-альфа усиливает регулируемую NF-κB экспрессию генов и супрессирует обусловленную p53 экспрессию генов, что промотирует рост клеток и ингибирует апоптоз. NF-κB регулирует экспрессию более чем 400 генов, многие из которых являются критическими для выживания клеток [20]. Активация NF-κB приводит к увеличению экспрессии белков-ингибиторов апоптоза (IAPs), а именно c-IAP1, c-IAP2, XIAP и сурвивина. Более того, NF-κB принимает участие в *up*-регуляции синтеза белка c-FLIP. c-FLIP ингибирует активацию каспазы-8 и семейство белков Bcl, в том числе Bcl-2, Mcl-1 и Bcl-xL, которые препятствуют действию проапоптотических белков, включая Bid, Bad и Bax. NF-κB также регулирует экспрессию гена апоптотического белка Fas и циклина D1. Кроме того, NF-κB регулирует экспрессию металлопротеиназы-9 (MMP-9), активность которой связана с миграцией клеток и метастатическим потенциалом раковых клеток. NF-κB активируется в ответ на различные стимулы - воспалительные цитокины, клеточный стресс, а также факторы роста.

Исследование экспрессии NF-κB в процессе опухолевой прогрессии рака толстой кишки в зависимости от факторов питания [24] показало, что высокое потребление животного белка, рафинированных углеводов, насыщенных жиров, n-6-жирных кислот и алкоголя связано с повышением уровня экспрессии NF-κB и агрессивностью опухоли, в то время как высокое потребление n-3-жирных кислот, пищевых волокон, витамина E, флавоноидов, изофлавонов, бета-каротина и селена способствует снижению уровня экспрессии NF-κB и менее агрессивному течению заболевания.

В опухолевых клетках нарушены пути передачи сигналов NF-κB. Более того, в большинстве опухолевых клеток NF-κB конститутивно активирован и локализован в ядрах. Активация NF-κB не только защищает раковые клетки от апоптоза, но и стимулирует их пролиферацию. Конститутивная активация NF-κB выявлена в клетках рака предстательной железы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, нейробластомы, Т-клеточного лейкоза, множественной миеломы, рака печени, рака молочной железы и клетках некоторых других злокачественных опухолей. Клетки многих злокачественных опухолей резистентны к различным противоопухолевым средствам *de novo* или приобретают резистентность к ним в процессе терапии. Накоплены доказательства того, что ряд антиапоптотических путей, включая NF-κB, критичны в модуляции действия противоопухолевых средств. Ингибирование активации NF-κB стимулирует апоптоз, это свидетельствует о том, что баланс выживаемости/гибели клеток зависит от степени активации NF-κB. Ингибирование активности NF-κB может быть достигнуто посредством влияния на любые ступени его активации: предотвращение транслокации NF-κB в ядро, нарушение образования комплексов NF-κB, регулирующих активность NF-κB, ингибирование его связывания с ДНК и другие стадии. Последствия активации NF-κB могут быть предотвращены посредством влияния на мишени его действия. Агенты, down-регулирующие активацию NF-κB, могут обладать противоопухолевыми свойствами. В настоящее время ведется поиск природных и синтетических ингибиторов NF-κB.

Ингибиторы NF-κB в качестве индукторов дифференцировки опухолевых клеток

Индукция дифференцировки опухолевых клеток – это один из альтернативных путей торможения опухолевого роста. Диосгенин, стероидный сапонин из *Dioscorea villosa*, индуцирует мегакариоцитарную дифференцировку клеток эритролейкоза человека HEL с последующей индукцией апоптоза. Как и большинство природных соединений, диосгенин реализует свое биологическое действие через различные мишени. Выявлено, что NF-κB является одной из первичных мишеней. Диосгенин ингибирует активацию NF-κB в клетках HEL в процессе их дифференцировки в зрелые мегакариоциты. Таким образом, диосгенин может быть использован в качестве основы для создания противолейкозного средства [7].

Ингибиторы NF-κB в качестве индукторов программируемой клеточной гибели – апоптоза

В настоящее время накоплено множество данных, которые указывают на то, что противоопухолевые средства убивают опухолевые клетки посредством программируемой клеточной гибели (апоптоза, митотической катастрофы, аноикиса). Многие исследователи полагают, что резистентность к противоопухолевой терапии обусловлена инактивацией апоптоза.

Среди природных соединений, оказывающих благотворное влияние на организм человека, достаточно хорошо изучен полифенол ресвератрол, выявляемый в достаточном количестве в красном вине. Ресвератрол способствует профилактике сердечно-сосудистых заболеваний, ингибирует пролиферацию и индуцирует гибель *in vitro* и *in vivo* опухолевых клеток различного тканевого происхождения [5]. Исследование механизма антипролиферативного действия ресвератрола на клетки рака предстательной железы LNCaP (индуцибельный NF-κB, AR+) и PC3 (конститутивный NF-κB, AR-) показало, что антипролиферативный и апоптоз-индуцирующий эффект ресвератрола реализуется через ингибирование им P13K, которое приводит к ингибированию NF-κB [5].

Ресвератрол также ингибирует пролиферацию клеток рака молочной железы MCF-7 и индуцирует в них апоптоз посредством ингибирования NF-κB (через сигнальные пути P13K). Более того, в клетках MCF-7 ресвератрол ингибирует индуцированную инсулиноподобным фактором роста первого типа активность MMP-9, что свидетельствует о возможном противометастатическом действии ресвератрола [23].

Примером другого природного противоопухолевого средства, индуцирующего апоптоз клеток рака молочной железы, может служить токотриенол, компонент пальмового масла, относящийся к семейству витаминов группы E. На культуре клеток высокоагрессивного, трижды негативного рака молочной железы MDA MB-231 и культуре эстроген-зависимых клеток MCF-7, токотриенол проявляет выраженную антипролиферативную и апоптоз-индуцирующую активность, сравнимую с активностью паклитаксела [17].

Известно, что активные формы кислорода, с одной стороны, способствуют генетической нестабильности и неконтролируемой пролиферации клеток, а с другой стороны, их длительное воздействие в высокой концентрации может оказывать летальное

действие на опухолевые клетки. Таким образом, стратегия киллинга опухолевых клеток под действием генераторов активных форм кислорода может быть весьма эффективной. Одним из примеров молекул-генераторов активных форм кислорода служит сесквитерпеновый лактон из листьев *Tanacetum parthenium* партенолид [27], содержащий кольцо альфа-метилена-гамма-лактона и эпоксид, который специфически взаимодействует с нуклеофильными сайтами биомолекул. Эти химические свойства, по-видимому, объясняют его биологические свойства, такие как способность вызывать оксидативный стресс и ингибировать активированный в злокачественных клетках NF-κB. Партенолид ингибирует NF-κB через сигнальные пути киназы IκB и через непосредственную модификацию белка p65. Оба эти события препятствуют связыванию NF-κB с ДНК. Партенолид также проявил избирательную противоопухолевую активность, реализуемую через селективную индукцию апоптоза опухолевых клеток различного тканевого происхождения – рака предстательной железы, рака молочной железы, лейкоза, множественной миеломы (IC 50 1-10 мкМ). К сожалению, партенолид характеризуется плохими фармакологическими свойствами *in vivo*, однако его водорастворимый аналог DMAPT, в 1000 раз более растворимый в воде, чем сам партенолид, проявил противоопухолевую активность в фазе I клинических испытаний. Выявлено также, что противоопухолевая активность DMAPT, так же как и партенолида, обусловлена генерацией активных форм кислорода и ингибированием NF-κB [28].

Исследование механизма противоопухолевого действия N6-изопентиладенозина на линии клеток рака молочной железы MDA MB-231 [13] показало, что это соединение вызывает апоптотическую гибель клеток посредством снижения фосфорилирования Akt, предотвращения активации NF-κB, увеличения экспрессии Bax, снижения уровня Bcl-2 с последующей индукцией апоптоза через митохондриальный путь (высвобождение цитохрома C и активация каспазы-3).

Примером другого природного соединения, ингибирующего NF-κB, проявляющего селективные противоопухолевые свойства как *in vitro*, так и *in vivo*, служит куркумин, полифенол из корня куркумы, который, как известно, оказывает противовоспалительное, антиоксидантное, цитотоксическое, антиинвазивное и апоптоз-индуцирующее действие на опухолевые клетки различного тканевого происхождения [34]. Его синтетические аналоги GO-Y030 и GO-Y 078 в 7 и 12 раз более эффективно, чем куркумин, ингибируют опухолевый рост множественной миеломы [25]. А на клетках медуллярной карциномы куркумин проявляет выраженное противоопухолевое апоптоз-индуцирующее действие посредством ингибирования экспрессии NF-κB и, соответственно, ниже лежащего каскада включающего сурвивин, bcl-2, bcl-xL и cIAP-1. В настоящее время куркумин проходит I фазу клинических испытаний у больных злокачественными опухолями и предзлокачественными заболеваниями.

Хорошо известное соединение ванилин, обладающее широким спектром биологической активности (антиоксидантной, антимуtagenной, противоопухолевой и противометастатической), усиливает апоптоз клеток HeLa, индуцированный TRAIL, посредством ингибирования активации NF-κB [16].

Часто используемый природный флавоноид кверцетин, проявляющий противоопухолевую активность на клетках рака слюнной железы как *in*

vivo, так и *in vitro*, посредством индукции апоптоза через митохондриальный путь [30] down-регулирует NF-κB, что коррелирует с супрессией сигнальной оси PI3K/Akt/ IκK-альфа.

Еще один пример природного противоопухолевого средства, селективно индуцирующего апоптоз опухолевых клеток, – пчелиный яд и его главный компонент мелиттин, который в экспериментах *in vitro* и *in vivo* эффективен против рака предстательной железы посредством ингибирования ДНК-связывающей активности NF-κB [21].

Кроме природных ингибиторов NF-κB, селективных индукторов апоптоза опухолевых клеток, известны и его синтетические ингибиторы. Используемые в клинике в настоящее время такие лекарственные средства, как бортезомиб и другие ингибиторы протеасом, как так называемые таргетные препараты, ингибируют NF-κB. Целенаправленный поиск низкомолекулярных селективных противоопухолевых средств привел к открытию производных трииндолметана, эффективных против целого ряда опухолевых клеток различного гистогенеза [1].

Роль ингибиторов NF-κB в сенсibilизации раковых клеток к противоопухолевым средствам

Комбинированная лекарственная терапия опухолей более эффективна, чем монотерапия, так как каждый из препаратов комбинации можно использовать в более низких дозах и, тем самым, снижать токсичность лечения при одинаковом терапевтическом эффекте.

В ряде исследований *in vivo* и *in vitro* показано, что экзогенные полиненасыщенные жирные кислоты увеличивают цитотоксическую активность ряда противоопухолевых средств. В частности, гамма-линоленовая (18 : 3, n-6) омега-6-полиненасыщенная жирная кислота растительного происхождения синергически усиливает при совместном введении эффективность паклитаксела против гормонозависимого и гормоннезависимого рака молочной железы. Аналогично, докозагексаеновая кислота (22 : 6, n-3) повышает эффективность доксорубина в клетках рака молочной железы. Более того, жирнокислотный анализ опухолей молочной железы показал, что более высокий уровень полиненасыщенных жирных кислот в жировой ткани наблюдается у больных с лучшим ответом на терапию и служит независимым фактором прогноза заболевания. Полиненасыщенные жирные кислоты повышают эффективность действия противоопухолевых средств по различным механизмам, включая изменение текучести биомембран, модуляцию мембранных рецепторов и влияние на сигнальные пути апоптоза через NF-κB, причем их эффект зависит как от типа опухолевых клеток, так и от используемого препарата. Известно, что многие противоопухолевые средства, такие как таксаны, цисплатин, 5-фторурацил и антрациклины индуцируют антиапоптотическую активность сигнальных путей NF-κB, чем частично обусловлена лекарственная устойчивость опухолей. Ингибирование NF-κB увеличивает противоопухолевую эффективность цисплатина, доксорубина и доцетаксела в отношении рака предстательной железы, рака молочной железы, рака легкого и поджелудочной железы посредством усиления апоптоза. Длинноцепочечные жирные кислоты, подобные докозагексаеновой кислоте и конъюгированной линолевой кислоте, down-регулируют NF-κB, индуцируют апоптоз опухолевых клеток и значительно усиливают его при совместном использовании с противоопухолевыми средствами. В исследовании [26]

показано, что докозагексаеновая кислота резко увеличивает эффективность таксанов и, возможно, других средств против рака предстательной железы посредством ингибирования сигнальных путей NF-κB. В исследовании [9] выявили, что ингибирующая активацию NF-κB в клетках хронического лейкоза омега-3 жирная кислота при приеме внутрь увеличивает у больных эффективность терапии доксорубицином.

Урсоловая кислота, содержащаяся во многих растениях, оказывающая селективное противоопухолевое действие против малигнизированных клеток различного тканевого происхождения (HeLa, ASTC-a-1), характеризуется минимальной токсичностью в отношении нормальных клеток организма человека. Она значительно подавляет активацию NF-κB, причем этот эффект не зависит от типа клеток. Исследование возможности использования урсоловой кислоты совместно с известными противоопухолевыми средствами, такими как цисплатин и таксол, показало, что такая комбинация позволяет для достижения одинакового противоопухолевого эффекта использовать существенно более низкую дозу противоопухолевого средства, что может снизить общую токсичность лечения [15].

В комбинированной химиотерапии рака возможно и использование ингибиторов NF-κB, не оказывающих собственного противоопухолевого действия, но значительно увеличивающих эффективность известных цитотоксических средств. Например, запатентовано применение ингибитора NF-κB 9-оксоакридин-10-уксусной кислоты (не обладающей собственной цитостатической активностью) в комбинации с различными противоопухолевыми средствами для лечения рака яичника [3].

По-видимому, если апоптоз-индуцирующее действие противоопухолевого средства не реализуется через ингибирование NF-κB, а приводит к его активации, тем самым снижая его противоопухолевое действие, для повышения эффективности терапии целесообразно использовать его в сочетании с ингибиторами NF-κB. На практике это означает, что эффективность большого числа широко используемых противоопухолевых средств может быть значительно увеличена при их комбинированном совместном использовании с дешевыми нетоксичными природными ингибиторами NF-κB [6].

Ингибиторы NF-κB

в качестве антиангиогенных средств

Учитывая тот факт, что солидные опухоли, достигшие размеров более нескольких миллиметров, нуждаются для своего роста и метастазирования в образовании кровеносных сосудов, в настоящее время актуально выявление новых мишеней для антиангиогенной терапии. Многие цитостатические средства проявляют также и антиангиогенную активность. Например, ингибитор протеасом MG132, эффективно тормозящий развитие экспериментальных опухолей поджелудочной железы, проявляет и антиангиогенную активность. Это может быть объяснено тем, что в более чем 70% клеток культур и клеток первичных опухолей поджелудочной железы конститутивно активирован NF-κB, который, главным образом, регулируется белком IκB, в том числе – IκB-альфа. При стимуляции IκB-альфа быстро фосфорилируется и деградирует через убиквитин-протеасомный путь, что приводит к активации и ядерному транспорту NF-κB. Ингибиторы протеасом блокируют деградацию IκB-альфа и последующую активацию NF-κB. В исследовании [18] показано, что MG132 значительно

блокирует ассоциированный с раком поджелудочной железы ангиогенез через ингибирование NF-κB и зависимых от NF-κB проангиогенных продуктов генов VEGF и IL-8.

Многие применяемые в клинике таргетные препараты реализуют свое антиангиогенное и противометастатическое действие через сигнальные пути NF-κB. В частности, на модели гепатомы выявили, что сорафениб через ингибирование каскада NF-κB ингибирует как ангиогенез (VEGF), так и метастазирование (MMP-9) [8]. Таким образом, использование ингибиторов NF-κB, обладающих противоопухолевой активностью, позволяет предотвращать как опухолевый рост, так и ангиогенез, индуцируемый опухолью.

Ингибиторы NF-κB

в качестве противометастатических средств

Злокачественные опухоли часто даже на самых ранних стадиях развития становятся источниками вторичных метастатических опухолей, что обусловлено повышенной способностью опухолевых клеток к миграции. Лекарственные средства, снижающие миграцию опухолевых клеток, могут оказывать противометастатическое действие. Поскольку NF-κB является фактором транскрипции для многих генов, кодирующих задействованные в метастатическом каскаде молекулы (Е-кадгерин, металлопротеиназы-2; -7; -9 и др.), то среди его ингибиторов могут быть противометастатические средства. При исследовании действия кверцетина на рак полости рта выявлено, что противометастатическое действие последнего реализуется через ингибирование NF-κB и сигнальных путей металлопротеиназы -2 и -9 [14].

На клетках высокоинвазивного рака носоглотки исследовали взаимосвязь сверхэкспрессии NF-κB и их метастатического потенциала. В этих клетках значительно снижена экспрессия Е-кадгерина, кальций-зависимого гликопротеина межклеточной адгезии. Е-кадгерин играет важную роль в межклеточной в адгезии эпителиальных клеток и является супрессором метастазирования эпителиальных опухолей. Обработка клеток рака носоглотки куркумином, активным супрессором NF-κB, вызывает снижение экспрессии NF-κB и повышение экспрессии Е-кадгерина, что уменьшает способность клеток к миграции. Эти данные были подтверждены в экспериментах на мышцах с привитым раком носоглотки, у которых лечение куркумином уменьшало число метастазов [34]. На культуре клеток медуллобластомы куркумин также ингибирует миграцию клеток и, тем самым, оказывает противометастатическое действие. В исследовании продемонстрировано, что куркумин оказывает противометастатическое действие на клетки рака предстательной железы LNCaP.

α-Томатин из зеленых плодов томатов супрессирует инвазию и миграцию клеток немелкоклеточного рака легкого через ингибирование NF-κB и обусловленное этим ингибирование металлопротеиназы-7 [29].

В чесноке, широко используемом лекарственном растении, выявлено несколько противоопухолевых соединений. Среди них S-ацетил-цистеин ингибирует прогрессию и метастазирование немелкоклеточного рака легкого в моделях *in vitro* и *in vivo* по путям, вовлекающим ингибирование mTOR и NF-κB [32].

В клетках высокометастатической меланомы выявлена высокая экспрессия нуклеопорина, компонента комплекса, обуславливающего нуклеоци-

топлазматический транспорт макромолекул. Учитывая тот факт, что экспрессия нуклеопорина коррелирует с метастазированием и смертностью от рака толстой кишки, а также с агрессивностью рака молочной железы, исследовали взаимосвязь экспрессии нуклеопорина и NF-κB на культурах клеток NIH3T3 и BLM. Выявили, что нуклеопорин регулирует активность NF-κB на уровне его транспорта из цитоплазмы в ядро, и сверхэкспрессия нуклеопорина может быть ответственна за конститутивную активацию NF-κB в злокачественных клетках. Полагают, что нуклеопорин может быть мишенью для терапии опухолей с механизмом действия реализуемого через регуляцию активации NF-κB [31].

Дигидроартемизин, полусинтетическое производное артемизина, проявляет противоопухолевую активность на злокачественных клетках различного тканевого происхождения. На культуре клеток фибросаркомы человека HT-1080 исследовали влияние дигидроартемизина на индуцированную фоболмиристатацетатом инвазию и миграцию клеток [11]. Выявили, что дигидроартемизин супрессирует индуцированную фоболмиристатацетатом активацию металлопротеиназ-2 и -9 и, тем самым, инвазию и миграцию клеток посредством ингибирования активации NF-κB. Таким образом, показано, что дигидроартемизин является эффективным противометастатическим средством против клеток HT-1080 с механизмом действия, реализуемым через down- регуляцию гена металлопротеиназы-9 фактором транскрипции NF-κB. Кроме того, исследование влияния БИЦ из растений семейства крестоцветных на клетки рака прямой кишки HT29 показало, что БИЦ ингибирует их миграцию и инвазию по механизму, в основе которого лежит ингибирование уровня NF-κB и его ДНК-связывающей активности.

В патогенезе злокачественных опухолей костей и метастазов в костях система NF-κB также играет очень важную роль. В эксперименте показано, что ее ингибиторы оказывают выраженное противометастатическое действие [4]. В клинике в настоящее время для профилактики и лечения метастатического поражения костей используют препарат деносумаб – моноклональное антитело к RANCL (лиганду-активатору NF-κB) [2].

Роль ингибиторов NF-κB в токсичности противоопухолевых средств

При использовании селективных современных противоопухолевых лекарственных средств повреждаются также и нормальные клетки, что определяет токсичность химиотерапии. Использо-

вание цитотоксических противоопухолевых средств совместно с нетоксичными ингибиторами NF-κB может увеличивать их токсичность, снижая выживаемость нормальных клеток. Так, в исследовании [10] показано, что нетоксичный ингибитор NF-κB куркумин в комбинации с кардиотоксичным противоопухолевым препаратом доксорубицином потенцирует его противоопухолевое действие, но при этом увеличивает и его кардиотоксичность, что следует учитывать при клиническом использовании комбинаций

Возможности поиска противоопухолевых средств по их способности ингибировать NF-κB среди известных биоактивных соединений

С учетом накопившихся данных о NF-κB как о привлекательной мишени для создания новых противоопухолевых средств был проведен скрининг ингибиторов NF-κB среди более 2800 клинически используемых в различных областях медицины лекарственных средств и биоактивных соединений [19]. Выявлено 19 соединений, ингибирующих сигнальные пути NF-κB при концентрациях ниже 20 нМ, большинство из которых реализуют свое действие через ингибирование фосфорилирования IκB-альфа. Более того, многие из них индуцируют активность каспаз-3 и -7 (т.е. апоптоз) и оказывают ингибирующий эффект на классической модели, используемой для скрининга противоопухолевых средств – клетках рака шейки матки HeLa.

Заключение

Имеющиеся данные свидетельствуют о ключевой роли конститутивной активации сигнального каскада NF-κB при опухолевом росте. Это дает возможность направленного воздействия на патогенетические механизмы развития опухолевого процесса посредством ингибирования NF-κB. Новые ингибиторы NF-κB могут быть вновь синтезированы либо выявлены при исследовании влияния на систему NF-κB новых лекарственных средств, созданных для лечения различных заболеваний, которые проходят клинические испытания. Скрининг этих ингибиторов на противоопухолевую активность позволит расширить арсенал противоопухолевых средств без дополнительных затрат на исследование токсичности и переносимости, тем более, что ингибиторы сигнальных путей NF-κB могут одновременно оказывать апоптоз-индуцирующее, антиангиогенное и противометастатическое действие, что может внести вклад в эффективность терапии опухолей.

Литература

1. Лавренов С.Н., Исакова Е.Б., Преображенская М.Н. и др. Применение производных трииндолилметана в качестве противоопухолевых средств. Патент RU 2 454 232 С. 2-27 .06. 2012.
2. Манзюк Л.В. Анти-RANCL моноклональное антитело и его использование в онкологии // Практ. онкол. – 2011. – Т. 12, № 3. – С. 132–5.
3. Сурков К.Г. Применение 9-оксоактидин-10-уксусной кислоты, ее солей и сложных эфиров в комбинированной терапии рака яичников, способ лечения и наборы // Патент RU 2 346 692 С2 10.10.2008.
4. Aggarwal B., Darnay B.G., Sing S. Patent US № 6, 998, 383 B2 Feb14, 2006 Inhibitors of receptor activator of NF-κB and uses thereof.
5. Benitez D.A., Hermoso M.A., Pozo-Guisado E. et al. Regulation of cell survival by resveratrol involves inhibition of NF-κB – regulation gene expression in prostate cancer cells // Prostate. – 2009. – 69. – 1045–54.
6. Bharat A. Synergistic effects of nuclear transcription factor NF-κB inhibitions and anti-neoplastic agents. Patent US 7,105,576 B2 Sep.12. 2006.
7. Cailleteau C., Liagre B., Beneytout J.L. A proteomic approach to the identification of molecular targets in subsequent apoptosis of HEL cells after diosgenin-induced megakaryocytic differentiation // J. Cell Biochem. – 2009. – 107. – P. 785–96.

8. Chiang I.T., Liu Y.C., Wang W.H. et al. Sorafenib inhibits TPA-induced MMP-9 and VEGF expression via suppression of ERK/NF-κB pathway in hepatocellular carcinoma cells // *In Vivo*. – 2012. – 26(4). – P. 671–81.
9. Fahrman J.F., Ballester O.F., Ballester G. et al. Inhibition of nuclear factor kappa B in early –stage chronic lymphocytic leukemia by omega-3 fatty acids // *Cancer Invest.* – 2013. – 31(1). – P. 29–43.
10. Hosseinzadeh L., Bervaran J., Mosaffa F. et al. Curcumin potentiates doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells through generation of reactive oxygen species // *Food and Chem. Toxicol.* – 2011. – 49(5). – P. 1102–9.
11. Hwang Y.P., Yun H.J., Kim H.G. et al. Suppression of PMA-induced tumor cells invasion by dihydroartemisinin via inhibition PCCa/Raf/MAPKs and NF-κB/AP-1 –dependent mechanism // *Biochem. Pharmacol.* – 2010. – 79(12). – P. 1714–26.
12. Karin M. Nuclear factor – κB in cancer development and progression // *Nature*. – 2006. – 441. – P. 431–6.
13. Laezza Ch., Malfinano A.M., Matola T.D. et al. Involvement of Akt/NF-κB pathway in N6-isopentenyladenosine-induced apoptosis in human breast cancer cells // *Mol. Carcinogenesis*. – 2010. – 49. – P. 892–901.
14. Lai W.W., Hsu S.C., Chuen F.S. et al. Quercetin inhibits migration and invasion of SAS human cancer cells through inhibition NF-κB and matrix metalloproteinase-2/-9 signaling pathway // *Anticancer Research*. – 2013. – 33. – P. 1941–50.
15. Li Y., Xing D., Chen W.R. Enhancement of chemotherapeutic agent-induced apoptosis by inhibition of NF-κB using ursolic acid // *Int. J. Cancer*. – 2010. – 127. – P. 462–73.
16. Lirdpramongkol K., Sakurai H., Susuki S. et al. Vanillin enhances TRAIL- induced apoptosis in cancer cells through inhibition NF-κB activation // *In vivo*. – 2010. – 24. – P. 501–6.
17. Loganathan R., Selvaduray K.R., Nesaretnam K. et al. Tocotrienols promote apoptosis in human breast cancer cells by inducing poly (ADP-ribose) polymerase cleavage and inhibiting nuclear factor kappa-B activity // *Cell Prolif.* – 2013. – 46. – P. 203–13.
18. Matsuo Y., Sawai H., Ochi N. et al. Proneasome inhibitor MG132 inhibits angiogenesis in pancreatic cancer by blocking NF-κB activity // *Dig. Dis. Sci.* – 2010. – 55. – P. 1167–76.
19. Miller S.C., Huang R. Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-κB signaling and their mechanism of action // *Biochem. Pharmacol.* – 2010. – 79(9). – P. 272–80.
20. Pahl H.L. Activators and target genes of Rel/NF-κB transcriptional factors // *Oncogene* – 1999. – 18. – P. 6853–66.
21. Park M.H., Choi M.S., Kwak D.H., Oh Ki-W. Anti-cancer effect bee venom in prostate cancer through activation caspase pathway by targeting NF-κB // *Prostate*. – 2011. – 71. – P. 801–12.
22. Pomerantz J.L., Baltimore D. Two pathways of NF-κB // *Mol. Cell*. – 2002. – 10. – P. 693–701.
23. Pozo-Guisado E., Merino J.M., Mulero Navarro S. et al. Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase – independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-κB // *Int. J. Cancer* – 2005. – 115. – P. 74–84.
24. Ravasco P., Aranha M.M., Borralho P.M. et al. Colorectal cancer: can nutrients modulate NF-κB and apoptosis // *Clin. Nutr.* – 2010. – 29. – P. 42–6.
25. Sato A., Kudo C., Yamakoshi H. et al. Curcumin analog GO-Y030 is a novel inhibitor of IKKβ that suppresses NF-κB signaling and induces apoptosis // *Cancer Sci.* – 2011. – 102(5). – P. 1045–51.
26. Shaikh I.A., Brown A.I. Docosahexaenoic acid enhances the efficacy of docetaxel in prostate cancer cells by modulation apoptosis: the role of genes associated with the NF-κB path way // *Prostate*. – 2008. – 68. – P. 1635–46.
27. Shanmugam R., Kusumanchi P., Cheng L. et al. A water-soluble parthenolide analogue suppresses in vivo prostate cancer growth by targeting NF-κB and reactive oxygen species // *Prostate*. – 2010. – 70. – P. 1074–86.
28. Shanmugam R., Praveen K., Appai H. et al. A water soluble parthenolide analog suppresses in vivo tumor growth of two tobacco-associated cancer, lung and bladder cancer, by targeting NF-κB and generating reactive oxygen species // *Int. J. Cancer*. – 2011. – 128. – P. 2481–94.
29. Shien J.M., Cheng T.H., Shi M.D. α-Tomatine suppresses invasion and migration of human non-small lung cancer NCI-H460 cells through inactivation FAK/PI3K/Akt signaling pathway and reducing binding activity NF-κB // *Cell Biochem. and Biophys.* – 2011. – 60(3). – P. 297–310.
30. Sun Z.J., Chen G., Hu X. et al. Activation of PI3K /Akt/IKK-α NF-κB signaling pathway is required for apoptosis-evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma its inhibition by quercetin // *Apoptosis*. – 2010. – 15. – P. 850–63.
31. Takahashi N., van Kilsdonk J.W. Tumor marker nucleoporin 88 kDa regulates nucleocytoplasmic transport of NF-κB // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – 374. – P. 424–30.
32. Tang F.Y., Chiang E.P., Pai M.H. Consumption of allilcysteine inhibits the growth of human non-small-cell lung cancer in mouse xenograft model // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – 58(20). – P. 1156–64.
33. Wei X., Zhou D., Wang H. et al. Effects of pyridine analogs of curcumin on growth, apoptosis and NF-κB activity in prostate cancer PC-3 cells // *Anticancer Res.* – 2013. – 33(4). – P. 1343–50.
34. Wong T.S., Chan W.S., Li C.H. et al. Curcumin alters the migratory phenotype of nasopharyngeal carcinoma cells through up-regulation of E-cadherin // *Anticancer Res.* – 2010. – 30. – P. 2851–6.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БИЦ	– бензилизоцианат
DMAPT	– dimethylamino-parthenolide (диметиламинопартенолид)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616-006.446.8-036.11:577.21.088

В.А. Мисюрин^{1,3}, А.Е. Лукина², А.В. Мисюрин^{1,3}, Л.А. Кесаева^{1,3}, Е.Н. Мисюрин³, Ю.П. Финашутин^{1,3},
И.Н. Солдатова^{1,3}, А.А. Крутов^{1,3}, И.В. Санникова⁴, М.Н. Ротанова⁵, В.А. Лапин⁵, О.А. Рукавицын⁶,
С.В. Шаманский⁶, Н.К. Хуазева⁷, В.Л. Иванова⁷, Н.В. Архипова⁸, Ю.А. Лесная⁸, О.В. Шитова⁸,
Е.А. Борисенкова⁹, Т.М. Толстокорая⁹, Е.Н. Голубева⁹, Н.А. Бычкова⁹, Н.А. Вopilina¹⁰,
И.И. Гущанская¹¹, Г.Н. Михайлова¹¹, А.Ю. Барышников¹

ОСОБЕННОСТИ СООТНОШЕНИЯ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *PRAME* И *PML/RARα* В ДЕБЮТЕ ОСТРОГО ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва; ²ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ, Москва
³Медицинский центр «ГеноТехнология», Москва; ⁴БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница №1», Воронеж

⁵БУЗ «Ярославская областная клиническая больница», Ярославль

⁶ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н.Бурденко», Москва

⁷БУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина», Москва

⁸БУЗ «Городская клиническая больница №40», Москва

⁹БУЗ «Калужская областная клиническая больница №1», Калуга

¹⁰БУЗ «Тамбовская областная клиническая больница», Тамбов

¹¹БУЗ «Брянская областная клиническая больница №1», Брянск

Контактная информация

Мисюрин Всеволод Андреевич, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной химиотерапии НИИ ЭДнТО

адрес: 115478 Москва, Каширское ш., 24, тел. +7(985)436-3019

e-mail: vsevolod.misyurin@gmail.com

Статья поступила 15.01.2014, принята к печати 27.01.2014.

Резюме

Причиной развития ОПЛ является появление химерного онкогена *PML/RARα*, экспрессия которого наблюдается при данном заболевании во всех опухолевых клетках и используется в качестве молекулярного маркера для установления диагноза и определения минимальной остаточной болезни. Кроме того, при ОПЛ, так же, как и при многих других злокачественных новообразованиях, экспрессируется неспецифический онкомаркер *PRAME*, относящийся к группе канцер-тестис антигенов. В настоящей работе экспрессия гена *PRAME* нами исследовалась у больных ОПЛ в сопоставлении с уровнем экспрессии гена *PML/RARα*, а также с данными о клиническом течении этого заболевания. Выяснилось, что в дебюте ОПЛ обязательно наблюдается коэкспрессия генов *PRAME* и *PML/RARα*. По отношению уровня экспрессии гена *PRAME* к *PML/RARα* в дебюте заболевания пациентов с ОПЛ можно разделить на две группы – с высоким и низким отношением *PRAME* к *PML/RARα*. Больные ОПЛ, имевшие в дебюте низкое соотношение *PRAME* к *PML/RARα*, были склонны к более раннему развитию рецидива, чем лица с высоким соотношением уровней экспрессии данных генов.

Ключевые слова: острый промиелоцитарный лейкоз, *PRAME*, канцер-тестис гены, экспрессия генов.

V.A. Misyurin^{1,3}, A.E. Lukina², A.V. Misyurin^{1,3}, L.A. Kesaeva^{1,3}, E.N. Misyurina³, Yu.P. Finashutina^{1,3},
I.N. Soldatova^{1,3}, A.A. Krutov^{1,3}, I.V. Sannikova⁴, M.N. Rotanova⁵, V.A. Lapin⁵, O.A. Rukavitsyn⁶,
S.V. Shamanskiy⁶, N.K. Huazheva⁷, V.L. Ivanova⁷, N.V. Arhipova⁸, Y.A. Lesnaya⁸, O.V. Shitova⁸,
E.A. Borisenkova⁹, T.M. Tolstokoraya⁹, E.N. Golubeva⁹, N.A. Bychkova⁹, N.A. Vopilina¹⁰,
I.I. Guschanskaya¹¹, G.N. Mihavlova¹¹, A.Yu. Barvshnikov¹

A RATIO BETWEEN GENE EXPRESSION LEVELS OF *PRAME* AND *PML/RARα* AT THE ONSET OF ACUTE PROMYELOCYTIC LEUKEMIA AND CLINICAL FEATURES OF THE DISEASE

¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow; ²FSBI Hematological Research Center, Moscow

³«GeneTechnology» LLC, Moscow; ⁴Regional Clinical Hospital №1, Voronezh

⁵Yaroslavl Regional Hospital, Yaroslavl

⁶Academician N.N. Burdenko Main Military Clinical Hospital, Moscow

⁷S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow

⁸City Clinical Hospital № 40, Moscow

⁹Kaluga Regional Clinical Hospital №1, Kaluga

¹⁰Tambov Regional Hospital, Tambov

¹¹Bryansk regional hospital №1, Bryansk

Abstract

An appearance of a chimeric oncogene *PML/RARα* is a reason of an APL. This molecular marker is used for diagnosis and minimal residual disease monitoring in patients with APL. *PRAME* gene related to a group of cancer-testis genes is expressed in APL and a lot of other malignancies. We studied the ratio between expression levels of genes *PRAME* and *PML/RARα* and compared it with a clinical data of patients with APL. According to this dividing there

were two groups of APL patients: with a high and low ratio respectively. Furthermore patients with a low ratio had had a leukemia relapse earlier than patients with the high ratio values. We suggest that the ratio between their expression levels accurately determines a risk of relapse.

Key words: acute promyelocytic leukemia, *PRAME*, cancer-testis genes, gene expression.

Введение

ОПЛ был выделен в качестве отдельного варианта острого миелоидного лейкоза в 1957 г. шведским автором L.K. Hillestad, который описал три клинических случая чрезвычайно агрессивного течения острого миелоидного лейкоза, окончившихся фатально в течение нескольких недель. Заболевание характеризовалось склонностью к развитию геморрагического диатеза, жизнеугрожающих кровотечений, «казалось, это был наиболее злокачественный вариант острого лейкоза». Во всех случаях в миелограмме среди лейкоцитов доминировали промиелоциты [13].

Ключевым событием, позволившим прийти к пониманию механизмов лейкемогенеза, стало открытие транслокации t(15,17), встречающейся у подавляющего большинства заболевших ОПЛ. Данная перестройка приводит к формированию гена *PML/RARα*, образованного из генов *PML* (ген промиелоцитарного лейкоза) и *RARα* (ген рецептора ретиноевой кислоты, тип α) [20]. Описаны три варианта точек разрыва в гене *PML*: *bcr1*, *bcr2* и *bcr3*, определяющие длину транскрипта гена *PML/RARα*. Наличие любого из трёх вариантов перестройки достаточно для трансформации клеток-предшественников миелоидного ряда и начала заболевания, причём у каждого пациента может быть только один тип слияния генов *PML* и *RARα* [19].

Ретиноевая кислота участвует в разнообразных регуляторных каскадах в качестве сигнальной молекулы. В частности, с её помощью регулируются процессы морфогенеза, клеточной дифференцировки и самоподдержания стволовых клеток [14]. Белок *RARα* – ядерный рецептор ретиноевой кислоты, он является финальным звеном в её сигнальных путях. В здоровой клетке *RARα* выполняет функции транскрипционного репрессора.

С молекулой ДНК он связывается в точке, содержащий мотив AGGTCA. В отсутствие своего лиганда – ретиноевой кислоты, *RARα* связывает молекулы корепрессоров, подавляя активацию транскрипции. В случае присоединения к *RARα* ретиноевой кислоты корепрессор диссоциирует, и к комплексу присоединяется коактиватор, запускающий транскрипцию гена [11].

В результате транслокации 15 и 17 хромосом транскрибируется ген *PML/RARα*, кодирующий химерный белок *PML/RARα*. Данный белок, вне зависимости от точки разрыва, за счёт домена, образованного полипептидной цепью *RARα*, сохраняет способность связывать молекулу корепрессора и присоединяться к мотиву AGGTCA [9].

Таким образом, химерный белок сохраняет функцию подавления транскрипции генов, регулируемых нативным белком *RARα*.

Однако конформационные изменения, вызванные наличием в химерном белке фрагмента полипептидной цепи *PML*, приводят к потере специфичности связывания с ДНК, и спектр репрессируемых генов расширяется [9]. В результате этого белок *PML/RARα* в отличие от *RARα* теряет способность в присутствии ретиноевой кислоты разрывать связь с корепрессорами и присоединять молекулу коактиватора.

Таким образом, при ОПЛ зрелый *PML/RARα* ингибирует активность генов, отвечающих за дифференцировку и блокирование онкогенных транскрипционных факторов, что приводит нарушению дальнейшего созревания промиелоцитов, накоплению их в костном мозге, препятствует естественной гибели клеток путем апоптоза. Основой лечения больных ОПЛ является комбинация ATRA с химиопрепаратами (антрациклиновые – идарубицин, даунорубицин – с цитарабином или без него). Специфичность воздействия ATRA связана с тем, что последняя нарушает связь *PML/RARα* с корепрессорами и снимает блок клеточной дифференцировки [10]. ATRA входит в состав терапии на всех этапах лечения ОПЛ: в период индукции ремиссии, консолидации ремиссии и поддерживающего лечения. Препаратом выбора в лечении рецидивов ОПЛ является тиоксид мышьяка, способствующий деградации зрелого *PML/RARα* [8].

В отличие от хронического миелоидного лейкоза, демонстрирующего нарастающую резистентность к ингибиторами тирозинкиназы за счёт накопления мутаций [16; 17; 22–25], для ОПЛ характерна высокая геномная стабильность, что позволяет практически не менять тактику лечения в течение многих лет [26]. Однако состояние ремиссии остаётся временным, так как транс-ретиноевая кислота не способна повлиять на процессы самообновления лейкемических стволовых клеток [15].

Выявление опухолевого транскрипта *PML/RARα* методом ПЦР в клетках костного мозга/периферической крови больного является важнейшим критерием эффективности терапии у больных ОПЛ, а также чувствительным маркером факта развития рецидива [2; 3]. Молекулярный рецидив, как правило, диагностируется на несколько недель раньше, чем клинический рецидив [3].

К факторам риска развития рецидива ОПЛ относят: лейкоцитоз в дебюте заболевания и выявление экспрессии транскрипта гена *PML/RARα* после консолидирующей терапии [1]. Худший ответ на терапию ATRA при экспрессии в клетках пациента изоформы *bcr3* белка *PML/RARα* связывают с меньшей чувствительностью опухолевых клеток к ретиноидам [3; 7]. Учитывая, что в настоящий момент в мире применяется тактика комбинированного лечения ОПЛ (ATRA+химиопрепараты), очевидно, что механизмы резистентности к лечению при ОПЛ изучены недостаточно, возможно, необходим поиск дополнительных факторов, определяющих прогноз заболевания.

Ген *PRAME* из группы канцер-тестис генов ранее рассматривался в качестве дополнительного маркера для мониторинга МОБ при ОПЛ [21]. Спонтанная активация этого канцер-тестис гена, а возможно, и некоторых других, происходит в лейкемической клетке из-за нарушений, которые вносит белок *PML/RARα* в регуляцию экспрессии генов.

Известно, что экспрессия гена *PRAME* при солидных опухолях напрямую связана с неблагоприятным прогнозом и снижением выживаемости больных. В процессе опухолевой прогрессии его уровень нарастает [18; 19]. При остром миелоидном лейкозе высокий уровень мРНК *PRAME* указывает на хороший прогноз и длительный безрецидивный период [12]. Но на сегодняшний день понимание биологических причин данного феномена так и не достигнуто.

Согласно последним работам, при онкогематологических расстройствах экспрессируются гены *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1*, однако в литературе нет никаких данных об исследовании профиля экспрессии этих генов при ОПЛ.

В этом исследовании мы провели поиск экспрессии канцер-тестис генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME* в образцах костного мозга пациентов со впервые выявленным ОПЛ, не-МЗ ОМЛ, лимфомой Ходжкина и неходжкинскими лимфомами. Большая референсная группа была создана с целью сравнения ОПЛ с другими онкозаболеваниями по признаку наличия либо отсутствия экспрессии мРНК перечисленных выше генов. Помимо этого, мы определили наличие связи уровня экспрессии мРНК *PRAME* с клиническими проявлениями как у первичных пациентов с ОПЛ, так и у лиц, достигших ремиссии.

Материалы и методы

Исходным материалом исследования служили образцы костного мозга 90 взрослых пациентов с диагнозом ОПЛ. 30 пациентов наблюдалось нами с момента первичной постановки диагноза, оставшиеся 60 в момент начала работы уже находились в состоянии клинической ремиссии. Среди пациентов первой группы, наблюдавшихся нами с момента постановки диагноза, было 14 женщин и 16 мужчин в возрасте от 19 до 64 лет (медиана 28 лет). Во второй группе больных, проходящих под нашим наблюдением мониторинг патологии, было 33 женщины и 27 мужчин в возрасте от 20 до 72 (медиана 30) лет. Диагноз ОПЛ установлен в соответствии со стандартными критериями. Лечение всех пациентов проводилось согласно протоколу итальянских авторов AIDA [1; 4]. Для получения проб отрицательного контроля мы отобрали кровь у 15 здоровых доноров. Кроме этого, для формирования референсной группы мы исследовали пробы костного мозга в дебюте заболевания:

- 65 пациентов с диагнозом ОМЛ (не МЗ-вариант);
- 9 пациентов с диагнозом экстранодальная В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны;
- 22 пациентов с диагнозом ДВККЛ;
- 9 пациентов с диагнозом ЛБ;
- 18 пациентов с диагнозом ЛХ;
- 9 пациентов с диагнозом ЛКМЗ;
- 10 пациентов с диагнозом ПМВККЛ;
- 22 пациентов с диагнозом ФЛ;
- и 35 пациентов с диагнозом Т-клеточная лимфома.

Все участники исследования были заранее информированы и подписали бланки добровольного согласия.

Выделение матричной РНК и синтез комплиментарной ДНК

Тотальная РНК из образцов крови и костного мозга была выделена при помощи набора реактивов «RNA-экстракт-1» (ООО «ГеноТехнология», Россия). Этот же набор использовался для получения кДНК. Вся работа проводилась в полном согласии с инструкцией, предложенной разработчиком.

Определение уровня экспрессии генов.

Проведение реакции количественной ПЦР проходило с использованием наборов реактивов

«Онкоскрин-2-1Q», «Онкоскрин-2-2Q», «Онкоскрин-9Q» и «Онкоскрин-14Q» (ООО «ГеноТехнология», Россия) для определения уровней экспрессии генов *PML/RARα* изотипа *bcr1*, *PML/RARα* изотипа *bcr3*, *PRAME* и контрольного гена *ABL* соответственно. Для определения уровня экспрессии генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1* использовался 2-кратный буфер для ПЦР в реальном времени (ООО «ГеноТехнология», Россия).

Системы праймеров и зондов для оценки уровня экспрессии *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1* были разработаны на основании данных по геномным последовательностям, предоставленным on-line ресурсом <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Синтез специфических праймеров и зондов был заказан в компании «ДНК-технология», Россия.

Данные о последовательностях праймеров и зондов представлены в табл. 1.

Результаты

Экспрессия генов *PML/RARα*, *PRAME*, *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1*

В костном мозге у каждого из 30 пациентов, ещё не получивших специфического лечения ОПЛ, были обнаружены транскрипты химерного гена *PML/RARα* и мРНК гена *PRAME*.

Изотип *bcr1* химерного гена был обнаружен у 16 пациентов (53 % от общего числа пациентов), с медианным уровнем экспрессии относительно гена *ABL* 353 % (разброс значений был от 230 % до 985 %). У остальных 14 (46 %) первичных пациентов был выявлен тип перестройки гена *bcr3*, со средне-медианным уровнем экспрессии относительно контрольного гена 107 % (при разбросе значений от 12 до 482 %).

У всех пациентов, находящихся в дебюте заболевания, в клетках костного мозга была обнаружена мРНК *PRAME*. Среднемедианный уровень экспрессии *PRAME* для пациентов, имеющих перестройку в точке *bcr1*, составил 2,9 % (при наблюдаемых значениях от 0,001 до 200 %). Для пациентов с перестройкой *bcr3* медиана уровня экспрессии гена *PRAME* составила 48,4 % (разброс значений от 0,5 до 460 %).

Ни одна проба клеток костного мозга, полученная от пациентов в дебюте заболевания, не содержала мРНК генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1*.

В образцах костного мозга у 23% пациентов (15/64) из референсной группы была обнаружена экспрессия гена *PRAME*.

Среднемедианное значение уровня экспрессии этого гена составило 3,26 % (при разбросе показаний от 0,2 до 141 %). Кроме того, в костном мозге некоторых пациентов с диагнозом ОМЛ (не МЗ-вариант) экспрессировались гены *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1*. С различной частотой и уровнем экспрессии эти гены проявляли спонтанную активность и при других заболеваниях.

В крови здоровых доноров не было обнаружено присутствия мРНК гена *PML/RARα* (изоформы *bcr1*, *bcr2* и *bcr3*), и не было выявлено никаких признаков экспрессии генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *SCPI*, *SEMG1*, *SPANXA1*, *SSX1* и *PRAME*.

Данные об экспрессии всех генов представлены в табл. 2.

Таблица 1

Системы праймеров и зондов, разработанных для определения уровня экспрессии генов *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD*, *SCP1*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1*.

Ген	Праймер/зонд	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'
GAGE1	«Прямой» праймер	AGC TGC TCA GGA GGG AGA GGA T
	«Обратный» праймер	GGT GAC CCT GTT CCT GGC TA
	Зонд	R6G-CAT CTG CAG GTC AAG GGC CGA AGC CTG AA-BHQ1
NY-ESO1	«Прямой» праймер	TCT GAA GGA GTT CAC TGT GT
	«Обратный» праймер	AGA CAG GAG CTG ATG GAG AG
	Зонд	R6G-AAC ATA CTG ACT ATC CGA CTG ACT GCT GCA-BHQ1
MAGEA1	«Прямой» праймер	GAA GGA ACC TGA CCC AGG CT
	«Обратный» праймер	AAT CCT GTC CTC TGG GTT GG
	Зонд	R6G-TGT GAG GAG GCA AGG TTT TCA GGG GAC-BHQ1
PASD	«Прямой» праймер	GTG GGA AAT GTT TGC ATT CT
	«Обратный» праймер	AGC TTC ATC ACT GAC TGC CT
	Зонд	R6G-TCA GCT CCT GCA GCA ACT TTA CAC TTC-BHQ1
SCP1	«Прямой» праймер	AAA AGG AAC AGA ACA AGA AC
	«Обратный» праймер	TGT GGT AAT GGC AGT TAA CT
	Зонд	R6G-CCA AGC CAG AGA GAA AGA AGT ACA TGA TTT-BHQ1
SEMG1	«Прямой» праймер	TCC TCA TCT TGG AGA AGC AA
	«Обратный» праймер	TGG GAA AAT TCA CTT GGT AA
	Зонд	R6G-ATG GGA CAA AAA GGT GGA TCA AAA GGC C-BHQ1
SPANXA1	«Прямой» праймер	GAG GAG CGT CCC CTG TGA TT
	«Обратный» праймер	AGC AGG TTG CGG GTC TGA GT
	Зонд	R6G-AGG CCA ACG AGA TGA TGC CGG AGA CCC CAA-BHQ1
SSX1	«Прямой» праймер	GTA TAT GAA GAG AAA CTA TAA GG
	«Обратный» праймер	TAT TAC ACA TGA AAG GTG GG
	Зонд	R6G-ATG ACT AAA CTA GGT TTC AAA GTC ACC-BHQ1

Коэкспрессия генов *PRAME* и *PML/RARα* и риск развития рецидива

Начиная с момента установки диагноза, в течение 18 месяцев проводилось наблюдение за пациентами. Установлено, что пациенты, имевшие хромосомную перестройку в точке *bcr1*, достигали морфологической и молекулярной ремиссии в среднем на 35 день от начала терапии по протоколу AIDA. При экспрессии изоформы *bcr3* химерного гена констатация костномозговой и молекулярной ремиссии происходила в среднем через 40 дней с момента начала терапии. Для каждого пациента было рассчитано соотношение уровня экспрессии генов *PRAME* и *PML/RARα*. В качестве граничного значения мы выбрали уровень соотношения равным 0,05, и разделили всех пациентов на четыре подгруппы (рис. 1).

Мы сопоставили соотношение уровня экспрессии *PRAME* к *PML/RARα* со временем развития клинического рецидива заболевания (рис. 2). Наибольшая частота развития рецидивов наблюдалась у пациентов, экспрессирующих изотип *bcr3* гена *PML/RARα* и значением соотношения уровня экспрессии гена *PRAME* к гену *PML/RARα* находящимся ниже 0,05. В этой группе из 6 человек у половины развился рецидив ($p=0,0231$). Что же касается пациентов, имеющих хромосомную перестройку в точке *bcr1*, то среди них наблюдался всего один случай рецидива. У этого пациента из группы *PML/RARα* *bcr1*⁺ отношение уровня экспрессии гена *PRAME* к химерному гену было ниже 0,05.

Тестирование уровня экспрессии *PRAME* и транскриптов *PML/RARα*

для проведения мониторинга МОБ при ОПЛ

Кроме данных 30 пациентов, рассмотренных выше, в наше исследование были включены образцы костного мозга 60 больных с диагнозом ОПЛ, проходящих мониторинг МОБ. Время наблюдения пациентов из этой группы составило в среднем 9 мес, в течение которых у четверых развили клинический рецидив. Изотип *bcr3* гена *PML/RARα* экс-

прессировался у пяти пациентов. У оставшихся трёх химерный ген сформировался в точке *bcr1*.

С момента обнаружения молекулярного рецидива до момента выявления костно-мозгового рецидива проходило в среднем 3 мес. При выявлении экспрессии транскрипта *PML/RARα* констатировался молекулярный рецидив ($n=8$). Ни в одном из этих образцов мы не наблюдали экспрессии гена *PRAME*. Его мРНК появлялась в пробе костного мозга только в тот момент, когда рецидив проявлялся уже клинически. Не было зафиксировано экспрессии *PRAME* в *PML/RARα* – отрицательных пробах.

Динамика коэкспрессии гена *PRAME* и транскриптов *PML/RARα*

Исследования образцов, полученных при мониторинге ОПЛ, показали, что изменение соотношение количества матричной РНК гена *PRAME* и химерного *PML/RARα* различаются между началом заболевания и рецидивом. Все четыре пациента, имевшие рецидивы за время нашего наблюдения, в дебюте заболевания имели показатель отношения уровней экспрессии двух генов ниже 0,05. В момент обнаружения костно-мозгового рецидива это соотношение менялось, и у всех четверых превысило 0,05. Наблюдаемое изменение этого соотношения было вызвано повышением относительного уровня экспрессии *PRAME*. Это указывает на приобретение лейкоэмической клеткой в стадии рецидива новых качеств по сравнению с теми, что обладал злокачественный клон в начале заболевания.

Обсуждение

Уже много лет подряд в литературе накапливаются сведения о том, что экспрессия гена *PRAME*, участвующего в процессе сперматогенеза, в случаях солидных опухолей говорит об агрессивном характере необластического процесса и о снижении выживаемости больных [6].

Таблица 2

Экспрессия генов при различных онкогематологических заболеваниях

Диагноз#	Материал	Гены															
		PML-RARα (bcr1)		PML-RARα (bcr3)		PRAME		GAGE1		NY-ESO-1		MAGEA1		PASD		SCP1	
		&	@	&	@	&	@	&	@	&	@	&	@	&	@	&	@
Группы заболеваний	ОПЛ	100	353	—	—	100	2,9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	транскрипт bcr1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	транскрипт bcr3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	не-М3 ОМЛ	—	—	—	—	23	3,3	12	0,9	11	1,23	1,5	5,8	6	0,16	11	0,34
	МАЛТ	—	—	—	—	11	141	—	—	—	—	—	—	—	—	11	0,17
	ДВККЛ	—	—	—	—	—	—	13,5	1,46	9	1,45	—	—	—	—	4	0,04
	ЛБ	—	—	—	—	22	0,34	—	—	—	—	—	—	—	—	22	43
	ЛХ	—	—	—	—	22	2	5	1,8	22	0,2	—	—	11	0,3	5	0,1
	ЛКМЗ	—	—	—	—	44	15	33	0,5	22	1,4	—	—	—	—	11	0,3
	ПМВКЛ	—	—	—	—	30	7	30	0,9	—	—	—	—	—	—	20	90
Доноры	ФЛ	—	—	—	—	19	0,2	—	—	13,5	0,9	—	—	9	0,1	4,5	0,1
	Т-кл.	—	—	—	—	20	10	11,5	1	6	0,1	—	—	11,5	0,4	23	0,3
	Периферическая кровь	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

#В случае ОПЛ указан тип экспрессируемого транскрипта PML-RARα. Знаком «—» обозначена группа здоровых доноров
 ВВ – Встречаемость внутри
 @Уровень экспрессии, медиана, %
 & ВВ группы, %

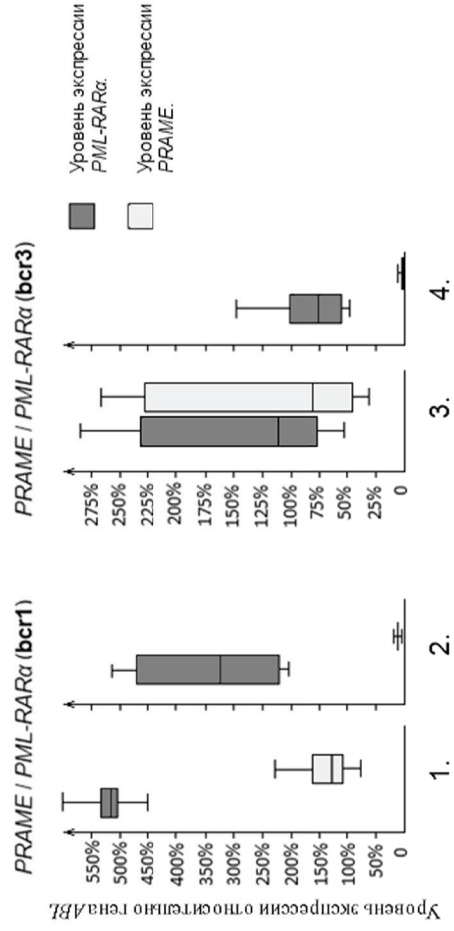


Рис. 1. Соотношение уровней экспрессии гена *PRAME* к изоформам гена *PML-RARα*:

- 1 – *PRAME* / *PML-RARα* (**bcr1**) > 0,05;
- 2 – *PRAME* / *PML-RARα* (**bcr1**) < 0,05;
- 3 – *PRAME* / *PML-RARα* (**bcr3**) > 0,05;
- 4 – *PRAME* / *PML-RARα* (**bcr3**) < 0,05.

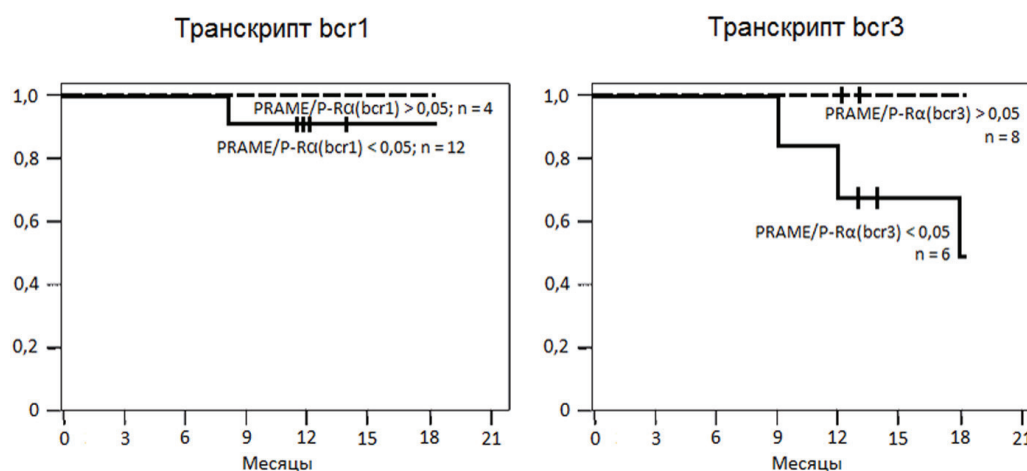


Рис. 2. Зависимость времени развития рецидива ОПЛ от соотношения уровней экспрессии генов *PRAME* и различных изоформ гена *PML-RARα* в дебюте заболевания.

Но при рассмотрении острых миелоидных лейкозов, и особенно, острого промиелоцитарного лейкоза, отметили, что активность этого гена, а именно – количественная характеристика его экспрессии, каким-то образом связана с более благоприятным исходом болезни [5].

В настоящее время информация о связи *PRAME* с регуляторными путями клетки неполна. По этой причине можно только приблизительно судить о вероятной причине положительного влияния этого маркера на прогноз заболевания при ОПЛ. Возможно, имеет место эффект участия белка *PRAME* в метаболизме ретиноевой кислоты: клетки, в которых происходит его синтез, очень чувствительны к воздействию ретиноидов [6].

Указано, что белок *PRAME* способен связываться с комплексом *RARα*. Мы предполагаем, что при связывании *PRAME* конкурирует с другими молекулами репрессоров транскрипции. И чем больше молекул белка *PRAME* внутри клетки, тем сильнее может быть выражен эффект конкуренции. В результате лейкемическая клетка становится более чувствительной к терапии ретиноидами.

В работе Santamaria et al. [21] для определения количественной характеристики уровня экспрессии гена *PRAME* использовался метод $\Delta\Delta^{CT}$, не отличающийся высокой точностью.

Используя специфические праймеры и зонды, мы не смогли обнаружить следы мРНК в клетках крови здоровых доноров, хотя Santamaria et al. сообщают, что им это удалось. Для создания надёжного положительного контроля мы использовали материалы большой референсной группы, и показали, что лишь у немногих больных, несмотря на онкогематологические расстройства, в кроветворной ткани происходит активация *PRAME*.

При гематологических, а также солидных опухолях не было показано облигатной (у всех пациентов) экспрессии *PRAME* опухолевыми клетками в дебюте или в рецидиве заболевания.

Даже в случае меланомы данный маркер наблюдается только у 88 % пациентов. Santamaria et al, изучая профиль экспрессии генов при ОПЛ, смогли показать, что *PRAME* проявляет активность в дебюте заболевания у многих, но всё же не у всех пациентов.

Нами впервые показано, что при ОПЛ активация экспрессии гена *PRAME* происходит с момента начала заболевания, что было характерно для всех рассмотренных нами случаев.

С другой стороны, нам не удалось подтвердить преимущество использования *PRAME* как маркера для мониторинга МОБ при ОПЛ. Вероятная причина более раннего выявления изоформ гена *PML/RARα* связана с тем, что химерный ген экспрессируется на более высоком уровне. В связи с этим он практически всегда преодолевал порог чувствительности метода существенно раньше, чем транскрипты гена *PRAME*. Использование этого нового маркера для мониторинга МОБ возможно, но только в качестве дополнительного. Santamaria et al. в своей работе указывали на то, что мРНК *PRAME* детектировалась за полгода до клинического развития рецидива. Однако они добавили, что в некоторых случаях результат оказывался ложноотрицательным, что показывает невысокую надёжность использования метода $\Delta\Delta^{CT}$.

В отличие от Santamaria et al., мы показали, как коэкспрессия генов *PML/RARα* и *PRAME* влияет на прогноз заболевания. Наш результат не противоречит классическим исследованиям, в которых было установлено, что изотип *bcr3* связан с худшим прогнозом при ОПЛ [3; 7]. Мы можем добавить, что в действительности худший прогноз определяется количественным отношением *PRAME* к *PML/RARα* изотипа *bcr3*. Таким образом, определение соотношения экспрессии *PRAME* к *PML/RARα* поможет более эффективно выявить группу риска больных ОПЛ.

У больных ОПЛ в дебюте заболевания не происходило экспрессии других канцер-тестис генов, а именно: *GAGE1*, *NY-ESO-1*, *MAGEA1*, *PASD*, *SCP1*, *SEMG1*, *SPANXA1* и *SSX1*. Но мРНК каждого из этих генов хотя бы несколько раз была обнаружена у пациентов референсной группы. Как сообщали ранее, трансформированные кроветворные клетки, имеющие перестройку *t(15;17)*, отличаются своей генетической стабильностью [21]. Согласно этому предположению мы считаем, что при ОПЛ в трансформированной клетке не происходит инактивации репрессоров транскрипции канцер-тестис генов. Наблюдение экспрессии гена *PRAME* в 100% случаях первичного ОПЛ говорит о том, что его активация практически неизбежна при появлении в клетке зрелого белка *PML/RARα* любой изоформы. Разницу в количественном соотношении кодируемых этими генами транскриптов мы объяснить не можем, но считаем, что регуляторный каскад, связавший эти два гена, достаточно специфичен и выполняет свои функции в здоровой клетке.

Заключение

PRAME не экспрессируется в здоровых тканях за исключением немногочисленных иммунопривилегированных областей. Параметры экспрессии этого представителя КТГ в дебюте ОПЛ имеют

прогностическое значение. Тотальная активность гена *PRAME* при остром промиелоцитарном лейкозе даёт надежду на то, что в будущем больные смогут достигать полного излечения за счёт комбинации химиотерапии и специфической иммунотерапии, направленной против *PRAME*⁺ клеток.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТРА (ATRA)	– полностью транс-ретиноевая кислота (all transretinoid acid)
МОБ	– минимальная остаточная болезнь
ОПЛ/APL	– острый промиелоцитарный лейкоз/acute promyelocytic leukemia
ПЦР (PCR)	– полимеразная цепная реакция (polymerase chain reaction)

Лимфомы

ЛБ	– лимфома Бёркитта
ДВККЛ	– диффузная В-крупноклеточная лимфома
ЛКМЗ	– лимфома из клеток мантийной зоны
ПМВККЛ	– первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома
ЛХ	– лимфома Ходжкина
ФЛ	– фолликулярная лимфома

Гены

PRAME – Preferentially Expressed Antigen of Melanoma in Cancer

Литература

1. Паровичникова Е.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н. и др. Лечение взрослых больных острым промиелоцитарным лейкозом по протоколу AIDA // Терапевтический архив. – 2013. – №7. – С. 10–7.
2. Шуравина Е.Н., Мисюрин А.В., Савченко В.Г. Молекулярный мониторинг PML/RARα у больных острым промиелоцитарным лейкозом // Проблемы гематологии и переливания крови. – 2003. – № 2. – С. 62.
3. Шуравина Е.Н., Паравичникова Е.Н., Демидова И.А. и др. Мониторинг минимальной остаточной болезни у больных острым промиелоцитарным лейкозом // Тер. Архив. – 2006. – 78(7). – 25–31.
4. Avvisati G., Lo Coco F., Diverio D. et al. AIDA (all-trans retinoic acid + idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: a Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) pilot study // Blood. – 1996. – 88(4). – P. 1390–8.
5. Bullinger L., Dohner K., Bair E. et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia // N. Engl. J. Med. – 2004. – 350. – P. 1605–16.
6. Bullinger L., Schlenk R.F., Götz M. et al. PRAME-induced inhibition of retinoic acid receptor signaling-mediated differentiation—a possible target for ATRA response in AML without t(15;17) // Clin Cancer Res. – 2013. – 19(9). – P. 2562–71.
7. Castro-Mujica Mdel C., Sullcahuamin-Allende Y. Molecular subtypes of PML/RARα in patients with acute promyelocytic leukemia // Rev. Peru. Med. Exp. Salud. Publica. – 2013. – 30(1). – P. 37–40.
8. Chen S.J., Zhou G.B., Zhang X.W. et al. From an old remedy to a magic bullet: molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of arsenic in fighting leukemia // Blood. – 2011. – 117(24). – P. 6425–37.
9. de The H., Lavau C., Marchio A. et al. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR // Cell. – 1991 – 66(4). – P. 675–84.
10. Degos L., Dombret H., Chomienne C. et al. All-trans retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia // Blood. – 1995. – 85(10). – P. 2643–53.

11. Farboud B., Hauksdottir H., Wu Y., Privalsky M.L. Isotype-restricted corepressor recruitment: a constitutively closed helix 12 conformation in retinoic acid receptors beta and gamma interferes with corepressor recruitment and prevents transcriptional repression // *Mol Cell Biol.* – 2003. – 23(8). – P. 2844–58.
12. Greiner J., Schmitt M., Li L. *et al.* Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: implications for specific immunotherapeutic approaches // *Blood.* – 2006. – 108. – P. 4109–17.
13. Hillestad L.K. Acute promyelocytic leukemia // *Acta. Med. Scand.* – 1957. – 159(3). – P. 189–94.
14. Kastner P., Lawrence H.J., Waltzinger C. *et al.* Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARalpha // *Blood.* – 2001. – 97(5). – P. 1314–20.
15. Kogan S.C. Curing APL: Differentiation or destruction? // *Cancer Cell.* – 2009. – 15(1). – P. 7–8.
16. Kremenetskaya O.S., Logacheva N.P., Baryshnikov A.Y. *et al.* Distinct effects of various p53 mutants on differentiation and viability of human K562 leukemia cells // *Oncology Research.* – 1997. – 9. – P. 155–66.
17. Michor F., Hughes T.P., Iwasa Y. *et al.* Dynamics of chronic myeloid leukaemia // *Nature.* – 2005. – 435(7046) – P. 1267–70.
18. Neumann E., Engelsberg A., Decker J. *et al.* Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and glycoprotein 75 in human renal cell carcinoma: candidates for T-cell-based immunotherapies? // *Cancer. Res.* – 1998. – 58(18). – P. 4090–5.
19. Oberthuer A., Hero B., Spitz R. *et al.* The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome // *Clin. Cancer. Res.* – 2004. – 10(13). – P. 4307–13.
20. Pandolfi P.P., Alcalay M., Fagioli M. *et al.* Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia // *EMBO J.* – 1992. – 11(4). – P. 1397–407.
21. Santamaria C., Chillón M.C., Garcia-Sanz R. *et al.* The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia // *Haematologica.* – 2008. – 93(12). – P. 1797–805.
22. Stavrovskaya A.A., Sedyakhina N.P., Stromskaya T. *et al.* Prognostic value of P-glycoprotein and correlation with CD34 antigen // *British J. Haematology.* – 1998. – 28(5–6). – C. 469–82.
23. Turkina A.G., Baryshnikov A.Y., Sedyakhina N.P. *et al.* Studies of P-glycoprotein in chronic myelogenous-leukaemia patients: Expression, activity and correlations with CD34 antigen // *British Journal of Haematology.* – 1996. – 92. – P. 88–96.
24. Turkina A.G., Zabolina T.N., Kusnetzov S.V. *et al.* Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML) // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 1999. – 457. – P. 477–88.
25. Turkina A.G., Logacheva N.P., Stromskaya T.P. *et al.* Studies of some mechanisms of drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML) / Book Editor(s): Kaspers, G.J.L.; Pieters, R.; Veerman, A.J.P. Conference: 3rd International Symposium on Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma Location: Amsterdam, Netherlands, mar 04-07, 1998. Drug resistance in leukemia and lymphoma III Book Series.
26. Welch T.J., Link D.C., Miller C.A. *et al.* The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia // *Cell.* – 2012. – 150(2). – P. 264–78.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 616-097.3:576.3.08:535.37

*Е.Н. Захарова, П.К. Иванов, Т.Н. Заботина, Н.В. Голубцова, И.В. Чинарева, А.С. Гриневич, Д.Ю. Блохин***ДВУХЦВЕТНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ
МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МКА СЕРИИ ICO,
КОНЬЮГИРОВАННЫХ С ЦИАНИНОВЫМ КРАСИТЕЛЕМ IMD-306***ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва***Контактная информация***Захарова Елена Николаевна, научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии НИИ ЭДнТО***адрес:** 115478, Москва, Каширское шоссе, 24; **тел:** +7(499)612-96-16**e-mail:** zakharovaen@yandex.ru

Статья поступила 05.02.2014, принята к печати 07.02.2014.

Резюме

В данной работе нами были получены конъюгаты МКА серии ICO к антигенам Т- и В-лимфоцитов человека (CD4, CD8 и CD20) с цианиновым красителем Imd-306. Определены оптимальные характеристики полученных флуоресцентных зондов, в том числе – ПМ и рабочая концентрация антител, как для одноцветного, так и для двухцветного окрашивания лимфоцитов. Для двухцветного анализа клеточных популяций рекомендованы следующие комбинации: CD3FITC в сочетании с CD8Imd-306 (ПМ 6:1, концентрация 10 мкг/мл), с CD4-Imd-306 (ПМ 9:1, концентрация 5-10 мкг/мл), с CD20-Imd-306 (ПМ 5:1, концентрация 10-20 мкг/мл).

Ключевые слова: моноклональные антитела, проточная цитометрия, флуоресцентные красители.*E.N. Zakharova, P.K. Ivanov, T.N. Zabolina, N.V. Golubtsova, I.V. Chinareva, A.S. Grinevich, D.Yu. Blokhin***THE TWO-COLOR ANALYSIS OF CELL POPULATIONS
BY FLOW CYTOMETRY METHOD WITH USE MAB ICO
SERIES CONJUGATED WITH IMD-306 DYE***FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow***Abstract**

In this work, we have obtained the conjugates of MAb ICO series to antigens of human lymphocytes (CD4, CD8 and CD20) with Imd-306 dye. The optimal characteristics of fluorescent probes, including dye/protein ration (D/P) and the working concentration of antibodies as for one-color and two-colour analyses of lymphocytes. For a two-colour analysis of cell populations recommended the combinations: CD3 FITC in combination with CD8Imd-306 (PM 6:1, the concentration 10 mcg/ml), with CD4-Imd-306 (PM 9:1, the concentration 5-10 mcg/ml), with CD20-Imd-306 (PM 5:1, the concentration 10-20 mcg/ml).

Key words: monoclonal antibody, flow cytometry, fluorescent dye, two-colour analyses.**Введение**

Проточная цитометрия – один из наиболее современных и информативных методов анализа клеточных субпопуляций, применяемых как в научно-исследовательской работе, так и в клинической практике.

Анализ субпопуляционного состава периферической крови и костного мозга, иммунофенотипа составляющих их клеток позволяет судить о клеточных механизмах возникновения и особенностях течения многих физиологических и патологических процессов, происходящих в организме. В последнем случае такой анализ является важным критерием для дифференциальной диагностики отдельных заболеваний, в первую очередь гемобластозов. Метод проточной цитометрии позволяет оценивать пролиферативную активность клеток, анализировать параметры клеточного цикла, количественные соотношения отдельных клеточных субпопуляций, состояние специфического или противоопухолевого иммунитета.

Оценка иммунного статуса организма пациента – одна из важнейших задач современной клинической иммунологии. Она включает в себя проведение комплексного исследования, включающего, чаще всего, иммунофенотипирование субпопуляций лейкоцитов, анализ их функциональной

активности и активности фагоцитоза, оценку гуморального иммунитета и системы комплемента, интерферонового статуса, а также учет ряда иных параметров, определяемого конкретной исследовательской задачей. В минимальную панель для анализа клеточного иммунитета входит определение общих Т-лимфоцитов (клетки, несущие поверхностные антигены CD3), Т-хелперов (антигены CD4), Т-цитотоксических лимфоцитов (CD8), В-лимфоцитов (антигены CD19, CD20 и CD22) и естественных киллеров (NK-клетки, антигены CD16, CD56 и CD57) [5].

По мере расширения технических и методических возможностей для выполнения подобных исследований, усложняются и аналитические задачи. Так, если еще недавно для количественного определения Т-цитотоксических лимфоцитов считалось достаточным использовать монохромный анализ клеточной популяции по единственному маркеру CD8, то сейчас, согласно современным представлениям, следует выполнять комплексное исследование популяции одновременно по четырем антигенам: CD8, CD4, CD3 и CD45 с использованием многоцветного (мультипараметрического) цитометрического анализа, который позволяет получать информацию о наличии и сочетании нескольких антигенов на поверхности отдельных клеток, проводить оценку популяционного и субпопуляци-

онного состава многокомпонентных клеточных систем. Для выполнения таких анализов применяются смеси нескольких флуоресцентных зондов – каждый из них обладает собственной антигенной специфичностью и индивидуальными спектральными характеристиками.

Ранее нами разработана оригинальная методика конъюгирования МКА серии ICO к антигенам дифференцировки лейкоцитов человека [1; 3; 4] с сукцинимидными эфирами цианиновых красителей серии Imd, синтезированных в ИМБ им. В.А.Энгельгардта РАН (Москва) [2].

Показано, что разработанная методика конъюгирования МКА с флуорофором не меняет иммунологической специфичности антител в составе иммунофлуоресцентных конъюгатов, а полученные конъюгаты могут применяться для выполнения прямой РИФ и последующего моноклонового анализа клеточных популяций методом проточной цитометрии [2].

Целью настоящей работы явилась оценка пригодности конъюгатов МКА серии ICO к антигенам Т- и В-лимфоцитов человека с активной флуоресцентной меткой Imd-306 (ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН) для двухцветного цитометрического анализа.

Материалы и методы

Биологический материал

В качестве исследуемого биологического материала использовали образцы венозной крови практически здоровых доноров. Кровь забирали из локтевой вены натошак, в качестве антикоагулянта добавляли ЭДТА.

Моноклональные антитела

В качестве специфичного лиганда в работе использовали МКА к поверхностным антигенам Т-лимфоцитов (клоны ICO-31 и ICO-86 к антигенам CD8 и CD4, соответственно), а так же В-лимфоцитов (клон ICO-180 к антигену CD20) человека производства ООО «НПЦ «МедБиоСпектр» (Россия).

Флуоресцентные красители

Цианиновый краситель Imd-306 (производство ИМБ им. Энгельгардта РАН) – аналог коммерческого препарата СуЗ. Характеристики флуорофора Imd-306: ММ 777,88 Да; максимум оптического поглощения его водного раствора – 548 нм; максимум эмиссии флуоресценции – 563 нм; содержание активного компонента в виде моносукцинимидного эфира – 80-85 %; содержание нереакционноспособной кислоты Imd-306-СООН – 15-20 %.

Для Imd-306, как и для СуЗ, оптимальным источником возбуждения флуоресценции является луч аргонового лазера с λ 488 нм [6], а эмиссия регистрируется проточным цитометром в канале FL2 (585 нм).

В работе использовали Imd-306 в виде моносукцинимидного эфира в лиофилизированной форме, готового для мечения молекул, содержащих первичные аминогруппы.

Препараты сравнения – иммунофлуоресцентные реагенты

В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие конъюгаты МКА CD8PE, CD4PE, CD20PE (BD Biosciences, США), флуоресценция которых возбуждается лучом аргонового

лазера с λ 488 нм, а эмиссия регистрируется проточным цитометром в канале FL2 (585 нм).

В качестве «второй» метки использовали коммерческие конъюгаты CD3FITC (BD Biosciences, США), флуоресценция которых также возбуждается лучом аргонового лазера 488 нм, а эмиссия регистрируется проточным цитометром в канале FL1 (525 нм).

Реактивы

Фосфатно-солевой буфер (ООО «ПанЭко», Россия) готовили по инструкции производителя, pH готового раствора составляет 7,4.

Азид натрия (Sigma, США): 10 %-ный водный раствор.

Лизирующий раствор FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США)

Сорбент Сефадекс – Sephadex™ G-25 Superfine – (Amersham Biosciences, Швеция).

Получение конъюгатов МКА с флуоресцентными красителями Получение и очистка МКА

МКА выделяли из асцитной жидкости мышей BALB/c с инокулированными внутрибрюшинно клетками гибридом клонов ICO-31, ICO-180 и ICO-86.

Для получения препаратов очищенных антител применяли комбинированную очистку с использованием каприловой кислоты и высаливания иммуноглобулиновой фракции сульфатом аммония, описанную ранее [2].

Концентрацию белка C_{IgG} рассчитывали по формуле:

$$C_{IgG} = \frac{OP_{280}}{1,4}$$

Получение конъюгатов МКА с цианиновым красителем Imd-306

Для получения конъюгатов МКА с цианиновыми красителями серии Imd (Imd-306 и Imd-506) ранее нами были подобраны оптимальные условия проведения реакции [2].

Для этого к раствору белка (1 мг/мл) в бикарбонатном буфере с pH 9,3 добавляли водный раствор моносукцинимидного эфира флуорофора Imd-306 в молярных соотношениях от 10:1 до 100:1

$$\left(\frac{dye}{protein} = \frac{D}{P} \right), \text{ смесь перемешивали и инкубиро-}$$

вали в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре.

По окончании инкубации реакционную смесь разделяли на колонке Sephadex G-25. Спектрофотометрический анализ фракции элюата, содержащей иммунофлуоресцентные конъюгаты, проводили при двух длинах волн, соответствующих максимумам оптической плотности белка ($\lambda=280$ нм) и красителя ($\lambda=548$ нм), и рассчитывали плотность метки – количество молекул флуорофора, связавшихся с одной молекулой иммуноглобулина (D/P), исходя из коэффициентов молярной экстинкции (ϵ) флуорофора и иммуноглобулина при этих λ ($\epsilon_{Imd-306}=128000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{IgG}=224000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), по формуле:

$$\frac{D}{P} = \frac{1,7 \times ОП_{548}}{[ОО_{280} - (0,08 \times ОП_{548})]}, \text{ где}$$

ОП₂₈₀ и ОП₅₄₈ – величина оптической плотности раствора конъюгата при 280 и 548 нм соответственно, коэффициент 1,7 – величина отношения коэффициентов молярной экстинкции белка и красителя, а поправочный коэффициент 0,08 отражает тот факт, что при 280 нм поглощение водного раствора флуорофора Imd-306 составляет около 8% от его поглощения при λ=548 нм.

По такой технологии, изменяя лишь молярное соотношение внесенного в раствор белка флуорофора, были получены конъюгаты CD4Imd-306 с плотностью метки (D/P или ПМ) от 4 до 11, CD8Imd-306 от 1 до 12 и CD20Imd-306 от 1 до 8, которые исследовались далее на предмет их специфической активности и пригодности для цитометрического анализа в прямой реакции иммунофлуоресценции.

Прямая РИФ

Прямая РИФ использовалась для оценки пригодности (специфической активности) конъюгатов МКА с флуорофором Imd-306 (флуоресцентных зондов) для анализа клеточных популяций лимфоцитов человека методом проточной цитометрии. Для постановки прямой РИФ к образцам периферической крови здоровых доноров (100 мкл) добавляли раствор одного из конъюгатов в дробно-понижающих количествах – диапазон конечных концентраций МКА от 100 до 0,1 мкг/мл («титрование» раствора зондов), инкубировали образцы в течение 20 мин при 18-25 °С в темноте. Эритроциты разрушали последующим осмотическим гемолизом в растворе FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США). Не связавшийся с лейкоцитами избыток зондов удаляли двукратной отмывкой клеточного осадка центрифугированием/ресуспендированием в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). Отмытые клетки ресуспендировали в 0,3 мл того же буфера с добавлением к нему раствора формальдегида до конечной концентрации последнего 0,4 %.

Проточная цитометрия клеточных суспензий

В работе использован проточный цитометр FACSCalibur (BD Biosciences, США) с программным пакетом CellQuest. Возбуждение флуоресценции происходило при прохождении клеткой фокального пятна аргонного (для FITC) и красного диодного (для Imd-306) лазеров (мощность 15 mW, λ=488 нм). Флуоресценцию учитывали в FL1-канале для FITC и в FL2-канале для PE и Imd-306. Для выделения гейта лимфоцитов, а также дискриминации иных субпопуляций учитывали показатели прямого малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. В каждом образце анализировали 5000 событий в гейте лимфоцитов.

Обработку файлов первичных цитометрических данных проводили с использованием программного пакета WinMDI 2.8, находящегося в свободном доступе в сети Интернет.

Результаты

Оптимальные аналитические характеристики конъюгатов МКА с цианиновым флуорофором Imd-306

Для получения корректных и воспроизводимых результатов количественного анализа клеточ-

ных популяций в прямой РИФ флуоресцентные зонды должны иметь оптимальные аналитические характеристики, в том числе плотность метки и рабочую концентрацию раствора зонда. При этом следует учитывать, что:

1. **Оптимальная плотность метки (ПМ)** должна обеспечивать достаточную интенсивность флуоресцентного сигнала, получаемого от каждой молекулы зонда, но не приводить к заметному снижению специфической активности зонда, связанной с химической модификацией молекулы иммуноглобулина. Известно, что интенсивность флуоресценции цианиновых флуорофоров не обладает линейной зависимостью от количества молекул красителя, связанных с одной молекулой лиганда. Так, оптимальная флуоресценция наблюдается при связывании 6-8 молекул красителей Cy3 и Cy3.5, 4-5 молекул флуорофора Cy5.5 и лишь 2-3 молекул Cy5 на одну молекулу иммуноглобулина [8]. В этой связи оптимальная ПМ МКА красителем Imd-306 должна определяться экспериментально.
2. **Оптимальная концентрация зондов** в прямой РИФ должна обеспечивать насыщение зондом всех молекул исследуемого антигена на поверхности клеток, но не приводить к заметному неспецифическому связыванию зонда с клеточной поверхностью.

Для определения рабочей концентрации полученных конъюгатов использовали методику титрования антител, предложенную Stewart C.C. [7]. Она основана на дробном понижении концентрации зондов в прямой РИФ до достижения их минимальной концентрации, при которой еще сохраняется максимальная интенсивность флуоресценции антигенпозитивных клеток.

Дальнейшее понижение концентрации зондов приводит к смещению антигенпозитивного пика на гистограмме влево и уменьшению соотношения «сигнал»/«шум» (S/N). Изучали долю (%) антиген-позитивных событий, выявляемых различными конъюгатами в одном и том же образце периферической крови, и отношение интенсивности флуоресценции антигенпозитивных клеток к «шуму» (S/N) аутофлуоресценции. Наибольшие значения отношения S/N были характерны для конъюгатов CD20Imd-306 с ПМ в диапазоне (4,5-8):1, для конъюгатов CD4Imd-306 с ПМ (8-11):1, для конъюгатов CD8Imd-306 с ПМ 6:1.

Для каждого полученного в настоящем исследовании конъюгата МКА определены оптимальные рабочие концентрации в исследованном диапазоне от 0,5 до 100 мкг/мл.

Экспериментально показано, что для моноклонального анализа клеток периферической крови могут использоваться флуоресцентные зонды: CD8Imd-306 с ПМ 6:1 и рабочей концентрацией 5-10 мкг/мл (рис. 1; см. вклейку); CD20Imd-306 с ПМ 5:1 и рабочей концентрацией 10-20 мкг/мл (рис. 2); CD4Imd-306 с ПМ 9:1 и рабочей концентрацией 5-10 мкг/мл (рис. 3). При этом процентная доля антигенпозитивных клеток, выявляемая в образцах крови доноров полученными нами зондами в указанной рабочей концентрации, соответствует доле клеток, выявляемой коммерческими реагентами производства BD Biosciences, использованными в качестве препаратов сравнения (данные не представлены).

Определение оптимальной рабочей концентрации полученных флуоресцентных зондов для применения их в двухцветном анализе

В отличие от монохромной РИФ, при постановке реакции для многоцветного анализа в реакционной смеси с клетками крови одновременно присутствуют два и более флуоресцентных зондов, в связи с чем должно учитываться их возможное взаимное влияние на конечные результаты анализа. Так, выявляемые разными зондами антигенные эпитопы могут располагаться на клеточной поверхности в непосредственной близости друг к другу таким образом, что связывание одного зонда со «своим» антигеном создает стерическое препятствие для связывания с клеткой другого зонда, в результате чего полученный результат анализа окажется не адекватным сумме отдельных монохромных реакций. Для оценки возможности применения различных зондов в одной двухцветной РИФ используется простой методический прием: в три различные пробирки вносятся аликвоты одного образца исследуемой крови, в первую пробирку добавляется раствор первого зонда (в оптимальной конечной концентрации), во вторую пробирку – раствор второго зонда, а в третью – смесь обоих зондов в той же конечной концентрации каждого. После выполнения прямой РИФ все три образца анализируются на проточном цитометре. По результатам анализа строятся гистограммы распределения зарегистрированных событий по первому каналу флуоресценции (FL1) для содержимого пробирок №№ 1 и 3 и по второму каналу (FL2) – для пробирок №№ 2 и 3. Гистограммы, построенные по результатам монохромного анализа (пробирки №№ 1 и 2) должны с точностью совпадать с соответствующими гистограммами двухцветного анализа (пробирка № 3). Если на гистограммах по результатам анализа содержимого пробирки № 3 положение пика специфической флуоресценции смещается влево относительно того же пика для пробирок №№ 1 и/или 2, в реакционной смеси для двухцветной РИФ следует увеличить конечную концентрацию соответствующего зонда для достижения требуемого соответствия. Если это не приводит к положительному результату – данная пара зондов не может использоваться для двухцветного окрашивания в одной реакции.

В настоящей работе в качестве зонда, выявляющего антигены по каналу флуоресценции FL1, использовали коммерческий продукт CD3FITC (BD Biosciences, США), а в качестве зонда по каналу FL2 – каждый из полученных нами конъюгатов МКА серии ICO с красителем Imd-306. Построение и анализ гистограмм по результатам цитометрического анализа проводили с использованием программного пакета WinMDI 2.8.

CD8Imd-306 в комбинации с CD3FITC

На рис. 4 представлена двумерная дот-плот диаграмма распределения лимфоцитов крови при их двухцветном анализе с использованием зондов CD3FITC (FL1) и CD8Imd-306 (FL2) с ПМ 6:1 и концентрацией последнего 10 мкг/мл. На диаграмме четко выделяется субпопуляция цитотоксических Т-клеток с фенотипом $CD3^+CD8^+$ (24,7%) и прочих Т-лимфоцитов $CD3^+CD8^-$ (48,7%); суммарное содержание Т-лимфоцитов в популяции, таким образом, составляет 73,4%. Контрольные значения, полученные для того же образца крови донора АА с применением коммерческих препаратов сравнения,

составили: CD3 – 72,8%; CD4 – 50,5%; CD8 – 26,9%, что соответствует результату анализа с использованием нового зонда.

На рис. 5 представлены «наложенные» гистограммы по каналу FL2 для монохромного (серое заполнение) и двухцветного (черный контур) анализа, следовательно, конъюгат CD8Imd-306 с ПМ 6:1 и конечной концентрацией зонда 10 мкг/мл может использоваться как в монохромном анализе, так и в двухцветной реакции с CD3FITC (BD Biosciences).

Однако при снижении концентрации того же конъюгата до 5 мкг/мл (рис. 6), доля дважды позитивных ($CD3^+CD8^+$) клеток составляет в двухцветной реакции лишь 23,3% популяции, тогда как в монохромной реакции определяется 26,2% положительных событий, а «наложение» гистограмм по каналу FL2 выявляет их не полную идентичность (рис. 7). Следовательно, концентрация данного зонда в 5 мкг/мл является недостаточной для двухцветного анализа, но может применяться для монохромного.

CD4Imd-306 в комбинации с CD3FITC

Аналогично описанному тестировали в монохромной и двухцветной реакциях флуоресцентный зонд CD4Imd-306. Контрольные значения, полученные для образца крови донора ВВ с применением препаратов сравнения, составили: суммарно $CD3^+$ – 71,7%; $CD3^+CD4^+$ – 49,8%; $CD3^+CD8^+$ – 21,9%. Двухцветный анализ Т-лимфоцитов донора с применением комбинации CD3FITC/CD4Imd-306 с ПМ 9:1 и конечной концентрацией 10 мкг/мл представлен на рис. 8. Получены результаты: $CD3^+CD4^+$ – 50,6%; $CD3^+$ – 71,9%. Практически идентичные результаты получены при снижении вдвое (до 5 мкг/мл) конечной концентрации этого зонда: $CD3^+CD4^+$ – 50,6 %; $CD3^+$ – 72,9 % (рис. 9). Таким образом, для конъюгата CD4Imd-306 с ПМ 9:1 обе концентрации (5 и 10 мкг/мл) являются рабочими, так как гистограммы по каналу FL2, полученные при монохромном и двухцветном анализе полностью совпадают (рис. 10 для концентрации 10 мкг/мл и рис. 11 для концентрации 5 мкг/мл).

Комбинация конъюгата CD20Imd-306 с CD3FITC

«Двухцветка» CD3FITC/CD20Imd-306 позволяет в одной реакции определить суммарное количество всех Т-клеток ($CD3^+CD20^-$) и всех В-клеток ($CD3^-CD20^+$) в образце.

Двухцветный анализ образца крови донора СС с применением препаратов сравнения показал следующие значения: $CD3^+CD20^-$ – 70,2% ; $CD3^-CD20^+$ – 9,5%. На рис. 12 и рис. 13 представлены результаты двухцветного (CD3FITC/CD20Imd-306, ПМ 5:1) окрашивания клеток периферической крови донора СС (рис. 12 – концентрация зонда 20 мкг/мл; рис. 13 – концентрация 10 мкг/мл). Очевидно, что результаты, представленные на обоих рисунках, совпадают с контрольными значениями.

Гистограммы, полученные при одно- и двухцветном анализе, полностью идентичны (рис. 14 – 20 мкг/мл; рис. 15 – 10 мкг/мл), следовательно, для конъюгата CD20Imd-306 с ПМ 5:1 концентрации 20 и 10 мкг/мл являются рабочими.

Заключение

Нами получены конъюгаты МКА серии ICO к антигенам Т- и В-лимфоцитов человека (CD4,

CD8 и CD20) с цианиновым красителем Imd-306, которые могут применяться для анализа клеточных популяций методом проточной цитометрии как в режиме монохромного мечения клеток, так и для двухцветной реакции поверхностной иммунофлуоресценции. Оптимальными аналитическими характеристиками данных зондов (плотность мечения и конечная рабочая концентрация) являются: для CD8Imd-306 ПМ= 6:1, концентрация 5–10 мкг/мл; для CD20Imd-306 ПМ= 5:1, концентрация 10–20

мкг/мл; для CD4Imd-306 ПМ= 9:1, концентрация 5–10 мкг/мл. Эти зонды в указанных концентрациях могут применяться для монохромного мечения лимфоцитов, а также использоваться в комбинации с иммунофлуоресцентным реагентом CD3FITC (BD Biosciences) для выполнения двухцветного окрашивания клеток, за исключением зонда CD8Imd-306, ПМ= 6:1, минимальная конечная концентрация которого в двухцветной реакции составляет 10 мкг/мл.

Литература

1. Барышников А.Ю., Тоневцкий А.Г. Моноклональные антитела в лаборатории и клинике. – М.: Медицина, 1997. – 212 с.
2. Захарова Е.Н., Иванов П.К., Заботина Т.Н. и др. Иммунофлуоресцентные зонды на основе моноклональных антител ICO-31 и цианинового красителя Imd-506 для анализа клеточных популяций методом проточной цитометрии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 27–32.
3. Иванов П.К. Моноклональные антитела в онкологии: Автореф. дис... д-ра наук. – М., 2001.
4. Кадагидзе З.Г., Заботина Т.Н., Короткова О.В. Современные возможности использования иммунологических показателей при иммунотерапии онкологических больных // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина. – 1996. – № 1. – С. 50–5.
5. Хайдуков С.В. Многоцветный анализ в проточной цитометрии для медико-биологических исследований. – Дисс. ... д.б.н. – Санкт-Петербург. – 2008.
6. Ernst L.A., Gupta R.K., Mujumdar R.B., Waggoner A.S. Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups // Cytometry. – 1989. – 10(1). – P. 3–10.
7. Stewart C.C., Stewart S.J. Titering Antibodies. – Current Protocols in Cytometry, (J.P. Robinson, Z. Darzynkiewicz, P. Dean. L. Dressler, P. Rabinovitch, C. Stewart, H. Tanke, L. Wheelless, eds.) J. Wiley & Sons, Inc., New York, 4.1.1 – 4.1.13, 1997.
8. Gruber H. J., Hahn C.D., Kada G., Riener C.K. et. al. Anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to avidin // Bioconj. Chem. – 2002. – 11. – P. 696–704.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ПМ
РИФ
МКА
ЭДТА

– плотность мечения
– реакция иммунофлуоресценции
– моноклональные антитела
– этилендиаминтетрауксусная кислота

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ СТАТЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

Работа может быть статьей экспериментального или клинического характера, теоретической или концептуальной, обзором по материалам литературы, рецензией, сообщением дискуссионного, исторического или хроникального характера, рефератом зарубежных работ.

Статьи экспериментального или клинического характера имеют разделы: Резюме; Введение; **Материалы и методы**; **Результаты и обсуждение**; **Выводы (Заключение)**; **Литература**.

Обзоры литературы, статьи теоретического и концептуального характера имеют разделы: **Резюме**; **Введение**; **Разделы по отдельным обсуждаемым вопросам**; **Выводы**; **Литература**.

Статья должна быть представлена в виде файла формата RTF на дискете или CD и распечатана в 2 экземплярах. На внешней стороне дискеты или коробке CD должны быть указаны фамилия первого автора, названия статьи и файлов.

В основном файле должен содержаться текст статьи, таблицы, подписи и надписи к рисункам, список литературы. Кроме того, на дискете или CD должны быть записаны рисунки (каждый в виде отдельного файла).

Штриховые и тоновые рисунки (фотографии, рентгенограммы и т.д.), то есть растровая графика, должны быть сохранены в виде файлов формата TIF или JPEG, графики и диаграммы (векторная графика) – в виде файлов формата EPS. Если автор не работает с современными программными пакетами для создания векторной графики, можно прислать график в виде файла Microsoft Excel 5.0/95 с обязательным приложением в виде таблицы, по которой данный график построен.

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

Весь текст должен быть набран шрифтом Times New Roman 12 через полуторный интервал. Текст должен быть выровнен по левому краю.

Все страницы должны быть пронумерованы. Номер страницы должен быть расположен внизу справа, начиная со второй. Каждый абзац должен начинаться с красной строки, которая устанавливается меню «Абзац».

Не следует использовать для красной строки клавишу Tab. Десятичные дроби следует писать через запятую. При наборе текста следует различать дефис и тире. Последнее вводится одновременным нажатием клавиш Ctrl+Alt+дефис с дополнительной клавиатуры при горящем указателе Num Lock.

Набирая заголовки, названия разделов, таблиц, подписи и надписи на рисунках, точку в конце ставить не нужно. Выравнивать по центру и устанавливать красную строку для всего перечисленного также не нужно.

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

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

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

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

УДК 618.19-006.6-08:616.15-097.1

И.Ю. Филюшкина¹, Н.В. Голубцова¹, В.В.Новиков², М.А. Барышникова¹, З.А. Соколова¹,
А.И. Чкалина², Е.В. Борисова², П.К. Иванов¹, И.К. Воротников¹, А.Ю. Барышников¹

ИЗМЕНЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИМЫХ ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АНТИГЕНОВ У БОЛЬНЫХ РМЖ

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

²ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

Контактная информация:

Филюшкина Инна Юрьевна, академический аспирант хирургического отделения №5 НИИ клинической онкологии

адрес: 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; тел: +7(499)324-28-30

e-mail: masikmoj23@mail.ru

Статья поступила 03.02.2014, принята к печати 07.02.2014.

Резюме

Исследовано относительное содержание сывороточных уровней растворимых лейкоцитарных антигенов у пациентов со II стадией рака молочной железы до хирургического удаления опухоли. В качестве контроля использовались образцы сывороток крови 63 здоровых женщин.

Пациентки (n=64) делились на две группы. Группу №1 составили первичные нелеченные больные (n=58), группа №2 (n=6) включала пациенток после неoadъювантной терапии. Выявлены различия в содержании растворимых форм антигенов в образцах сывороток крови в обеих группах больных. Сывороточный уровень растворимой формы молекул HLA I класса в группе №1 был сопоставим со значениями данного показателя в контрольной группе доноров, а в образцах сывороток крови больных группы №2 относительное содержание сывороточного уровня растворимого HLA I класса оказалось в 3 раза выше, чем таковой в группе доноров (p<0,05). Сывороточный уровень растворимого комплекса CD8-HLA I в группе №1 также был сопоставим с показателями в группе здоровых доноров, и был повышен в 1,5 раза относительно контроля (доноры) у больных группы №2 (p<0,05). Выявлены пониженные показатели содержания сывороточного уровня растворимого антигена CD54 в 1,1 раза в группе №1 и повышенные значения уровня CD54 в 1,6 раза в образцах сывороток крови группы №2 (p<0,05). Установлено, что сывороточный уровень растворимого CD18 в группе №1 сопоставим со значениями в группе доноров, а в образцах сывороток крови больных группы №2 относительное содержание сывороточного уровня растворимого HLA I класса было в 1,7 раза выше контроля – доноры (p<0,05). Сывороточный уровень растворимого комплекса CD18- CD54 в группе №1 был в 1,5 раза ниже, а в группе №2 был выше в 5 раз, чем в контрольной группе доноров (p<0,05). Таким образом, проведенные исследования выявили изменения сывороточных уровней растворимых лейкоцитарных антигенов в группах леченных и нелеченных больных РМЖ, повышенные показатели выявлены у пациенток, получавших неoadъювантную терапию перед хирургическим удалением опухоли.

Ключевые слова: растворимые лейкоцитарные антигены, иммунная система, неoadъювантная терапия, рак молочной железы.

I.Y Filyushkina¹, N.V. Golubzova¹, V.V. Novikov², M.A. Baryshnikova¹, Z.A. Sokolova¹,
A.I. Chkalina², E.V. Borisova², P.K. Ivanov¹, I.K. Vorotnikov¹, A.Yu. Baryshnikov¹

VARIATION FEATURES OF SOLUBLE LEUKOCYTE ANTIGENS IN PATIENTS WITH BC

¹FSBI «N.N. Blokin RCRC» RAMS, Moscow

²N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University

Abstract

In this study we have estimated the serum levels of soluble leukocyte antigens in patients with stage II breast cancer before surgical removal of the tumor. As control samples 63 sera from healthy women. Patients (n = 64) were divided into two groups. Group №1 comprised primary untreated patients (n = 58), group №2 (n = 6) consisted of patients after neoadjuvant therapy. The differences in the content of soluble forms of the antigens in the sera of patients in both groups. Serum levels of soluble form of HLA I molecules class group №1 was comparable with the values of this indicator in the control group of donors, and in sera of patients group № 2 relative content of serum levels of soluble HLA I class was 3 times higher than in the group of donors (p <0,05). The serum level of soluble complex CD8 – HLA I in group 1 number was also comparable with those in the group of healthy donors was increased by 1.5-fold relative to a control (the donor) patients group number 2 (p <0,05). Figures revealed decreased levels of serum soluble CD54 antigen 1.1 times the number in the group 1 and values of the level of CD54 increased by 1.6 times in the sera group number 2 (p <0,05). Found that serum levels of soluble CD18 in the group number 1 is comparable with the values in the group of donors, and in sera of patients group number 2 relative content of serum levels of soluble HLA I class was 1.7 times higher than the control - donors (p < 0, 05). Serum levels of soluble CD18-CD54 in a group number 1 was 1.5 times lower, and in the group number 2 was 5 times higher than in the control group donors (p <0,05). Thus, studies have revealed changes in serum levels of soluble leukocyte antigens in groups treated and untreated patients with breast cancer, increased rates were observed in patients treated with neoadjuvant therapy prior to surgical removal of the tumor.

Key words: soluble leukocyte antigens, the immune system, neoadjuvant therapy, breast cancer.

Введение

Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы, образующиеся за счет их шеддинга с поверхности клеток или альтернативно-го сплайсинга матричной РНК играют важную роль в регуляции противоопухолевого иммунного ответа. Известно, что они могут выполнять функции ограничителей иммунных реакций или же выступать в роли активаторов иммунологических процессов [13–18]. В норме растворимые формы мембранных антигенов находятся в равновесном состоянии. Изменения их концентрации в крови и других биологических жидкостях организма обнаружено при различных нарушениях гомеостаза, отражая активность патологических процессов, протекающих в организме [13; 17]. Сохранение растворимыми сывороточными антигенами способности связывать растворимые гомологи мембранных партнеров подразумевает возможность существования в биологических жидкостях белковых комплексов (ассоциатов), таких как CD8-HLA I, CD18-CD54 и CD18-CD50 соответственно [5–8; 19]. Растворимую форму сывороточного HLA I секретируют *in vivo* как Т– так и В–лимфоциты. Увеличение концентрации растворимого HLA I происходит в случаях, когда активированы популяции Т-лимфоцитов. Изменения концентрации растворимых молекул HLA I класса и растворимого Fas-лиганда обнаружены в крови больных острым миелобластным лейкозом, раком молочной железы [1; 7–9; 22; 24; 25]. Получены данные об изменении уровня растворимой формы HLA I, CD8–антигена, комплекса HLA-I-CD8 при хроническом миелолейкозе, при развитии рака легкого [1; 11; 21]. Обнаружены изменения сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса и растворимого антигена CD8 и показано их прогностическое значение у больных диссеминированной меланомой в ходе вакцинотерапии аутологичными дендритными клетками [8; 9; 20]. Обнаружено появление противоопухолевых антител в крови вакцинированных больных, страдающих меланомой [10], выявлено изменение экспрессии и показано прогностическое значение растворимого CD44–антигена у больных метастатической меланомой в ходе проводимой терапии [4]. Обнаружены изменения сывороточного содержания растворимой формы антигена CD38 при различных иммунологических нарушениях [22]. Выявлены изменения растворимой формы CD18–антигена в крови больных вирусными гепатитами, пациентов с термическими ожогами [19; 23].

Показаны различия сывороточного содержания растворимых форм дифференцировочных антигенов при диагностике миомы матки и рака эндометрия [12]. Важную роль в процессах адгезии играет молекула CD54 (ICAM-1). Растворимая форма CD54 может быть образована двумя способами: путем шеддинга с поверхности клеток или альтернативного сплайсинга матричной РНК, кодирующей ICAM-1. Наиболее высокие значения сывороточного уровня растворимого CD54 выявлены при метастазировании злокачественных опухолей, поэтому сывороточное содержание растворимого CD54–антигена используется в качестве мониторингового показателя при развитии онкологических заболеваний [13–18].

Целью настоящего исследования явилось определение сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса, растворимого антигена CD18, CD54 и растворимых комплексов CD8- HLA-I и CD18-CD54 у больных раком молочной железы.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы сывороток периферической крови 64 больных РМЖ II стадии до хирургического удаления опухоли.

Больные были разделены на 2 группы.

Группу №1 (n=58) состояла из нелеченных пациенток, а группу №2 (n=6) составили пациентки, которые перед операцией получали неоадьювантную терапию. В качестве контроля использовались образцы сывороток крови 63 здоровых женщин.

Определение сывороточных уровней растворимых антигенов проводилось иммуноферментным методом, разработанным в Нижегородском государственном университете им. Н.И.Лобачевского (Новиков В.В. и др., 2008) с использованием МКА серии ИКО [2; 3] против соответствующих антигенов, меченных пероксидазой хрена, и поликлональных антител против моноклеарных клеток периферической крови человека.

Учет результатов проводился спектрофотометрически при λ 492 нм. Результаты выражали в условных единицах (МЕ/мл).

Статистический анализ данных проводился с помощью пакета программ EXCEL 2003, STATISTICA 10.0, SPSS 20.0. Результаты считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Был проведен сравнительный анализ исследуемых показателей в образцах сыворотки крови всех больных РМЖ II (табл. 1)

Как видно из представленных данных достоверного изменения сывороточного содержания исследуемых растворимых антигенов, кроме CD54, выявлено не было ($p > 0,05$). Полученные показатели растворимых антигенов имели сильные колебания. Для унификации анализа высчитывали процент угнетения или стимуляции уровня по сравнению с контролем:

$$\frac{\text{опыт} - \text{контроль}}{\text{контроль}} \times 100$$

В качестве контроля было принято среднее значение исследуемого показателя в группе здоровых доноров.

Больные (n=64) были разделены на две группы. Группу 1 составили первичные нелеченные больные (n=58), группа 2 (n=6) состояла из больных после неоадьювантной терапии (табл. 2).

Анализ относительного содержания данных антигенов выявил следующее: сывороточный уровень растворимой формы молекул HLA I класса в группе №1 был сопоставим со значениями данного показателя в контрольной группе доноров, а в образцах сывороток крови больных группы №2 отмечено повышенное в 3 раза относительное содержание сывороточного уровня растворимого HLA I класса, чем в группе доноров ($p < 0,05$). Сывороточный уровень растворимого комплекса CD8–HLA I в группе №1 также был сопоставим с показателями в группе здоровых доноров, но был повышен в 1,5 раза относительно контроля (доноры) у больных группы №2 ($p < 0,05$).

Таблица 1

Содержание растворимых сывороточных лейкоцитарных антигенов у больных РМЖ II стадии M±m, ME/мл

Группы пациентов	HLA I	CD8-HLA I	CD54	CD18	CD18-54
Все больные II стадия РМЖ, n=64	1080,31±699,11	67,16±34,89	107,22±65,31*	169,41±67,40	139,34± 75,64
Здоровые доноры, n=63	878,74±219,69	68,39±4,77	127,50± 46,91	162,00±52,64	113, 01±55,00

*статистически достоверные различия по сравнению с группой доноров (p< 0,05)

Таблица 2

Относительное содержание растворимых сывороточных лейкоцитарных антигенов в группах леченных и нелеченных больных РМЖ M±m, %

Группы пациентов	HLA I	CD8-HLA I	CD54	CD18	CD18-54
Все больные II стадия РМЖ, n=64	123,10±38,00	99,00±51,20	84,30±41,10*	104,20±30,00	122,15±20,00
Группа №1, n=58	105,00±30,30**	93,30± 23,83**	76,20±0,10* **	97,20±31,18**	82,10±13,00* **
Группа №2, n=6	296,20±77,40* **	152,15±43,00* **	164,25±40,00* **	165,00±48,10* **	499,00±70,40* **

*статистически достоверные различия по сравнению с группой доноров (p< 0,05);

**статистически достоверные различия между группами нелеченных больных и больных после лечения (p < 0,05)

Выявлены пониженные показатели содержания сывороточного уровня растворимого антигена CD 54 в 1,1 раза в группе №1 и повышенные значения уровня CD54 в 1,6 раза в образцах сывороток крови группы №2 (p<0,05). Установлено, что сывороточный уровень растворимого CD 18 в группе №1 почти не отличался от показателей данного маркера у здоровых доноров, а в образцах сывороток крови больных группы №2 относительное содержание сывороточного уровня растворимого HLA I класса было повышенным в 1,7 раза (p<0,05). Сывороточный уровень растворимого комплекса CD18-CD54 в группе №1 был в 1,5 раза ниже, а в группе №2 был выше в 5 раз, чем в контрольной группе доноров (p<0,05).

Заключение

Проведенный анализ растворимых антигенов выявил различия в сывороточном содержании растворимых молекул HLA I, растворимых антигенов CD8, CD54, растворимых комплексов CD8-HLA I, CD18-CD54 у леченных и нелеченных больных РМЖ II стадии. Повышенные показатели данных маркеров выявлены у пациенток, получавших неоадьювантную терапию перед хирургическим удалением опухоли.

Литература

1. Алясова А.В., Пегов Р.Г., Михайлова Е.М. и др. Растворимые формы молекул HLA I класса в сыворотке крови больных раком молочной железы и легкого // Нижегородский медицинский журнал. – 2008. – № 4. – С. 98–103.
2. Барышников А.Ю., Тоневский А.Г. Моноклональные антитела в лаборатории и клинике. – М.: Медицина, 1997. – 212 с.
3. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека // Гематология и трансфузиология. – 1990. – № 8. – С. 4.
4. Барышников А.Ю., Голубцова Н.В., Бузова О.С. и др. Экспрессия антигена CD44 у больных метастатической меланомой кожи // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 17–20.
5. Варшавский Л.В., Алясова А.В., Барышников А.Ю., Новиков В.В. Мембранные и растворимые формы CD50 (ICAM3) антигена при раке молочной железы // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16–7.
6. Вишневская Т.В., Масалов О.В., Шкурко Т.В. и др. Растворимые формы дифференцировочных антигенов в сыворотке крови больных гепатитом С // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 1. – С. 33–40.
7. Голенков А.К., Митина Т.А., Новиков В.В. и др. Клиническое значение роли растворимых молекул адгезии (sCD50-ICAM-3), апоптоза (sCD95) и sHLA класса I при лимфопролиферативных заболеваниях // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 60–4.
8. Голубцова Н.В., Михайлова И.Н., Новиков В.В. и др. Изменение сывороточного содержания растворимых молекул HLA I класса, антигена CD8 и растворимого комплекса HLA I-CD8 у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 41–5.
9. Голубцова Н.В., Михайлова И.Н., Новиков В.В. и др. Прогностическое значение сывороточных уровней растворимых молекул HLA I класса и антигена CD8 у больных диссеминированной меланомой // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 4. – С. 103–6.
10. Голубцова Н.В., Степанова Е.В., Бармашов А.В. и др. Определение специфических противоопухолевых антител у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 25–8.
11. Гостюжова Е.А., Ликов В.Ф., Караулов А.В., Новиков В.В. Особенности содержания растворимых молекул HLA I класса, CD8 антигена и их комплексов при хроническом миелолейкозе // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – № 3. – С. 33–8.

12. Коровушкин К.А., Бабаев А.А., Котельницкая Т.В. и др. Роль структурно-функциональных форм растворимых дифференцировочных антигенов молекул в дифференциальной диагностике миомы матки и рака эндометрия // Современные технологии в медицине. – 2010. – № 2. – С. 53–7.
13. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы // Иммунология. – 2007. – № 4. – С. 249–53.
14. Новиков В.В., Евсегнеева И.В. Новые дифференцировочные антигены человека, утвержденные на VII Международном воркшопе // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 3–6.
15. Новиков В.В., Евсегнеева И.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы при социально значимых инфекциях. Исследование их роли при вирусных инфекциях // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 131–45.
16. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы. – М.: Изд-во МИА, 2008. – 243 с.
17. Новиков В.В., Караулов А.В., Барышников А.Ю. Особенности структурного состояния пула растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы // Молекулярная медицина. – 2009. – № 4. – С. 27–33.
18. Новиков В.В., Бабаев А.А., Кравченко Г.А. Растворимые ассоциаты молекул адгезии CD54 и CD18 в сыворотке крови человека // Иммунология. – 2008. – № 4. – С. 220–3.
19. Новиков В.В., Бурова О.С., Королев В.В. и др. Сывороточный уровень растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы при меланоме // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 6.
20. Пегов Р.Г., Алясова А.В., Новиков В.В., Барышников А.Ю. Содержание растворимой формы молекул HLA I класса в сыворотке крови больных раком лёгкого // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. – № 2. – С. 38–40.
21. Птицын Ю.С., Лебедев М.Ю., Королев В.В. и др. Различия в содержании сывороточных форм CD38 антигена при иммунологических нарушениях разной этиологии // Медицинская иммунология. – 1999. – Т. 1, № 3. – С. 82.
22. Тагиров О.Т., Кравченко Г.А., Козлов А.Ю. и др. Растворимый Fas(CD95) белок, ингибирующий апоптоз, как прогностический биомаркер течения рака молочной железы // Вестник Нижегородского университета им. Н.И.Лобачевского. Серия: Биология. – 2001. – № 1. – С. 21–5.
23. Evans B.J., McDovall A Taylor P. et al. Shedding of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) in a human inflammatory response // Blood. – 2006. – 107. – P. 3593–9.
24. Lebedev M.Ju., Vilkov S.A., Sholkina M.N. et al. Peripheral blood lymphocyte immunophenotype and serum concentration of soluble HLA class I in burn patients // Burn. – 2003. – 29(2). – P. 123–8.
25. Ptisyn Y.S., Bornyakova L.A., Baryshnikov A.Yu. et al. A soluble form of Fas/apo-1 (CD95) antigen in the serum of viral hepatitis patients // International Journal on Immunorehabilitation. – 1999. – 14. – P. 110.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

РМЖ
BC

– рак молочной железы
– Breast cancer

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 577.112.6+577.152.32]:612.112.3

А.Н. Хочанский¹, А.Е. Земляков², О.В. Калюзин^{1,3}, В.В. Решетникова⁴**ВЛИЯНИЕ β -ГЛИКОЗИДОВ МУРАМИЛДИПЕПТИДА
НА НК-АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ
И ФАГОЦИТАРНУЮ ФУНКЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА**¹ФГБУ «НИИМЧ» РАМН, Москва²Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина³ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва⁴ФГБУ «РОНЦ им Н.Н. Блохина» РАМН, Москва**Контактная информация**

Хочанский Андрей Николаевич, младший научный сотрудник лаборатории иммунопатологии и биотехнологии

адрес: 117418 Москва, ул. Цюрупы, д. 3; тел.: +7(910)436-43-14

e-mail: darkstalker@mail.ru

Статья поступила 16.09.2013, принята к печати 27.01.2014.

Резюме

Изучено влияние β -гликозидов МДП с алифатической, циклической и трициклической (адамантильной) структурой агликона на НК-активность МЛ и фагоцитарную функцию нейтрофилов человека. Инкубация мононуклеаров с МДП или β -гептилгликозидом МДП стимулировала цитотоксическую активность этих клеток. Добавление этих же двух гликопептидов к цельной крови усиливала фагоцитарную функцию нейтрофилов. Другие гликозиды с большим числом атомов углерода в алифатической цепи агликона, также как с циклической структурой последнего в целом были менее активными.

Ключевые слова: МДП, гликозиды, агликон, мононуклеарные лейкоциты, НК-активность, фагоцитоз.A.N. Khochanskyi¹, A.E. Zemlyakov², O.V. Kalyuzhin^{1,3}, V.V. Reshetnikova⁴**EFFECT OF MURAMYL DIPEPTIDE β -GLYCOSIDES
ON NK-ACTIVITY OF HUMAN MONONUCLEAR LEUKOCYTES
AND PHAGOCYTIC FUNCTION OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES**¹Human Morphology Research Institute of RAMS, Moscow²Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Ukraine³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University⁴FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow**Abstract**

We have studied the influence of β -glycosides of MDP with aliphatic, cyclic and tricyclic (adamantyl) aglycon structure on NK activity of human mononuclear leukocytes and phagocytic function of neutrophilic granulocytes. Incubation of mononuclear cells with MDP or MDP β -heptylglycoside was shown to cause stimulation of cytotoxic activity of these cells. Addition of the above two glycopeptides to the whole blood enhanced the phagocytic function of neutrophils. The other glycosides with greater number of carbon atoms in aliphatic chain as well as with cyclic structure of aglycon were generally less active.

Key words: MDP, glycosides, aglycon, mononuclear leucocytes, NK activity, phagocytosis.**Введение**

МДП – компонент пептидогликана клеточной стенки бактерий – является объектом пристального внимания как молекула, модификации химической структуры которой привели к созданию нескольких иммуотропных препаратов и большой группы перспективных фармакологических веществ [4; 11; 16]. МДП и его производные обладают широким спектром биологических свойств, что определяет возможность применения этих гликопептидов в рамках разных иммунотерапевтических/профилактических подходов [9]. Раскрытие молекулярных механизмов действия МДП и его производных, в том числе агонизма цитозольных рецепторов NOD2 [13; 14], послужило новым стимулом для поиска эффективных и безопасных синтетических аналогов МДП. Ранее мы показали наличие выраженной иммуномодулирующей активности ряда гликозидов МДП [3; 8; 10]. Более того, определены некоторые физико-химические характеристики молекулы в целом [7; 15] и пространственно-конфигурационные особен-

ности агликонов [1; 2; 5; 6], которые позволяют гликозидам МДП наиболее эффективно воздействовать на функцию клеток иммунной системы. Однако вопрос о влиянии структуры агликона на иммуномодулирующее действие этих соединений во многих аспектах остается открытым.

Вышесказанное свидетельствует о целесообразности продолжения поиска эффективных иммуномодуляторов среди гликозидных аналогов МДП и уточнения зависимости биологической активности этих гликопептидов от строения агликона.

Материалы и методы

МДП и его β -гликозиды (гептил-, децил-, додецил-, циклогексил-, циклооктил-, циклодецил-, циклододецил- и адамантил-МДП) синтезированы как описано ранее [2].

Матричные растворы исследуемых гликопептидов готовили путем их разведения в физиологическом растворе (ПанЭко, Россия) с добавлением 10 % ДМСО (ПанЭко, Россия).

МЛ, служившие КЭ, выделяли из интрефазного кольца, образуемого после 25-минутного центрифугирования гепаринизированной (25 Ед/мл, ПанЭко, Россия) крови здорового донора при 1500 об/мин с раствором фиколла-урографина (ПанЭко, Россия). МЛ трижды отмывали в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) и ресуспендировали до концентрации $1,2 \times 10^6$ клеток/мл в ППС – RPMI 1640, содержащей 2 ммоль L-глутамин, 1250000 Ед пенициллина и стрептомицина (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США).

В качестве КМ при определении НК-активности МЛ использовали клетки эритролейкемии человека линии K562 (коллекция культур и штаммов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН). КМ ресуспендировали в ППС до концентрации $1,2 \times 10^6$ клеток/мл.

В лунки 96-луночного планшета (NUNC, Дания) вносили по 100 мкл суспензии КЭ и по 20 мкл среды, содержащей испытываемые соединения в конечных концентрациях 1: 10 и 100 мкмоль. После 24-часового культивирования в атмосфере увлажненного воздуха с 5 % CO_2 при температуре 37 °С к КЭ добавляли по 100 мкл взвеси КМ так, чтобы соотношение КЭ : КМ составляло 1 : 1, затем культуры клеток инкубировали еще в течение 24 ч. В контрольных лунках культивировали только КМ или только КЭ в среде с аналогичными концентрациями мурамилпептидов. За 2 ч до конца инкубации в каждую лунку вносили по 15 мкл 5 %-ного р-ра 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиума бромид (МТТ; ПанЭко, Россия).

По завершении культивирования из лунок удаляли надосадочную жидкость и добавляли по 150 мкл диметилсульфоксида. Затем планшет помещали на 10 минут в орбитальный шейкер с установленной скоростью вращения платформы 120 об/мин, после чего определяли оптическую плотность раствора при λ 540 нм с помощью фотометра (Multiscan, Финляндия) и оценивали цитотоксическую активность МЛ [12].

Влияние гликозидов МДП на фагоцитарную активность нейтрофилов определяли по изменению их способности поглощать частицы латекса в цельной крови здорового донора.

К 1 мл гепаринизированной (25 Ед/мл) крови добавляли 0,5 мл р-ра Хэнкса (ПанЭко, Россия), содержащего исследуемые гликопептиды в конечной концентрации 10 мкмоль и 50 мкл суспензии частиц латекса (ПанЭко, Россия) с концентрацией 1×10^7 частиц/мл, и инкубировали в течение 24 ч, после чего определяли ФЧ, среднее количество поглощенных частиц латекса на 1 нейтрофил, и ФИ, долю фагоцитирующих нейтрофилов (%).

Результаты и обсуждение

Внесение в культуру МЛ немодифицированного МДП и его гликозидных аналогов по разному влияло на цитотоксическую активность этих клеток по отношению к НК-чувствительной линии K652.

При соотношении КЭ : КМ, равном 1 : 1, наибольшую стимулирующую способность проявили МДП и гептил-МДП. При этом действие этих гликопептидов характеризовалась четкой дозозависимостью, а в концентрации 100 мкмоль они усиливали цитотоксическую активность МЛ на 31–36 %. Помимо этих соединений, достоверную стимуляцию НК-активности вызывали децил-МДП в максимальной из использованных концентраций, а также циклооктил-МДП в дозах 1 и 100 мкмоль.

Обращает на себя внимание снижение иммуномодулирующей активности гликозидов МДП с алифатической (линейной) структурой агликона при увеличении числа атомов углерода в последнем от 7 до 10 и далее от 10 до 12. Ранее подобные закономерности были описаны в тест-системе, в которой в качестве КЭ использовали мышинные спленоциты, а в качестве мишеней – НК-чувствительные клетки лимфомы YAC-1 : гептил-МДП превосходил по биологической активности немодифицированный МДП, а его гомолог гексадецил-МДП заметно уступал по активности этому референс-контролю [8; 15].

Возможно падение биологической активности с увеличением длины липофильного «хвоста», присоединенного к гликозидному центру МДП, связано с нарушением комплементарности данных веществ к NOD2-рецепторам и другим сенсорам биологических эффектов мурамилпептидов. Такой зависимости биологической активности молекулы от количества атомов углерода не выявлено у гликозидов с циклической структурой агликона.

Замещение водорода в гидроксильной группе в положении C1 остатка мурамовой кислоты на высокогидрофобную и жесткую трициклическую структуру (адамантил-МДП), обладающую наибольшей гидрофобностью, несколько снижало биологическую активность молекулы МДП в условиях использованной тест-системы *in vitro*.

Фагоцитарная активность нейтрофилов гранулоцитов крови здоровых доноров достоверно не изменялась в ответ на воздействие тестируемых веществ в концентрации 10 мкмоль. Однако МДП и гептил-МДП проявляли выраженную тенденцию к увеличению числа активно фагоцитирующих нейтрофилов.

Остальные испытанные производные МДП не вызывали статистически значимых изменений ФЧ и ФИ по сравнению с таковыми в контроле.

Полученные данные подтверждают высокую биологическую активность гептил-МДП, который в целой серии ранее проведенных опытов *in vitro* и *in vivo* превосходил в этом плане немодифицированный МДП и многие его аналоги [3; 10]. То, что в рамках настоящего исследования гептил-МДП не превышал по активности МДП, отчасти можно объяснить ограниченными условиями и особенностями использованных модельных тест-систем.

Так, при изучении влияния МДП и его гликозидов на НК-активность МЛ использовали только одно соотношение КЭ : КМ (1 : 1), которое, вероятно, не является оптимальным и достаточно чувствительным для сравнения близких по химической структуре веществ.

Кроме того, после 24-часовой обработки МЛ изучаемыми гликопептидами, к этим клеткам добавляли КМ без предварительной отмывки первых, т.е. мурамилпептиды присутствовали в культуре клеток в течение всего эксперимента и теоретически могли изменять выживаемость клеток, подверженных цитотоксическому действию НК-клеток. Для сравнения, преимущества гептил-МДП над МДП ранее были продемонстрированы в тест-системе, в которой соотношение КЭ : КМ составляло 25 : 1 и выше, а КЭ после инкубации в среде, содержащей МДП и его аналоги, тщательно отмывали перед внесением КМ [8; 15].

Действие гликозидов МДП на фагоцитарную активность нейтрофилов сравнивались лишь в одной эквимольной концентрации в разбавленной цельной крови, что говорит о необходимости про-

Таблица 1

Влияние гликозидов МДП на цитотоксическую активность моноклеаров по отношению к клеткам NK – чувствительной линии K562 (КЭ:КМ = 1:1)

Исследуемое вещество	Цитотоксическая активность моноклеаров (%), обработанных исследуемыми гликопептидами в различных концентрациях		
	100 мкмоль	10 мкмоль	1 мкмоль
МДП	75±4*	70±2*	53±1
гептил-МДП	72±5*	69±1*	55±3
децил-МДП	60±1*	52±4	56±4
додецил-МДП	53±3	51±1*	54±1
адамантил-МДП	57±2	49±1*	50±2*
циклосекстил-МДП	55±3	54±5	52±3
циклоктил-МДП	62±2*	60±3	59±1*
Циклодецил-МДП	58±1	56±2	56±2
Контроль	55±2		

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Таблица 2

Влияние гликозидов МДП (10 мкмоль) на фагоцитарную активность нейтрофилов цельной крови человека

Исследуемое вещество	ФИ (%)	ФЧ (усл. ед)
МДП	70±3	4–6
гептил-МДП	68±2	3–4
децил-МДП	62±1	2–3
додецил-МДП	58±5	3–4
адамантил-МДП	58±4	2–3
циклогексил-МДП	61±2	3–4
циклооктил-МДП	63±1	3–4
циклодецил-МДП	59±3	2–3

должения этих исследований с использованием более широкого диапазона доз исследуемых веществ и, возможно, с использованием сепарированных гранулоцитов.

Кроме того, предстоит ответить на вопрос, как гликозиды МДП различаются между собой и с немодифицированными МДП по способности вызывать NOD2-зависимую активацию транскрипционных факторов и функции иммунокомпетентных клеток?

Выводы

Полученные данные указывают, что увеличение длины агликона уменьшает биологическую активности производных МДП, что возможно связано с нарушением комплиментарности данных веществ по отношению к NOD2-рецептору. Из этого следует, что самым эффективным методом поиска более активных и безопасных модификаций МДП является синтез таковых с короткой цепью гликозидного радикала агликона.

Литература

1. Земляков А.Е., Цикалов В.В., Калюжнин О.В. и др. Гликозиды N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин. Влияние конфигурации гликозидного центра и природы агликона на биологическую активность // Биоорганическая химия. – 2003. – Т. 29, № 3. – С. 316–22.
2. Земляков А.Е., Цикалов В.В., Калюжнин О.В. и др. Синтез и исследование влияния конфигурации гликозидной связи и природы агликона на иммуностимулирующую активность гликозидов мурамоилдипептида // Физиологически активные вещества. – 2002. – № 1. – С. 35–8.
3. Калюжнин О.В. Иммуномодулирующая активность гликозидных производных N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин // Вестник новых медицинских технологий. – 2003. – Т. 10, № 1–2. – С. 28–32.
4. Калюжнин О.В. Производные мурамылдипептида в эксперименте и клинике // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1998. – № 1. – С. 104–8.
5. Калюжнин О.В., Земляков А.Е., Калюжина Е.В. и др. Действие гликозидов мурамылдипептида на пролиферацию лимфоцитов и выработку ими интерлейкина-2 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 8. – С. 186–90.
6. Калюжнин О.В., Нелюбов М.В., Калюжина Е.В. и др. Влияние конфигурации гликозидной связи и структуры агликона гликозидов мурамылдипептида на их способность стимулировать продукцию интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли макрофагами // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, № 9. – С. 326–8.
7. Калюжнин О.В., Фукс Б.Б. Влияние гидро-липофильного баланса производных мурамылдипептида на их взаимодействие с биомембранами и включение в клетки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1996. – Т. 122, № 12. – С. 658–61.
8. Калюжнин О.В., Фукс Б.Б., Бовин Н.В. и др. Иммуномодулирующая активность новых производных мурамылдипептида *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1994. – Т. 117, № 5. – С. 510–3.
9. Караулов А.В., Калюжнин О.В. Иммуноterapia инфекционных болезней: проблемы и перспективы // Терапевтический архив. – 2013. – Т. 85, № 11. – С. 100–9.

10. Караулов А.В., Калюжин О.В., Земляков А.Е. Биологическая активность гликозидных производных N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 14–24.
11. Пинегин Б.В., Андропова Т.М., Карсонова М.И. Препараты мурамилдипептидового ряда – иммуно-тропные лекарственные средства нового поколения // Int. J. Immunorehabilitation. – 1997. – № 6. – С. 27–34.
12. Шакова А.П., Павлова К.С., Булычева Т.И. МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток // Клиническая и лабораторная диагностика. – 2000. – № 2. – С. 20–3.
13. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J. et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection // J. Biol. Chem. – 2003. – 278(11). – P. 8869–72.
14. Grimes C.L., Ariyananda Lde Z., Melnyk J.E., O'Shea E.K. The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment // J. Am. Chem. Soc. – 2012. – 134(33). – P. 13535–7. doi: 10.1021/ja303883c.
15. Kalyuzhin O.V., Zemlyakov A.E., Fuchs B.B. Distinctive immunomodulating properties and interactivity with model membranes and cells of two homologous muramyl dipeptide derivatives // Int. J. Immunopharmacol. – 1996. – 18(11). – P. 651–9.
16. Ogawa C., Liu Y.J., Kobayashi K.S. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy // Curr. Bioact. Compd. – 2011. – 7(3). – P. 180–97.

СПИСОК ИСПОЛЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

МДП (MDP)	– мурамилдипептид (muramyl dipeptide; N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин)
МЛ	– моноклеарные лейкоциты
КМ	– клетки-мишени
КЭ	– клетки-эффекторы
ППС	– полная питательная среда
ФЧ	– фагоцитарное число
ФИ	– фагоцитарный индекс

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 546.273'131:577.352.2:615.831

*М.В. Дмитриева¹, Н.А. Оборотова¹, О.Л. Орлова¹, А.П. Полозкова¹, И.И. Агапов², М.П. Кирпичников³***ЛИПОСОМАЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА БОРХЛОРИНА**¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва²ФНЦ Трансплантологии и искусственных органов им. В.И. Шумакова, Москва³МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва**Контактная информация:***Дмитриева Мария Вячеславовна, младший научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДyTO***адрес:** 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.:** +7(499)612-81-86; +7(499)324-18-14**e-mail:** mary.24@mail.ru

Статья поступила 23.01.2014, принята к печати 27.01.2014.

Резюме

В течение последнего десятилетия большой интерес в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии злокачественных новообразований вызывают производные хлоринов. Целью данной работы являлось создание стерически стабилизированной липосомальной лекарственной формы нового отечественного фотосенсибилизатора борхлорина для внутривенного введения. В результате фармацевтических исследований выбран оптимальный состав компонентов и разработана технология получения липосомальной лекарственной формы гидрофобного борхлорина. Включение препарата в свежеприготовленные липосомы составило не менее 99 %, средний диаметр везикул – 185±10 нм. Разработанная лекарственная форма показала низкую «темновую» токсичность и высокую цитотоксическую активность в отношении клеток глиомы крысы С6.

Ключевые слова: борхлорин, липосомы, технология, фотодинамическая терапия, глиома С6*M.V. Dmitrieva¹, N.A. Oborotova¹, O.L. Orlova¹, A.P. Polozkova¹, I.I. Agapov², M.P. Kirpichnikov³***BORCHLORIN LIPOSOMAL DOSAGE FORM**¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow²V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantation and Artificial Organs, Moscow³Lomonosov Moscow State University**Abstract**

Chlorin derivatives have great interest as photosensitizers for photodynamic therapy of malignant neoplasms during the last decade. The main goal of this research was to develop sterically stabilized liposomal dosage form for intravenous intake of new home-produced photosensitizers Borchlorin. Optimum composition and formulation of liposomal dosage form of hydrophobic Borchlorin are results of the Study. Concentration of Borchlorin in freshly prepared liposomes is upwards 99% and vesicles average size is – 185±10 nm. Developed dosage form shows low dark phototoxicity and high cytotoxicity against rat glioma cells C6.

Key words: borchlorin, liposomes, technology, photodynamic therapy, rat glioma C6.**Введение**

Одним из ведущих направлений развития фотодинамической терапии злокачественных новообразований является создание сенсибилизаторов, обладающих высокой фототоксической активностью [6–12; 15; 18; 21]. В течение последнего десятилетия большой интерес в качестве ФС вызывают тетрапиррольные соединения, в частности производные хлоринов. Установлено, что ФС хлоринового ряда обладают интенсивной полосой поглощения в длинноволновой красной области спектра, оптимальной туморотропностью и высокой фототоксичностью при отсутствии «темновой» токсичности [4; 9; 17; 18; 20].

В институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова) синтезирован новый оригинальный ФС на основе борированного хлорина e_6 (БХ), который имеет ряд конкурентных преимуществ. Активная субстанция БХ имеет максимум поглощения 662±1 нм, обладает достаточно высокой селективностью накопления в опухоли по отношению к нормальной ткани и низкой токсичностью. В основе противоопухолевого эффекта БХ лежит уникальный механизм

действия – быстрый фотонекроз, в то время как другие ФС вызывают недостаточно эффективную и более медленную гибель опухолевых клеток за счет апоптоза и аутофагии. Также значительным преимуществом данной субстанции является возможность использования в качестве агента для лучевой терапии, в частности, нейтронзахватной терапии – метода локального воздействия на опухоль, что обусловлено наличием в молекуле борированной структуры – карборана. Кроме того, установлено, что борирование может усиливать противоопухолевое действие ФС [13; 14; 19; 22].

В связи с гидрофобными свойствами данного вещества предложен путь инкапсуляции БХ в липосомы и создание стерически стабилизированной ЛЛФ для внутривенного введения. Преимущество использования липосомальной системы доставки препарата позволяет обеспечить:

1. повышение накопления ФС в опухоли посредством пассивного нацеливания;
2. снижение накопления ФС в чувствительных здоровых тканях;
3. защиту ФС от деградации и преждевременного клиренса;
4. проникновение ФС в опухолевую клетку.

Кроме того, липосомы биodeградируемы и не вызывают иммунного ответа [1–3; 5; 7; 9; 16].

Данная статья посвящена разработке оптимального состава и технологии получения ЛЛФ борхлорина, изучению и оценке цитотоксической активности полученной лекарственной формы борхлорина и его субстанции.

Материалы и методы

Препараты и реактивы

- субстанция борхлорина (ИНЭОС им. А.Н Несмеянова);
- яичный фосфатидилхолин (E PC S) (Lipoid, Германия);
- холестерин (Sigma, Япония);
- пегелированный дистеароилфосфатидилэтаноламин (PEG-2000-DSPE) (Lipoid, Германия);
- сахароза (Химмед, Россия);
- натрия хлорид (Химмед, Россия);
- хлороформ стабилизированный, ХЧ (Химмед, Россия);
- спирт этиловый 95 %-ный (ФС 42-3072-94).

Приборы и аппаратура

Весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), весы лабораторные Sartorius LA1200S (Sartorius AG, Германия), pH-метр HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Германия), испаритель роторный Rotavapor R-200 (Büchi Labortechnik AG, Швейцария), ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия), экструдер LipexTM Thermobarrel Extruder (Northern Lipids Inc., Lipex Biomembranes, Inc., Канада), нейлоновые мембранные фильтры «Pall» N66 с диаметром пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (Pall Corporation, США; ООО Палл Евразия, Россия), наносайзер Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия), установка сублимационной сушки «Edwards Minifast DO.2» (Ergo Electronic S.p. A., Италия), ридер LabSystem Multiscan plus.

Получение липосом с борхлорином

Липосомы с борхлорином получали методом Бенгема в модификации для гидрофобных субстанций с использованием яичного фосфатидилхолина (лецитин), холестерина и PEG-2000-DSPE.

Определение размера липосом

Анализ среднего диаметра липосом проводили методом корреляционной спектроскопии светорассеяния с помощью прибора наносайзера.

Количественное

определение борхлорина в липосомах

Количественное содержание препарата в лекарственной форме определяли методом спектрофотометрии с использованием РСО при λ 662 нм. Компоненты, входящие в состав липосом, в этой области спектра практически не поглощают.

Оптическую плотность спиртовых растворов липосомального борхлорина и РСО измеряли относительно 95%-ного этилового спирта. Количество борхлорина (х, мг/мл) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_1 \times a \times B_1}{A_0 \times B_0}, \text{ где}$$

A_1 и A_0 – соответственно оптические плотности растворов образца липосомальной дисперсии борхлорина;

a – навеска РСО борхлорина, в мг;

B_1 и B_0 – соответственно разведения липосомальной дисперсии и РСО борхлорина.

Определение степени включения борхлорина в липосомы

В связи с тем, что борхлорин является гидрофобным веществом и при получении липосом включается непосредственно в липидный бислой, количество включенного препарата определяли как соотношение концентрации препарата в липосомальной дисперсии после экстракции к концентрации борхлорина в липосомальной дисперсии, полученной после гидратации липидной пленки. Показатель выражали в процентах:

$$КВП = \frac{C_{\phi}}{C_n} \times 100, \text{ где}$$

КВП – количество включенного препарата, %;

C_{ϕ} – концентрация борхлорина в дисперсии после фильтрации, мг/мл;

C_n – концентрация борхлорина в дисперсии после получения, мг/мл.

Определение pH липосомальной дисперсии

Определение значения pH осуществляли с помощью метода потенциометрии. В липосомальной дисперсии значение pH измеряли не разбавляя. Предварительно измеряли значение pH воды для инъекций.

Выбор оптимального состава липосом с борхлорином

Выбор компонентов для получения липосомального борхлорина основывался на их функциональности.

В качестве основного компонента, формирующего бислой, применяли лецитин. Для придания бислою необходимого уровня жесткости добавляли холестерин. Для предотвращения опсонизации и поглощения липосом клетками РЭС в состав лекарственной формы вводили фосфолипид, конъюгированный с PEG-2000-DSPE.

В процессе исследования получили 12 составов с различными молярными соотношениями препарат/лецитин и лецитин/холестерин.

Оценку качества этих составов проводили по трем основным параметрам – средний размер БМЛ и МОЛ соответственно, КВП и pH липосомальной дисперсии. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Выбор оптимального растворителя для гидратации липидной пленки

В качестве растворителя для гидратации липидной пленки использовали воду для инъекций, раствор криопротектора (раствор сахарозы при молярном соотношении лецитин : сахароза = 1 : 5) и изотонический раствор натрия хлорида. Влияние типа растворителя на качество липосомальной дисперсии борхлорина оценивали по двум параметрам: средний размер липосом и pH дисперсии. Результаты исследования приведены в табл. 2.

Таблица 1

Модели составов липосомальной лекарственной формы борхлорина

№	Молярное соотношение компонентов		Средний ϕ липосом, нм		pH	КВП, %
	Препарат/ лецитин	Лецитин/ холестерин	БМЛ	МОЛ		
1	1:100	4:1	371 $\pm$ 15	205 $\pm$ 6	7,1	89
2		3:1	261 $\pm$ 20	208 $\pm$ 8	7,5	92
3		2:1	290 $\pm$ 16	235 $\pm$ 8	6,4	91
4	1:140	3:1	556 $\pm$ 22	255 $\pm$ 16	6,3	93
5	1:170	3:1	656 $\pm$ 15	211 $\pm$ 8	6,8	96
6	1:180	3:1	435 $\pm$ 18	188 $\pm$ 10	5,4	97
7	1:185	3:1	230 $\pm$ 10	196 $\pm$ 12	6,4	98
8	1:190	3:1	578 $\pm$ 15	207 $\pm$ 10	6,1	93
9	1:200	4:1	907 $\pm$ 25	250 $\pm$ 14	6,0	97
10		3:1	266 $\pm$ 20	185 $\pm$ 10	6,9	99
11		2:1	908 $\pm$ 22	240 $\pm$ 10	5,5	99
12	1:210	3:1	476 $\pm$ 16	205 $\pm$ 8	6,1	99

Таблица 2

Выбор растворителя для гидратации липидной пленки

№	Растворитель	Средний ϕ липосом, нм		pH липосомальной дисперсии
		БМЛ	МОЛ	
1	Вода для инъекций	266 $\pm$ 20	185 $\pm$ 10	6,9
2	Раствор сахарозы	261 $\pm$ 15	215 $\pm$ 10	7,3
3	Изотонический раствор натрия хлорида	404 $\pm$ 22	206 $\pm$ 8	5,7

Таблица 3

Сравнительный анализ технологических схем получения ЛЛФ борхлорина

№	Параметр	Вариант №1	Вариант №2
1	Растворитель для гидратации пленки	Вода для инъекций*	Раствор сахарозы**
2	Гидратация липидной пленки	Процесс гидратации затруднен	Процесс гидратации протекает легко и быстро
3	Описание липосомальной дисперсии	Вязкая, зеленого цвета, с большим количеством пены	Невязкая, молочно-зеленого цвета, с небольшим количеством пены, которая не отстаивается и застывает
4	Средние размеры липосом, нм	БМЛ	266 $\pm$ 20
		МОЛ	185 $\pm$ 10
		после лиофилизации	180 $\pm$ 10
			261 $\pm$ 15
			215 $\pm$ 10
			190 $\pm$ 10

общий объем делили на 2 части: 1 – для гидратации пленки, 2 – для введения раствора криопротектора

** в общем объеме воды для инъекций растворяли навеску сахарозы, полученным р-ром гидратировали пленку

Таблица 4

Влияние экструзии на качество липосомальной дисперсии борхлорина

п циклов	Средний размер МОЛ, нм	N циклов	Средний размер МОЛ, нм
1	263 $\pm$ 20	7	205 $\pm$ 7
2	206 $\pm$ 12	8	209 $\pm$ 10
3	209 $\pm$ 13	9	209 $\pm$ 8
4	204 $\pm$ 8	10	194 $\pm$ 10
5	190 $\pm$ 5	11	227 $\pm$ 15
6	211 $\pm$ 8	12	215 $\pm$ 6

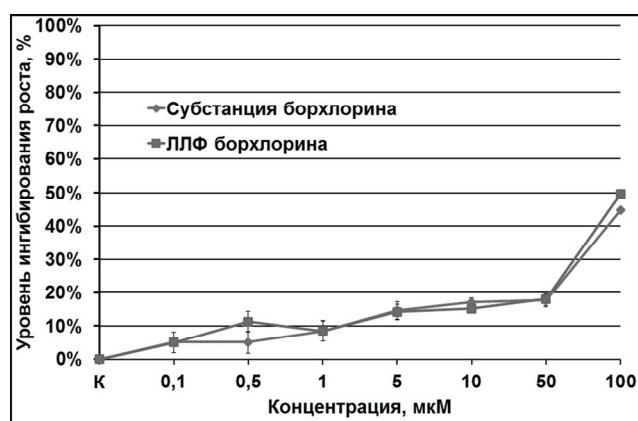


Рис. 1. «Темновая» токсичность субстанции и ЛЛФ борхлорина

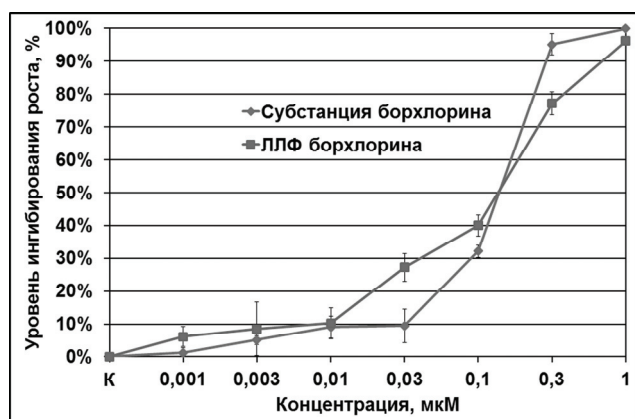


Рис. 2. Цитотоксичность при облучении субстанции и ЛЛФ борхлорина.

Изучение цитотоксичности субстанции и липосомальной дисперсии борхлорина на клетках глиомы крысы С6

Клетки глиомы крысы С6, находящиеся в логарифмической фазе роста, равномерно распределяли по лункам 96-луночного планшета из расчета 1×10^4 клеток в 100 мкл на лунку и инкубировали в темноте в атмосфере, содержащей 6,1 % CO_2 , при $+37^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Затем в лунки того же планшета помещали вещества в разных концентрациях в среде с 10 % ЭТС по 100 мкл в лунку. Клетки с веществами инкубировали в атмосфере, содержащей 6,1 % углекислого газа, при $+37^\circ\text{C}$ в течение 1 часа.

Для исследования цитотоксичности при облучении по окончании инкубации облучали, используя монохромный источник света с λ 633 нм, в течение 30 мин. Затем инкубировали в темноте в атмосфере, содержащей 6,1% CO_2 , при $+37^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. После чего среду с веществами удаляли и вносили по 100 мкл МТТ в среде в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали при $+37^\circ\text{C}$ в течение 24 часов. Осадок растворяли в 200 мкл ДМСО. Колориметрические измерения проводили на ридере Labsystem Multiscan plus при 540 нм. Вычисляли уровень ингибирования роста клеток в культуре (ИК) по формуле:

$$\text{ИК}(\%) = \left[\frac{\text{OD}_k - \text{OD}_o}{\text{OD}_k} \right] \times 100\%, \text{ где}$$

OD_k — оптическая плотность в контрольных лунках без воздействия,

OD_o — оптическая плотность в опытных лунках.

Результаты и обсуждение

На первоначальном этапе работы главной задачей было определение оптимального состава ЛЛФ борхлорина. Из 12 разработанных ЛЛФ выбран состав №10 с молярным соотношением препарат/лецитин = 1:200 и лецитин/холестерин = 3:1, который обеспечивал включение борхлорина на уровне 99%, приемлемый размер липосом 185 ± 10 нм и значение pH 6,9 (табл. 1).

Далее проводили оценку качества липосомальных дисперсий, образовавшихся после гидратации липидной пленки различными растворителями. Полученные данные показали, что вода для инъекций обеспечивает получение дисперсии с оптимальным средним размером липосом и значением pH (табл. 2).

Следующим этапом исследования являлась разработка технологии получения ЛЛФ борхлорина. Нами предложены 2 технологические схемы.

1 вариант

Точные навески лецитина, холестерина и PEG-2000-DSPE растворяли в хлороформе. К субстанции борхлорина прибавляли 10 мл хлороформа и помещали в УЗ-ванну «Transsonic» на 5–10 мин для ускорения процесса растворения. Смешивали хлороформные растворы компонентов лекарственной формы, фильтровали через нейлоновый мембранный фильтр «Pall» с размером пор 0,22 мкм и переносили в круглодонную колбу вместимостью 2 л. Органический растворитель отгоняли при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ с получением полупрозрачной липидной пленки, которую досушивали под вакуумом в течение 50 мин. Пленку гидратировали водой для инъекций с образованием дисперсии больших мультисамельных липосом. Для получения малых одноламеллярных липосом применяли метод экструзии, последовательно пропуская дисперсию через нейлоновые мембранные фильтры «Pall» с размером пор 1,2 мкм (1 раз); 0,45 мкм (1 раз); 0,22 мкм (5 раз). Затем к дисперсии добавляли необходимый объем раствора криопротектора (сахароза), перемешивали и проводили стерилизующую фильтрацию. Полученную стерильную липосомальную дисперсию борхлорина разливали во флаконы по 4 мл и лиофилизировали в камере сублимационной сушки.

2 вариант

Главное отличие второй технологической схемы от первой заключается в гидратации липидной пленки непосредственно раствором криопротектора (сахарозы) с дальнейшим проведением стерилизующей фильтрации. Полученную стерильную липосомальную дисперсию борхлорина разливали во флаконы по 4 мл и лиофилизировали в камере сублимационной сушки.

Результаты оценки качества липосомальных дисперсий борхлорина, полученных с помощью двух описанных выше технологий, особенности каждой технологической схемы, ее достоинства и недостатки приведены в табл. 3.

Обобщая данные табл. 3, можно отметить, что оба варианта технологии позволяют получить ЛЛФ борхлорина надлежащего качества и их можно использовать при серийной наработке данной лекарственной формы. Однако невозможность корректировки концентрации препарата в процессе наработки ЛЛФ и получение более крупных липосом по второй технологической схеме ограничивает ее использование.

В процессе разработки технологии также изучали влияние стадии экструзии через мембранный фильтр «Pall» с размером пор 0,22 мкм на ка-

чество получаемой липосомальной дисперсии (табл. 4). В результате данного исследования было установлено, что в процессе экструзии происходит уменьшение диаметра липосом и после 5 циклов достигает минимального значения (190 ± 5 нм). Дальнейшая фильтрация приводит к увеличению размера липосом, снижая качество липосомальной дисперсии.

Результаты изучения цитотоксической активности показывают, что «темновая» токсичность субстанции и липосомальной дисперсии борхлорина совпадают а цитотоксическая активность отличается незначительно. Для «темновой» токсичности $ИК_{50}$ составляет больше 50 мкМ, для световой токсичности – $ИК_{50} = 0,15$ мкМ, $ИК_{90}$ (субстанции борхлорина) = 0,3 мкМ и $ИК_{90}$ (ЛЛФ борхлорина) = 0,8 мкМ (рис. 1 и 2).

К настоящему времени наработаны 6 экспериментальных серий препарата для проведения доклинических испытаний и изучения стабильности препарата в процессе хранения.

Литература

1. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–30.
2. Барышников А.Ю., Барышникова М.А. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева. – 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
3. Барышникова М.А., Зангиева М.Т., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных нанокапсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–5.
4. Генина Э.А. Методы биофотоники: Фототерапия. – Саратов: Новый ветер, 2012. – С. 80–96.
5. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. и др. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 21–7.
6. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – № 4. – С. 3–8.
7. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 2. Липосомальные формы для создания фотоактивируемых липосомальных препаратов в фотобиологических исследованиях // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 6–12.
8. Меерович И.Г., Грин М.А., Миеерович Г.А. Новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазона на основе производных бактериохлорина Р. Предварительные результаты и изучение *in vivo* // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 98–104.
9. Миронов А.Ф. Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 8. – С. 32–40.
10. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
11. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
12. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 33–40.
13. Ольшевская В.А., Савченко А.Н., Зайцев А.В. и др. Производные 13(1)-n-{2-[n-(клозо-монокарбадодекаборан-1-ил)-метил]аминоэтил}амид-15(2),17(3)-диметилового эфира хлорина е₆, проявляющие свойства фотосенсибилизатора. Патент на изобретение РФ №2406726. – 2009 от 27.04.2009 г.
14. Рокицкая Т.И., Зайцев А.В., Ольшевская В. А. и др. Бодированные производные хлорина е₆ и фторсодержащих порфиринов как проникающие анионы: исследование на бислойных липидных мембранах // Биохимия. – 2012. – 77(9). – С. 1177–85.
15. Смирнова З.С., Оборотова Н.А., Макарова О.А. и др. Эффективность и фармакокинетика липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора «Фотосенс» на основе сульфоталацианина алюминия // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39, № 7. – С. 3–7.
16. Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 54–61.
17. Трухачева Т.В., Шляхтин С.В., Исаков Г.А. и др. Фотолон – новое средство для фотодинамической терапии. – Минск: РУП «Белмедпрепараты», 2012. – С. 64.
18. Чан Тхи Хай Иен, Поздеев В.И., Меерович Г.А. и др. Липосомальная лекарственная форма фотодитазина // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, №2. – С. 105–7.
19. Antonenko Y.N., Kotova E.A., Omarova E.O. et al. Photodynamic activity of the boronated chlorin e₆ amide in artificial and cellular membranes // Biochim Biophys Acta. Biochim Biophys Acta. – 2013. – 3(1838). – Р. 793–801.

Ведется отработка режима лиофилизации и разработка методики качественного анализа ЛЛФ борхлорина.

Выводы

1. Получена лекарственная форма борхлорина, позволяющая вводить препарат внутривенно.
2. Выбран оптимальный состав компонентов для ЛЛФ борхлорина, обеспечивающий средний размер частиц 185 ± 10 нм и включение препарата в везикулы не менее 99%.
3. Разработана технология получения ЛЛФ борхлорина надлежащего качества.
4. Показано, что ЛЛФ борхлорина имеет низкую «темновую» токсичность и обладает высокой цитотоксической активностью в отношении клеток глиомы крысы С6.

20. *Derkacheva V.M., Meerovich G.A., Meerovich I.G. et al.* Heterooxyluminium tetra-3-phenyl thiophthalocyanine is a new effective photosensitizer for photodynamic therapy and fluorescent diagnosis // *Bulleten Experimental Biology and Medicine.* – 2005. – 139(4). – P. 422–26.
21. *Meerovich I.G., Smirnova Z.S., Oborotova N.A. et al.* Hydroxylaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine is a new effective photosensitizer for photodynamic therapy and fluorescent diagnosis // *Bulleten Experimental Biology and Medicine.* – 2005. – 139(4). – P. 427–30
22. *Moisenovich M.M., Ol'shevskaya V.A., Rokitskaya T.I. et al.* Novel photosensitizers trigger rapid death of malignant human cells and rodent tumor transplants via lipid photodamage and membrane permeabilization // *PLoS One.* – 2010. – 5(9). – P. 12717.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ФС	– фотосенсибилизаторы
ЛЛФ	– липосомальная лекарственная форма
PCO	– рабочий стандарт образца
РЭС	– ретикулоэндотелиальная система
PEG-2000-DSPE	– полиэтиленгликолем
БМЛ	– большие мультисамеллярные липосомы
МОЛ	– малые одноламеллярные липосомы

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



УДК 577.352.2:615.012.1:616-091.818

*Н.В. Грищенко, М.А. Барышников, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, А.Ю. Барышников***ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ НЕ ИСПОЛЬЗУЮТ CD95-ЗАВИСИМЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ АПОПТОЗА***ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва***Контактная информация***Грищенко Наталия Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО***адрес:** 115478 Москва, Каширское шоссе, 24; **тел.** +7(495)324-10-65**e-mail:** natali-2712@mail.ru

Статья поступила 13.01.2014, принята к печати 20.01.2014

Резюме

В представленной работе сравнивалось цитотоксическое действие двух лекарственных форм Аранозы на клеточных линиях диссеминированной меланомы человека, экспрессирующих и не экспрессирующих CD95/Fas рецептор. Была высказана и подтверждена результатами проведенного эксперимента гипотеза о том, что липосомальные препараты не индуцируют программированную клеточную гибель посредством активации CD95-сигнального пути.

Ключевые слова: CD95-рецептор, липосомы, апоптоз.*N.V. Grischenko, M.A. Baryshnikova, A.P. Polozkova, N.A. Oborotova, A.Yu. Baryshnikov***LIPOSOMAL ANTICANCER DRUGS ARE NOT THE INDUCERS OF CD95-DEPENDENT APOPTOSIS***FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow***Abstract**

We have compared the cytotoxic effect of two liposomal drug formulation of Aranoza on disseminated melanoma cell lines expressing or not the CD95/Fas receptor. The data obtained confirmed our previous hypothesis that liposomal anticancer drugs do not participate in programmed cell death induced by CD95 signaling pathway.

Key words: CD95-receptor, liposomes, apoptosis.**Введение**

Долгое время некротическая клеточная смерть рассматривалась как единственный механизм действия токсических противоопухолевых препаратов. С появлением более точных аналитических и молекулярно-биологических методов исследования появилась возможность изучения химико-биологического взаимодействия с клеткой очень низких концентраций противоопухолевых препаратов [31]. Было идентифицировано несколько новых механизмов программированной клеточной смерти, таких как апоптоз, аутофагия, пироптоз и др. [28].

Появление новой концепции программированной клеточной смерти привело к изменению мнения о механизмах действия противоопухолевых препаратов [31]. Один из механизмов программированной клеточной смерти – CD95/Fas рецепторно-лигандный сигнальный путь апоптоза [2; 27; 29]. Противоопухолевый препарат взаимодействует с CD95-рецептором и на поверхностной цитоплазматической мембране клетки появляется аутокринный CD95-лиганд, который активирует этот сигнальный путь клеточной гибели. При отсутствии CD95/Fas рецептора на клеточной поверхности апоптоз не индуцируется. Это было продемонстрировано с помощью клеток линии Jurkat/A4, утративших экспрессию CD95-рецептора [33]. Следовательно, нарушение CD95-рецепторно-лигандного сигнального пути индукции апоптоза может быть одной из причин лекарственной резистентности.

Ранее было показано, что липосомальные противоопухолевые препараты преодолевают мно-

жественную лекарственную устойчивость, опосредованную гликопротеидом pgp170, продуктом гена MLY (MDR1) [26]. Липосомальная лекарственная форма изменяет биодоступность препарата, его фармакокинетику и взаимодействие с клеткой [1; 4–6; 9; 10; 13; 14; 16; 17; 20–25].

Нами была высказана гипотеза о том, что липосомальные препараты **не индуцируют** программированную клеточную гибель посредством активации CD95 сигнального пути, т.к. липосомы защищают препарат от контакта с поверхностной клеточной мембраной. Для проверки этой гипотезы мы сравнили цитотоксическое действие двух лекарственных форм аранозы – лиофилизата для приготовления р-ра для инъекций (араноза-лио) и липосомальной – на клетки меланомы линии *Mel Mtp*, не имеющей CD95 рецептор, и *Mel Kor*, *Mel Ibr* и *Mel Z*, экспрессирующие рецептор. Эти линии клеток диссеминированной меланомы кожи человека были получены в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН [15; 30]. Лекарственные формы аранозы произведены в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН [11; 12]. Араноза – отечественный препарат из класса нитрозометилмочевины, разрешенный для клинического применения при меланоме кожи человека [3; 18; 19].

Целью данной работы было сравнение в МТТ-тесте цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы – лиофилизата для приготовления раствора для инъекций (аранозы-лио) и липосомальной формы на клеточных линиях меланомы человека, экспрессирующих и не экспрессирующих CD95/Fas-рецептор.

Материалы и методы

Исследование проводили с помощью МТТ-теста на 4 клеточных линиях диссеминированной меланомы человека: *Mel Mtp*, *Mel Kor*, *Mel Ibr* и *Mel Z*, полученных из банка клеточных культур ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН.

Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ТЭС, 10мМ НЕРЕС (Sigma, США), 2мМ L-глутамина (Sigma, США), 40 нг/мл гентамицина (ICN, США), аминокислоты и витамины (ПанЭко, Россия) при 37 °С в атмосфере 5 %-ного CO₂.

Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня. Для открепления клеток с пластика использовали р-р Версена. Клетки отмывались чистой бесывороточной средой RPMI-1640 и пересаживались в 96-луночные плоскодонные планшеты (Corstar, USA) по 4×10³ клеток в 180 мкл полной среды RPMI-1640 на лунку.

Для оценки цитотоксического действия аранозы в каждую лунку добавляли по 20 мкл исследуемой лекарственной формы, и инкубировали с клетками в течение 24; 48 и 72 ч в 5 %-ном CO₂-инкубаторе при 37 °С.

Обе лекарственные формы аранозы (лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и липосомальную) исследовали в концентрациях 0,056 мг/мл; 0,112 мг/мл; 0,225 мг/мл; 0,45 мг/мл; 0,9 мг/мл; 1,8 мг/мл, каждую концентрацию ставили в триplete.

В контрольные лунки с клетками добавляли по 20 мкл полной среды или же по 20 мкл пустых липосом, разведенных полной средой, в тех же количествах, которые использовались для получения исследуемых концентраций липосомальной формы аранозы.

Через 24; 48 и 72 ч в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ [3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5 дифенилтетразолий бромид] (маточный раствор 5мг/мл, конечная концентрация 1мг/мл), и инкубировали 4 ч при 37 °С в 5 %-ном CO₂-инкубаторе.

После образования формазана надосадочную жидкость удаляли. Осадок растворяли, добавляя в лунки по 200 мкл ДМСО.

Планшеты помещали на 5–7 мин в термостат при температуре 37°C, после чего встряхивали на шейкере в течение 10 мин. Затем измеряли интенсивность окрашивания среды на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций «АИФР-01 Униплан» (ЗАО «Пикон») при λ=530 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток. Выживаемость клеток рассчитывалась по формуле:

$$\text{Выживаемость}(\%) = \frac{\text{Оптическая плотность} \cdot \text{клеток} \cdot \text{в опыте}}{\text{Оптическая плотность} \cdot \text{контрольных} \cdot \text{клеток}} \times 100\%$$

Каждый эксперимент повторяли не менее, чем 3 раза.

Результаты

При сравнении цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы лиофилизированной и липосомальной на клетки меланомы линии *Mel Mtp* было обнаружено, что через 8 ч инкубации цитотоксическое действие аранозы существенным образом не проявлялось, и ИК₅₀ не была достигнута. Небольшое уменьшение процента живых клеток не

отличалось от контроля (рис. 1А). После инкубации в течение 24 ч липосомальная араноза вызывала гибель клеток *Mel Mtp* дозозависимым образом (рис. 1Б). ИК₅₀ липосомальной аранозы составила 0,45 мг/мл, аранозы-лио – более 0,9 мг/мл. Эти различия статистически значимы (p≤0,05). Различия в цитотоксическом действии препаратов стираются при инкубации клеток *Mel Mtp* с препаратами в течение 48 и 72 ч (p≤0,05) (рис. 1В-Г).

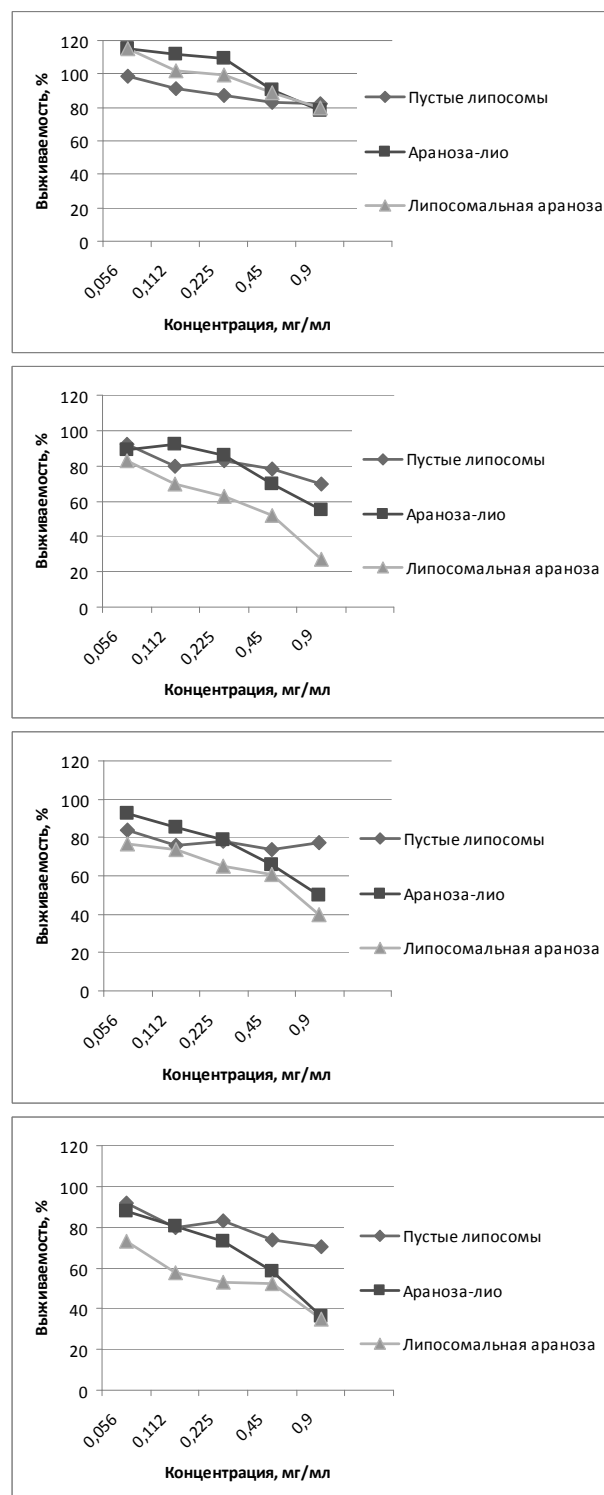


Рис. 1. Цитотоксическое действие лекарственных форм аранозы на клетки линии *Mel Mtp*:

А: 8 ч инкубации; Б: 24 ч инкубации;
В: 48 ч инкубации; Г: 72 ч инкубации.

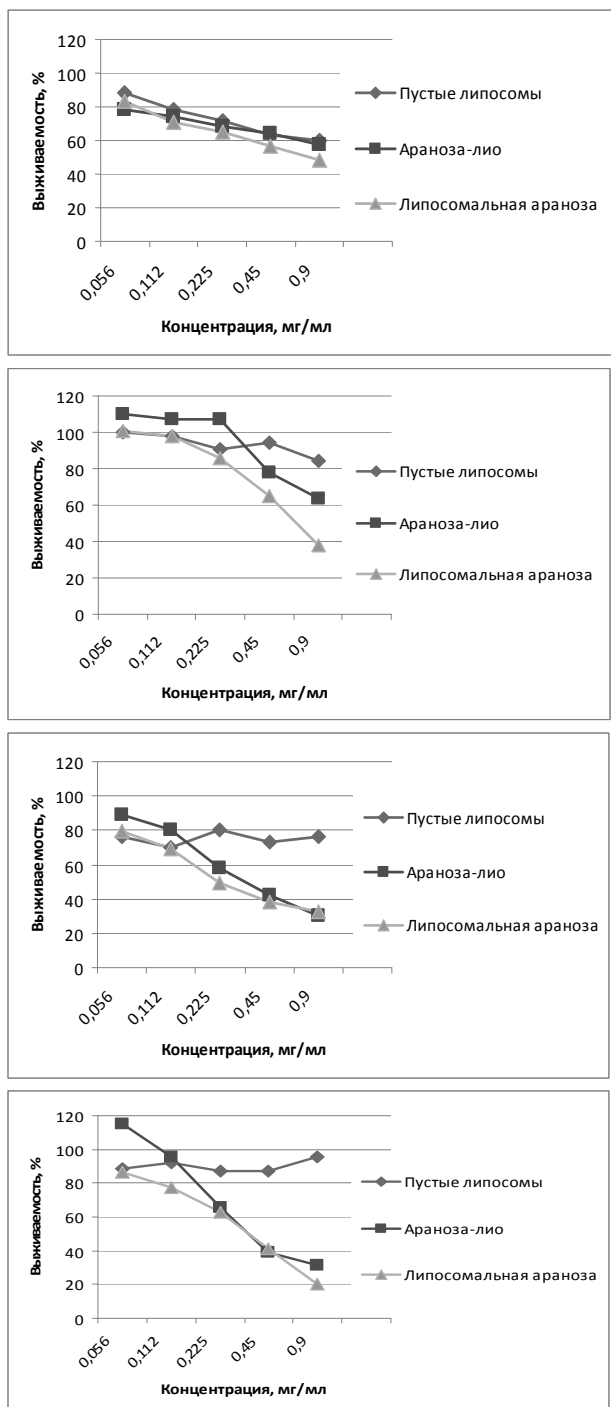


Рис. 2. Цитотоксическое действие лекарственных форм аранозы на клетки линии *Mel Ibr*:

А: 8 ч инкубации;
Б: 24 ч инкубации;
В: 48 ч инкубации;
Г: 72 ч инкубации.

Иные результаты получили при исследовании цитотоксического действия препаратов на меланомных клетках *Mel Ibr*, *Mel Kor* и *Mel Z*, экспрессирующих CD95-рецептор (рис. 2–4).

На клетках *Mel Ibr* липосомальная араноза при инкубации в течение 8 ч показала те же результаты что и лиофилизированный препарат, а также пустые липосомы (рис. 2А). После 24 ч инкубации липосомальная араноза была более эффективна, чем

лиофилизированная ($p \leq 0,05$; рис. 2Б). Спустя 48 и 72 ч результаты были идентичны ($p \leq 0,05$; рис. 2В–Г).

На клетках *Mel Z* через 8 ч араноза-лио была более эффективна, чем липосомальная ($p \leq 0,05$; рис. 3А). Однако, через 24 ч, наоборот, липосомальная араноза была более цитотоксична ($p \leq 0,05$) (рис. 3, Б). Затем эффективность обоих препаратов была сравнима ($p \leq 0,05$) (рис. 3, В и Г).

На клетках линии *Mel Kor* после 8 ч инкубации араноза-лио была более эффективна по сравнению с липосомальной ($p \leq 0,05$). В последующем цитотоксическое действие обоих препаратов было одинаковым ($p \leq 0,05$) (рис. 4).

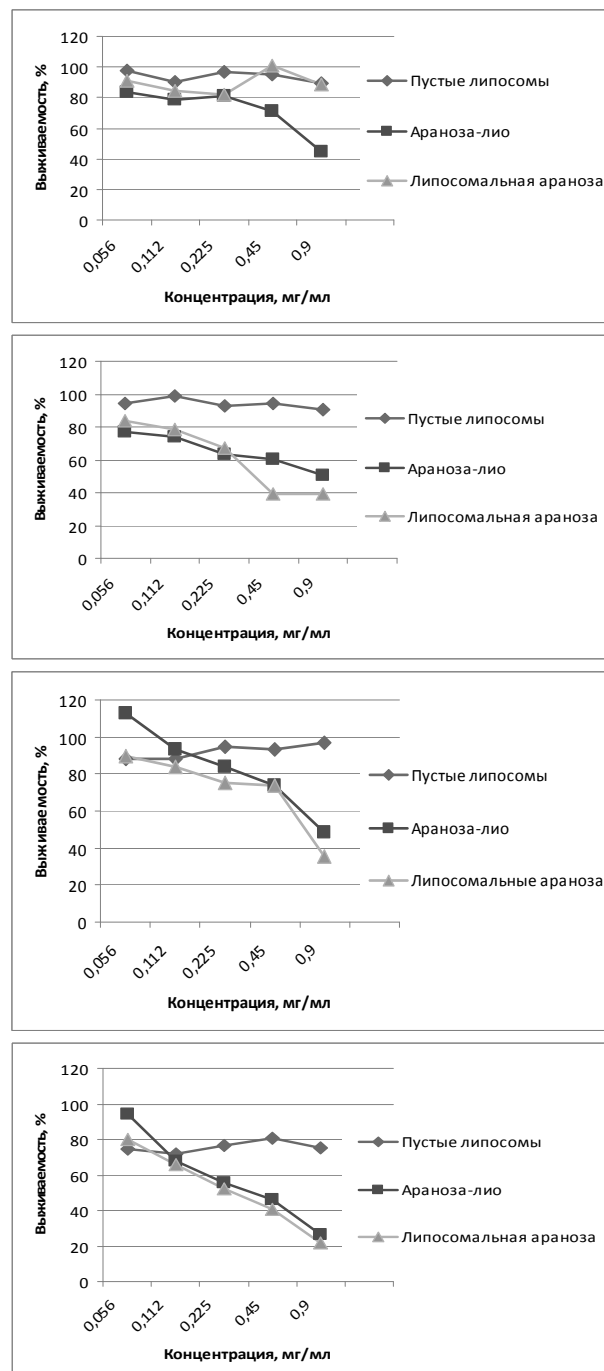
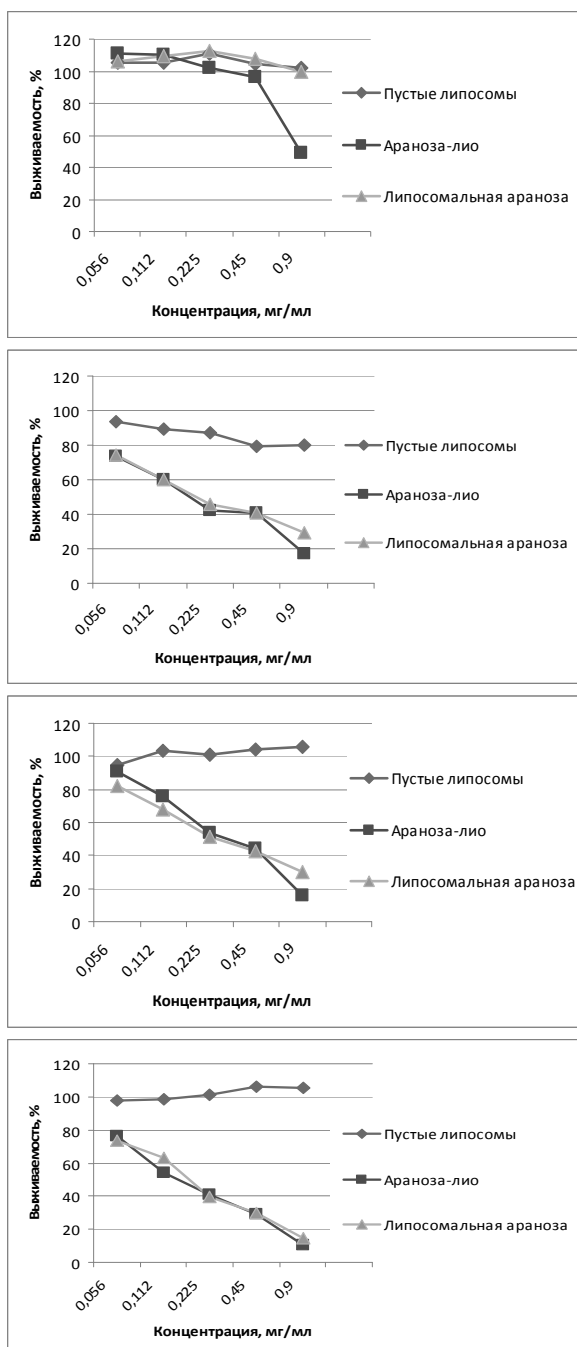


Рис. 3. Цитотоксическое действие лекарственных форм аранозы на клетки линии *Mel Z*:

А: 8 ч инкубации; Б: 24 ч инкубации;
В: 48 ч инкубации; Г: 72 ч инкубации.



Заключение

Таким образом, результаты проведенного эксперимента подтвердили нашу гипотезу о том, что CD95-сигнальный путь апоптоза не вовлечен в механизм действия липосомальных препаратов и показали, что действительно CD95-отрицательные клетки меланомы линии *Mel Mip* резистентны к цитотоксическому действию аранозы-лио, но чувствительны к липосомальной аранозе. Это можно объяснить тем, что липосомы попадают в клетку путем эндоцитоза и не взаимодействуют с CD95-рецептором [6].

Феномен устойчивости клеток меланомы линии *Mel Mip* к CD95-зависимому апоптозу впервые был обнаружен Бигвава и др. [7]. При этом клетки *Mel Mip* были чувствительны к апоптозу, индуцированному через TNF-рецептор. Ранее А. Соколовская и др. показали, что клетки лимфобластного лейкоза сублинии Jurkat/A, утратившие CD95-рецептор, устойчивы к цитотоксическому действию доксорубина, тогда как родительские клетки линии Jurkat – чувствительны [8]. Эту сублинию клеток получили длительным культивированием клеток линии Jurkat в присутствии МКА IPO-4 против антигена CD95 [32].

Различия в цитотоксическом действии препаратов стираются при инкубации клеток *Mel Mip* с препаратами в течение 48 и 72 ч. В этом нет ничего удивительного, т.к. при длительной инкубации препараты все равно попадают в клетку и оказывают свое токсическое действие. Неизвестно, какой механизм апоптоза индуцируют липосомальные препараты. Это предстоит выяснить, изучив активацию каспаз.

Рис. 4. Цитотоксическое действие лекарственных форм аранозы на клетки линии *Mel K01*:
А: 8 ч инкубации; Б: 24 ч инкубации;
В: 48 ч инкубации; Г: 72 ч инкубации.

Литература

1. Альбассит Б., Барышникова М.А., Игнатъева Е.В. и др. Разработка липосомальной лекарственной формы нового соединения из класса нитрозоалкилмочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 5.
2. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российский онкологический журнал. – 1996. – №1. – С. 58.
3. Барышников А.Ю., Оборотова Н.А., Герасимова Г.К., Кубасова И.Ю. Противоопухолевые препараты, разработанные в Российском онкологическом научном центре им.Н.Н. Блохина РАМН // Вестник Московского общества онкологов. – 2004. – № 11. – С. 3–4.
4. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–32.
5. Барышников А.Ю., Барышникова М.А. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева. – 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
6. Барышникова М.А., Зангиева М., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных капсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–5
7. Бигвава Х.Ф. Экспрессия маркеров апоптоза – CD95, Bcl-2, Вах на клеточных линиях меланом // Российский алергологический журнал. – 2012. – № 1, Вып.1 – С. 53–4.

8. Блохин Д.Ю., Соколовская А.А., Власенкова Н.К. и др. Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток, резистентных к апоптозу // Вестник РАМН. – 2007. – №10. – С. 41–6.
9. Гуревич Д.Г., Меерович И.Г., Меерович Г.А. и др. Влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления тиосенса в опухоли // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т.6, №2. – С.45–9.
10. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В., Бунамян Н.Д. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 21–7.
11. Казеев С.Г., Барышников М.А., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной лекарственной формы аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т.11, №2. – С. 24.
12. Казеев С.Г., Барышников М.А., Афанасьева Д.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т.11, №2. – С. 24.
13. Ланцова А.В., Барышников М.А., Санарова Е.В. и др. Изучение в системе *in vitro* наноструктурированной лекарственной формы лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 31.
14. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – № 4. – С. 3–8.
15. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник РАМН. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
16. Михайлова Т.В., Барышников М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
17. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
18. Оборотова Н.А. Основные проблемы создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 2. – С. 27–31.
19. Оборотова Н.А., Лопатин П.В. 30 лет лаборатории разработки лекарственных форм ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, №4. – С. 3–7.
20. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
21. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Макарова О.А. и др. Доклиническое изучение липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т.2, № 4. – С. 40–5.
22. Смирнова З.С., Оборотова Н.А., Макарова О.А. и др. Эффективность и фармакокинетика липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора «Фотосенс» на основе сульфоталлоцианина алюминия // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39, № 7. – С. 3–7.
23. Тазина Е.В., Оборотова Н.А. Селективная доставка препаратов в опухоль с помощью термочувствительных липосом и локальной гипертермии. // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. –12.
24. Тазина Е.В., Мещерякова В.В., Игнатъева Е.В. и др. Биофармацевтические исследования термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубина // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 40–7.
25. Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 54–61.
26. Шоуа И.Б., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Действие липосомального доксорубина на клетки линии, экспрессирующие активный pgp170 // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 20–3.
27. Baryshnikov A.Yu., Polosukhina E.R., Tupitsin N.N. et al. CD95 (Fas/APO-1) antigen is a new prognostic marker of blast cells of acute lymphoblastic leukaemia patients / Book Editor(s): Kaspers, GJL; Pieters, R; Veerman, AJP. Drug resistance in leukemia and lymphoma III Book Series: Advances in experimental medicine and biology. – 1999. – 457. – P. 251–8.
28. Galluzzi L., Vitale I., Abrams J.M. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 // Cell Death and Differentiation. – 2012. – 19. – P. 107–20.
29. Krammer P.H., Dhein J., Walczak H. et al. The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system // Immunol. Rev. – 1994. – 142. – P. 175–91.
30. Michailova I.N., Morozova L.Ph., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // Melanoma Research. – 2008. – №5. – P. 303–13.
31. Orrenius S., Nicotera P., Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology // Toxicological Sciences. – 2011. – 119. – P. 3–19.
32. Polosukhina E.R., Zabolina T.N., Shishkin Yu.V. et al. Studing of Fas(APO-1/CD95) antigen expression by flow cytometry with monoclonal antibodies IPO-4 // Experimental Experimental Oncology. – 1997. – 19(3). – P. 206–11.
33. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Yu. et al. CD95-deficient cells of Jurkat/A4 subline are resistant to drug-induced apoptosis // Experimental Oncology. – 2001. – 23. – P. 175–81.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ИК₅₀

– ингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50% клеток

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УДК 547.227:615.277.2.012.1:616-092.9

Г.К. Герасимова¹, Н.П. Маркова¹, И.С. Голубева¹, Г.Н. Апрышко¹, Ю.Ю. Солодунов², Б.В. Страдомский²**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА СТЕЛЛАНИН® НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ**¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва²ООО «Фармпрепарат», Ростов-на-Дону**Контактная информация**

Маркова Надя Петровна, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей

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

e-mail: baryshnikov_anat@mail.ru

Статья поступила 06.05.2013, принята к печати 27.01.2014.

Резюме

Изучена противоопухолевая активность препарата Стелланин® в лекарственной форме «капли для приема внутрь», его активной субстанции ДЭБИ-Т и метаболита ДЭБИ-М на мышинных перевиваемых опухолях: лимфоцитарном лейкозе Р388, меланоме В16 и раке толстой кишки АКАТОЛ. Субстанции ДЭБИ-Т и ДЭБИ-М не проявили противоопухолевого эффекта на лейкозе мышей Р388. Стелланин® в лекарственной форме и в виде субстанции при пероральном применении у мышей с меланомой В16 и раком толстой кишки АКАТОЛ проявил зависимый от дозы стабильный противоопухолевый эффект (70–50 % ТРО) в течение двух недель после окончания лечения. Установлены оптимальные режимы применения Стелланина® при пероральном введении: при разовых дозах 15–30 мг/кг 2–3 раза в сутки в течение 10 дней или в дозе 10 мг/кг один раз в сутки в течение 20 дней. У ДЭБИ-М в исследованном диапазоне доз не выявлено противоопухолевой активности.

Ключевые слова: Стелланин®, 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид, 1,3-диэтилбензимидазолия монойодид, противоопухолевая активность *in vivo*, мышинные опухоли.

G.K. Gerasimova¹, N.P. Markova¹, I.S. Golubeva¹, G.N. Apryshko¹, Yu.Yu. Solodunov², B.V. Stradomskiy²**ANTITUMOR ACTIVITY OF THE DRUG STELLANIN® ON TRANSPLANTABLE MICE TUMORS**¹FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow²«Pharmpreparat», Rostov-on-Don**Abstract**

Antineoplastic activity of Stellanin® as drug “drops for per os intake”, its active substance 1,3-diethylbenzimidazolium triiodide and its methabolite 1,3-diethylbenzimidazolium moniodide was studied on mouse transplantable tumors: lymphocytic leukemia P388, melanoma B16 and colon cancer AKATOL. Substances 1,3-diethylbenzimidazolium triiodide and its methabolite 1,3-diethylbenzimidazolium moniodide didn't reveal antineoplastic effect on mouse leukemia P388. Stellanin® both as drug and as substance administered per os to mice with melanoma B16 and colon cancer AKATOL showed dose-dependent stable antitumor effect (70-50% tumor growth inhibition) during 2 weeks after treatment completion. The optimal schedules of Stellanin® treatment were determined: single dose of 15-30 mg/kg 2-3 times a day during 10 days or dose of 10 mg/kg one time a day during 20 days. 1,3-diethylbenzimidazolium moniodide with explored dose range didn't show any antineoplastic activity.

Key words: Stellanin®, 1,3-diethylbenzimidazolium triiodide, 1,3-diethylbenzimidazolium moniodide, antitumor activity *in vivo*, mice tumors.

Введение

Несмотря на большое количество противоопухолевых препаратов разных классов, постоянно идет поиск новых веществ с противоопухолевой активностью и совершенствование лекарственной формы уже известных хорошо зарекомендовавших себя лекарственных средств [1; 2; 4; 9–19; 21; 25; 26].

В настоящее время, по данным базы *Thomson Reuters Integrity*, на экспериментальных и клинических исследованиях в разных странах находится около 20 йодсодержащих противоопухолевых препаратов, из которых два (йодсодержащий аналог адриамицина и производное аденозина RPR-113090) проходят II фазу клинического изучения [27].

В России фирмой «Фармпрепарат» разработан и разрешен для практического применения йодсодержащий антибактериальный препарат СТ.

Активным веществом СТ является комплексное гетероциклическое йодсодержащее соединение – ДЭБИ-Т. Компоненты препарата образуют прочный комплекс – молекулу СТ, из которой происходит постепенное медленное высвобождение молекулярного йода [20]. Вследствие этого вещество является нетоксичным: ЛД₅₀ для крыс составляет более 10000 мг/кг [8]. К особенностям СТ следует отнести тот факт, что это комплексное соединение объединяет в себе биологическую активность молекулярного йода и органической составляющей – катиона 1,3-диэтилбензимидазолия. В отличие от изучаемых за рубежом препаратов, йод в структуре молекулы СТ присоединен ионной связью, а не ковалентно, что обуславливает особенности его физико-химических свойств и, как следствие, биологических и фармакологических эффектов. СТ обладает широким спектром местной и системной антибактериальной ак-

тивности, противовоспалительным и регенерирующим действием [20].

В водных безбелковых растворах происходит гидролиз ДЭБИ-Т, и через 30 мин его концентрация снижается на 50 % вследствие образования ДЭБИ-М, а в присутствии белков процесс гидролиза значительно ускоряется. Таким образом, ДЭБИ-М является метаболитом ДЭБИ-Т. Как показали экспериментальные исследования, ДЭБИ-М обладает собственной фармакологической активностью.

Недавно показано, что СТ обладает цитотоксической активностью в отношении двух клеточных культур солидных опухолей человека: рака толстой кишки линии LS174T ($IC_{50} = 25$ мкМ) и гормоннезависимого рака предстательной железы линии DU145 ($IC_{50} = 330$ мкМ) [3].

Цитотоксическая активность ДЭБИ-М была оценена на трех видах клеточных культур солидных опухолей человека: карциноме толстой кишки линии LS174T, раке предстательной железы линии DU145 и немелкоклеточном раке легкого линии A549. К ДЭБИ-М умеренно чувствительными оказались только клетки рака толстой кишки линии LS174T ($IC_{50} = 330$ мкМ). Клетки линий DU145 и A549 к ДЭБИ-М не чувствительны [3].

Исследования молекулярного механизма действия ДЭБИ-М показали, что он в высоких концентрациях вызывает значимое увеличение экспрессии митохондриальной ДНК и гибель клеток по митохондриальному пути апоптоза [5; 6].

В настоящее время доказано, что стимуляция функциональной активности митохондрий, находящихся во многих опухолевых клетках в неактивном состоянии, приводит к апоптозу и гибели раковых клеток [24].

Анализ выявленных разных видов фармакологической активности СТ и, особенно, его цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток человека *in vitro* дают основание для изучения его противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях животных.

Цель настоящего исследования – сравнительная оценка противоопухолевого действия СТ, ДЭБИ-Т и его метаболита ДЭБИ-М на перевиваемых на мышах моделях опухолевого роста: лейкозе Р388 и двух штаммах солидных опухолей (меланоме В16 и раке толстой кишки АКАТОЛ).

Материалы и методы

Исследования выполнены в соответствии с нормативными документами по стандартным методикам [22] на мышинных перевиваемых моделях опухолевого роста: асцитной форме лимфоцитарного лейкоза Р388 и солидных опухолях меланоме В16 и аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ [7].

Использованы мыши гибриды первого поколения BDF1 (C57Bl/6 x DBA2) (самки) и мыши линии Balb/C (самки) в возрасте 1,5–2 мес с начальной массой тела 19–23 г. Мышей содержали в виварии отдела лабораторных животных ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН в соответствии с санитарными правилами содержания лабораторных животных на брикетированном корме и при постоянном доступе к воде, в помещении с дневным освещением и контролируемой температурой и влажностью воздуха.

Число животных в контрольной группе составляло 12 мышей, в опытных группах по 6–7 мышей. Наблюдение за животными продолжалось до их гибели.

Штаммы перевиваемых опухолей получены из банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН и поддерживались *in vivo* на линейных животных. В опытах использовались 2–10 пассажи. Опухоли перевивали лабораторным животным по стандартным методикам [23].

Препарат СТ (ДЭБИ-Т в комплексе с ПВП) в виде готового лекарственного средства «Стеллантин®» капли для местного применения и приема внутрь 40 мг/мл и субстанции ДЭБИ-Т (в комплексе с ПВП) в виде порошка, а также субстанция ДЭБИ-М в виде порошка получены от ООО «Фарм-препарат».

Водные растворы ДЭБИ-Т и ДЭБИ-М готовили *ex tempore* и вводили мышам *per os* с помощью зонда. Лечение начинали через 24 ч после внутрибрюшинной прививки лейкоза Р388 и через 48 ч после подкожной прививки солидных опухолей В16 и АКАТОЛ.

Мышам с лимфолейкозом Р388 и меланомой В16 ДЭБИ-Т и ДЭБИ-М вводили *per os* в режиме однократного или трехкратного введения в сутки с интервалом 3 ч между введениями. Курс лечения 10 дней. При лечении мышей с лимфолейкозом Р388 вводили животным субстанцию СТ (ДЭБИ-Т) в виде сухого порошка, при лечении меланомы В16 в зарегистрированной лекарственной форме – капли для приема внутрь (40 мг/мл).

На перевиваемой модели рака толстой кишки АКАТОЛ лечение СТ в виде готовой лекарственной формы (капли 40 мг/мл) проводили в нескольких режимах: 3 р в сутки с интервалом 3 ч между введениями в дозах 5; 10 и 20 мг/кг и в режиме 2 р в сутки с интервалом 6 ч между введениями в дозах 7,5; 15 и 30 мг/кг ДЭБИ-Т. Курс лечения 10 дней. Кроме того, СТ вводили в дозе 10 мг/кг 1 раз в сутки в течение 10 дней, а также 2 и 10 мг/кг с интервалом 24 часа между введениями в течение 20 дней. Мыши контрольных групп не получали лечения.

Оценка результатов лечения проведена по показателям ТРО и УПЖ [22].

ТРО вычислялось по формуле:

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

V_k и V_o – средний объем опухолей (мм^3) в контрольной и опытной группах, который для каждой солидной опухоли определялся как произведение размеров трех перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Измерение объема опухоли проводили на разные сроки после окончания лечения.

УПЖ, % леченых животных по сравнению с контролем вычисляли по формуле:

$$UPJ, \% = \frac{(СПЖ_o - СПЖ_k)}{СПЖ_k} \times 100\%, \text{ где}$$

СПЖ_о и СПЖ_к – средняя продолжительность жизни (сутки) в опытных и контрольных группах животных.

Показатели эффективности изучаемых препаратов определяли в сравнении с контрольными группами. Активными в противоопухолевом отношении считали дозы препаратов, вызывающие ТРО ≥ 70 –50% не менее 10 дней после окончания лечения или УПЖ животных ≥ 25 %. Токсичность изученных режимов и доз препаратов оценивали по

срокам гибели леченных животных в сравнении с гибелью животных в контрольной группе. Для выполнения экспериментов составляли группы численностью, достаточной для проведения статистического анализа и расчета показателей достоверности. Для всех количественных данных вычислено групповое среднее арифметическое (М) и стандартную ошибку среднего (m, SEM). Различия между контрольными и опытными группами считали достоверными при 95 %-ном уровне значимости ($p \leq 0,05$.) Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы Statistica.

Результаты

Результаты оценки противоопухолевой активности субстанций ДЭБИ-Т и ДЭБИ-М на лимфолейкозе Р388 представлены в табл. 1. Из приведенных данных видно, что продолжительность жизни леченых животных не отличается от продолжительности жизни животных контрольной группы. Таким образом, обе тестируемые субстанции в исследованном диапазоне доз не оказывают лечебного эффекта на развитие лимфолейкоза Р388.

Противоопухолевая активность СТ в отношении перевиваемой опухоли мышей меланомы В16 исследована в широком диапазоне доз и при разных режимах применения. Результаты представлены в табл. 2 и 3. В табл. 2 представлены данные по применению препаратов в следующих дозах: СТ – 0,2 мг/кг, ДЭБИ-М – 1 и 5 мг/кг в режиме 3 раза в сутки. В таких дозах оба вещества не проявили противоопухолевого эффекта ни по одному из оцениваемых показателей (ТРО < 70%, УПЖ < 25%).

Применение СТ в более высоких дозах (2; 5 и 10 мг/кг) в течение 10 дней в двух режимах (одноразового и трехразового в сутки) показало, что непосредственно после окончания лечения наблюдается зависимое от дозы и режима лечения достоверное торможение роста опухоли по сравнению с контрольной группой животных (табл. 3). Максимальный эффект (ТРО 80% непосредственно после окончания лечения) получен при дозе СТ 10 мг/кг при ежедневном трехразовом в течение 10 дней пероральном введении мышам и достоверное сохранение ТРО > 50% в течение 10 дней. На 13 сутки после окончания лечения различия с контрольной группой достоверны.

Зависимость противоопухолевого эффекта СТ от дозы и режима его применения изучена также на модели опухолевого роста – рак толстой кишки мышей штамм АКАТОЛ. Исследованы режимы перорального ежедневного применения препарата однократно, двукратно и трехкратно в течение 10 или 20 дней.

Результаты противоопухолевой активности СТ на модели АКАТОЛ представлены в табл. 4 и свидетельствуют о том, что СТ в разовых дозах 15 и 30 мг/кг (суммарная суточная доза 30 и 60 мг/кг) вызывает умеренное торможение роста опухоли непосредственно после окончания лечения на 61 и 70 %, которое сохраняется до 12 дня на уровне 50–52 % ТРО, соответственно.

Такой же непосредственный эффект после окончания лечения наблюдается при действии СТ в дозе 10 мг/кг однократно в сутки, но при применении препарата в течение 20 дней.

Средняя продолжительность жизни животных составляет 72 дня, т.е. такая же, как при дозе 30 мг/кг×2 раза в сутки с интервалом между введениями 6 ч в течение 10 дней.

Анализ результатов противоопухолевой активности СТ в отношении перевиваемых солидных моделей опухолевого роста мышей выявляет зависимое от дозы и режима лечения умеренное торможение роста опухолей по сравнению с контрольной группой животных.

Максимальный эффект получен на мышах с меланомой В16 при дозе 10 мг/кг при ежедневном трехразовом введении препарата в течение 10 дней. Отмечено NHJ 80 % непосредственно после окончания лечения с сохранением эффекта более 50 % в течение 13 дней (табл. 3).

Таким образом, на двух солидных опухолях – меланоме В16 и раке толстой кишки АКАТОЛ при пероральном применении СТ выявлен стабильный противоопухолевый эффект (70–50% ТРО) в течение 2 недель после окончания лечения при разовых дозах 15–30 мг/кг в режиме двукратного или трехкратного введения в сутки в течение 10 дней или однократно в дозе 10 мг/кг, но при более длительном курсе применения (20 дней).

Метаболит СТ ДЭБИ-М в исследованном диапазоне доз не проявил противоопухолевого действия на лимфоцитарном лейкозе Р388 и меланоме В16. Лейкоз Р388 также не чувствителен к СТ.

СТ во всех исследованных дозах и режимах применения не стимулировал рост опухолей и не обладал токсичностью: гибели леченых животных ранее контрольных отмечено не было.

Обсуждение

Препарат СТ (1,3-диэтилбензимидазолия трийодид в комплексе с медицинским поливинилпирролидоном низкомолекулярным) – оригинальная, зарегистрированная в РФ активная фармацевтическая субстанция, разработан ООО «Фармпрепарат» и разрешен для практического применения в лекарственной форме «капли для местного применения и приема внутрь 40 мг/мл.

СТ прошел полное экспериментальное доклиническое изучение безопасности и фармакологической активности, клинические испытания и разрешен для практического применения в качестве противомикробного лекарственного средства.

Действующим началом препарата является комплексное гетероциклическое йодсодержащее соединение 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид. В структуре СТ йод находится отчасти в молекулярном виде, отчасти в ионной форме: молекулярный йод (I_2) связан с анионом йода (I^-) и через него координационно с катионом 1,3-диэтилбензимидазолия [8].

Таким образом, в молекуле ДЭБИ-Т присутствует молекулярный йод, но он более защищен в организме, чем просто чистый молекулярный йод, и может перемещаться в крови до клеток-мишеней без преждевременного восстановления.

Препарат при незначительной токсичности ($LD_{50} > 10000$ мг/кг при пероральном введении крысам) обладает широким спектром антибактериальной и противогрибковой активности, а также выраженным противовоспалительным и регенерационным действием.

Если антимикробное действие СТ связывают с молекулярным (активным) йодом, медленно высвобождающимся из молекулы ДЭБИ-Т, то механизм цитотоксического действия пока точно не известен. ДЭБИ-М не обладает антимикробным эффектом, однако проявил умеренную цитотоксическую активность в отношении клеток рака толстой кишки человека [3].

Таблица 1

Противоопухолевая активность Стелланина® (ДЭБИ-Т) и ДЭБИ-М при пероральном введении на модели лимфолейкоза Р 388

Субстанция	Разовая доза, мг/кг	Курсовая доза, мг/кг	ПЖ, сутки	СПЖ, сутки	УПЖ, %
Стелланин® (ДЭБИ-Т)	5	150	9–12	10,86	10,5
	10	300	9–15	11,00	11,9
	20	600	10–16	11,71	19,0
ДЭБИ-М	10	300	9–11	10,14	3,2
	50	1500	9–15	10,83	10,2
Контроль	0	0	9–11	9,83	

Режим лечения: 3 раза в сутки с интервалом 3 часа в течение 10 дней.

Число мышей: в контрольной группе – 12; в опытной группе – 7.

Таблица 2

Противоопухолевая активность Стелланина® (ДЭБИ-Т) и ДЭБИ-М при пероральном введении мышам с меланомой В16

НОМЕР БИО									
Субстанция	Разовая доза, мг/кг	Курсовая доза, мг/кг	ТРО, %				ПЖ, сутки	СПЖ, сутки	УПЖ, %
			сутки после окончания лечения						
			1	8	12	16			
ДЭБИ-Т	0,2	6	22	23	10	33	21–37	26,3	12
ДЭБИ-М	1	30	35	38	27	45	19–29	24,6	5
	5	150	28	40	56	53	17–28	22,6	–4
Контроль	0	0	–	–	–	–	18–28	23,5	–

Режим лечения: 3 раза в сутки с интервалом 3 часа в течение 10 дней.

Число мышей в контрольной группе – 12; в опытной группе – 7.

Различия с контрольной группой недостоверны ($p > 0,05$).

Таблица 3

Противоопухолевая активность Стелланина® при пероральном введении мышам в течение 10 дней на модели меланомы В16

Меланхома D16									
Режим лечения	Разовая доза, мг/кг	Курсовая доза, мг/кг	ТРО, %				ПЖ, дни	СПЖ, дни	УПЖ, %
			Сутки после окончания лечения						
			2	6	10	13			
1	2	20	50	36	41	42*	21-36	29	17
1	5	50	48	42	39	39*	22-31	25,2	2
1	10	100	63	49	57	51	20-34	27,5	11
2	2	60	61	52	43	48*	17-38	26,8	9
2	5	150	61	34	45	40*	20-34	27,8	13
2	10	300	80	67	66	58	20-34	28,5	15
Контроль	0	0	—	—	—	—	20-40	25,6	—

Число мышей в контрольной группе – 12; в опытной группе – 6.

Лечение проводили в течение 10 дней в двух режимах:

1) три раза в сутки с интервалом 3 часа ежедневно в разовых дозах 2 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг;

2) один раз в сутки в тех же дозах.

*различия с контролем недостоверны ($p > 0,05$)

Это дает основание для предположения, что механизм цитотоксичности СТ более сложный, чем прямое действие молекулярного йода.

Проведенные исследования эффективности СТ и его метаболита в режиме ежедневного трехразового перорального введения в течение 10 дней показали, что как ДЭБИ-Т, так и ДЭБИ-М не влияют на рост лейкоза Р388.

Субстанция ДЭБИ-М оказалась также не эффективна на солидной опухоли мышей меланоме В16.

В то же время, препарат СТ проявил на солидных опухолях меланоме В16 и раке толстой кишки АКАТОЛ зависимый от дозы стабильный противоопухолевый эффект (70–50% ТРО) в течение двух недель после окончания лечения.

Таблица 4

Противоопухолевая активность Стелланина® при пероральном введении мышам с опухолью АКАТОЛ

Режим	РД, мг/кг, (СД, мг/кг)	КД, мг/кг	ТРО %				ПЖ, с	СПЖ, с	УПЖ, %
			дни после окончания лечения						
			1	8	12-13	15-16			
			1	8	12-13	15-16			
1	10 (10)	100	(47)	(33)	(34)	(25)*	43–100	68	6*
2	7,5 (15)	150	(56)	(36)	(38)	(32)	56–84	69	8*
2	15 (30)	300	(70)	(53)	(50)	(42)	44–92	56,2	–12*
2	30 (60)	600	(61)	(58)	(52)	(38)	37–99	72,9	14*
3	5 (15)	150	(50)	(59)	(52)	(35)	67–106	78,1	2*
3	10 (30)	300	(36)	(36)*	(24)*	(25)*	33–90	67,3	–12*
3	20 (60)	600	(42)	(40)	(36)	(3)*	9–142	81	5,7*
4	2 (2)	40	(52)	(34)	(40)	(31)	50–107	66,6	4,3*
4	10 (10)	200	(64)	(47)	(44)	(26)*	46–100	72	13*
Контроль	–	–	–	–	–	–	44–92 29–101	76,6 64	–

Количество мышей в контрольной группе – 12+12; в опытной группе – 7.

Режимы лечения:

1) 1 раз в сут в течение 10 дн; 2) 2 раза в сут с интервалом 6 ч в течение 10 дн;

3) 3 раза в сут с интервалом 3 ч в течение 10 дн; 4) 1 раз в сут в течение 20 дн.

*различия с контролем недостоверны ($p>0,05$).

Установлены оптимальные режимы применения препарата при пероральном применении: при разовых дозах 15–30 мг/кг 2–3 раза в сутки в течение 10 дней или однократно в дозе 10 мг/кг, но при более длительном курсе (20 дней), т.е. противоопухолевый эффект СТ реализуется при длительных курсах его перорального применения. СТ во всех исследованных дозах и режимах применения не стимулировал рост опухолей и не обладал токсичностью: гибели леченых животных ранее контрольных отмечено не было.

Таким образом, препарат СТ в лекарственной форме «капли для приема внутрь» по результатам изучения цитотоксической активности в отношении клеточных культур опухолей человека [1] и противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях мышей, а также в связи с новым механизмом его противоопухолевого действия (активация митохондрий в раковых клетках) [2], можно рекомендовать для проведения клинического изучения его противоопухолевой эффективности у больных раком желудка и раком предстательной железы с исчерпанными возможностями специфического лечения. Целесообразность изучения фармакологической активности СТ при раке желудка определяется обеспечением максимальной биодоступности препарата к опухоли при зарегистрированном пероральном способе его применения.

Литература

1. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – №3. – С. 23–30.
2. Барышников А.Ю., Барышникова М.А. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева 2012. – Т. LVI. – № 3–4. – С. 60–7.
3. Герасимова Г.К., Жукова О.С., Фетисова Л.В. и др. Цитотоксическая активность препарата Стелланин® на опухолевых клетках человека in vitro // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, №1. – С. 51–4.
4. Гуревич Д.Г., И.Г. Меерович И.Г., Г.А. Меерович Г.А. и др. Влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления тиосенса в опухоли // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 45–9.

Выводы

1. Препарат СТ (ДЭБИ-Т) в лекарственной форме «капли для приема внутрь и местного применения» проявил при пероральном применении у мышей с перевиваемыми солидными опухолями меланомой В16 и раком толстой кишки АКАТОЛ зависимый от дозы стабильный противоопухолевый эффект (70–50% ТРО) в течение двух недель после окончания лечения.
2. Установлены оптимальные режимы применения СТ при пероральном введении: при разовых дозах 15–30 мг/кг 2–3 раза в сутки в течение 10 дней или однократно в дозе 10 мг/кг, но при более длительном курсе лечения (20 дней).
3. У метаболита СТ ДЭБИ-М в исследованном диапазоне доз не выявлено противоопухолевого эффекта.
4. Обе тестированные фармакологические субстанции (ДЭБИ-Т и ДЭБИ-М) не проявили противоопухолевого действия у мышей с асцитной формой лимфобластного лейкоза Р388.

5. Двадненко К.В., Водолажский Д.И., Страдомский Б.В. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на ультраструктуру митохондрий клеток НЕР2 // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины. Материалы IV Международной конференции. Ростов-на-Дону. – 2011. – С. 17–8.
6. Двадненко К.В., Страдомский Б.В., Водолажский Д.И. и др. Исследование механизмов регенеративной активности препарата «Стелланин®» (1,3-диэтилбензимидазолия трийодид) // Известия Высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2012. – №1. – С. 110–4.
7. Зинзар С.Н., Лейтина Б.И., Туян Б.Г. и др. Злокачественные опухоли, возникшие из сингенных трансплантатов эмбрионального желудочно-кишечного тракта // Вопросы онкологии. – 1972. – Т.18, № 4. – С. 89–92.
8. Ливицкий В.И., Пищев А.И., Вилков Г.А. и др. Лазин – представитель нового класса йодсодержащих препаратов // Тезисы докладов III Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М. – 1996. – С. 32.
9. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 3–8.
10. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
11. Оборотова Н.А. Основные проблемы создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 2. – С. 27–31.
12. Оборотова Н.А. Итоги создания отечественных лекарственных форм противоопухолевых препаратов в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН // Вестник РАМН. – 2001. – № 9. – С. 18–23.
13. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
14. Оборотова Н.А., Лопатин П.В. 30 лет лаборатории разработки лекарственных форм ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 3–7.
15. Оборотова Н.А., Лопатин П.В., Барышников А.Ю. Биофармацевтические аспекты создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов // Российский онкологический журнал. – 2002. – № 5. – С. 8–11.
16. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – № 3–4. – С. 33–40.
17. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Макарова О.А. и др. Доклиническое изучение липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 40–5.
18. Смирнова З.С., Меерович И.Г., Лукьянец Е.А. и др. Фенилтиозамещенные фталоцианины – новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазона // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 54–60.
19. Смирнова З.С., Оборотова Н.А., Макарова О.А. и др. Эффективность и фармакокинетика липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора «Фотосенс» на основе сульфотфалоцианина алюминия // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39, № 7. – С. 3–7.
20. Страдомский Б.В., Солодунов Ю.Ю., Лыкова Е.О. Экспериментальная и клиническая фармакология мазевых форм Стелланина® (1,3-диэтилбензимидазолия трийодида). Ростов-на-Дону: Изд. НМЦ «Логос», 2009. – 70 с.
21. Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5. – №1. – С. 54 – 61.
22. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. // В кн. «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Под ред. Хабриева Р.У. – 2 изд. переработ. и дополнен. М.: ОАО изд. «Медицина», 2005. – С. 637–51.
23. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина, А. Голдина и др. М.: Медицина, 1980. – 293 с.
24. Bonnet S., Archer S.L., Allalunis-Turner J. et al. A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth // Cancer Cell. – 2007. – 11. – P. 37–51.
25. Derkacheva V.M., Meerovich G.A., Meerovich I.G. et al. Heterooxylaluminium tetra-3-phenyl thiophthalocyanine is a new effective photosensitizer for photodynamic therapy and fluorescent diagnosis// Bulletin Experimental Biology and Medicine - 2005. - Vol. 139.- №4.- P. 422–26.
26. Meerovich I.G., Smirnova Z.S., Oborotova N.A. et al. Hydroxylaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine is a new effective photosensitizer for photodynamic therapy and fluorescent diagnosis// Bulletin of experimental biology and medicine. – 139. – № 4. – P. 427–30.
27. http://thomsonreuters.com/products_services/science/training/integrity.

СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДЭБИ-М	– 1,3-диэтилбензимидазолия монойодида
ДЭБИ-Т	– 1,3-диэтилбензимидазолия трийодид
КД	– курсовая доза
ПВП	– поливинилпирролидон
РД	– разовая доза
ПЖ	– продолжительность жизни
СД	– суточная доза
СПЖ	– средняя продолжительность жизни.
СТ	– Стелланин®
УПЖ	– увеличение продолжительности жизни.
IC ₅₀	– концентрация, вызывающая гибель 50% клеток

УДК 577.352.2:547.495.4:615.2/3-099

Н.В. Грищенко, Б. Альбассит, М.А. Барышникова, Л.В. Ланцова,
А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова, В.П. Краснов, А.Ю. Барышников

СРАВНЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ ИЗ КЛАССА НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ

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

Контактная информация

Грищенко Наталия Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

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

e-mail: natali-2712@mail.ru

Статья поступила 15.01.2014, принята к печати 27.01.2014

Резюме

В работе проведено сравнение цитотоксической активности лекарственных форм (липосомальной и лиофилизата для приготовления раствора для инъекций) трех препаратов из группы производных нитрозомочевины – аранозы, лизомустина и OR-2011 – на линии клеток меланомы человека *Mel Z*.

Ключевые слова: цитотоксический тест, липосомы, производные нитрозомочевины.

N.V. Grischenko, B. Albassit, M.A. Baryshnikova, A.V. Lantsova,
A.P. Polozkova, N.A. Oborotova, V.P. Krasnov, A.Yu. Baryshnikov

CYTOTOXIC EFFECT OF ANTICANCER DRUG FORMULATIONS BELONGING TO NITROSOUREA SUBCLASS

FSBI «N.N. Blokhin RCRC» RAMS, Moscow

Abstract

In this study we have compared the cytotoxic effect of three derivatives of nitrosourea including aranoza, lizomustin and OR-2011 on melanoma cell line *Mel Z*. All the derivatives were used as liposomal or liophilised form of drug.

Key words: cytotoxic test, liposomes, nitrosourea derivatives.

Введение

Противоопухолевые препараты отличаются от других лекарств высокой агрессивностью, химической нестабильностью во внешней среде и сильным местнораздражающим действием. В связи с этим большинство препаратов выпускаются в виде жидких растворов или лиофилизированных порошков для приготовления растворов и применяются в виде внутривенных инфузий. Новые подходы к совершенствованию химиотерапии рака сфокусированы на разработке новых систем доставки лекарств непосредственно к злокачественной клетке без повреждения нормальной ткани [3; 5; 6; 9; 12; 21; 22; 23; 32; 34; 35; 36; 37; 39].

На протяжении последних 20 лет в практике мировой фармакологии интенсивно используются препараты различной направленности на основе липосом и липидов. Эти препараты нашли широкое применение в диагностике и химиотерапии опухолевых заболеваний. [6; 17; 18; 25]. За сравнительно короткий срок липосомы превратились из простой модели, имитирующей клеточные мембраны, в объект активных научных исследований и практического применения. [1; 2; 6; 20; 27].

Главная цель использования липосом в качестве носителей лекарственных препаратов заключается в селективном накоплении действующих веществ в патологических очагах (опухолях, воспаленных тканях). Включение лекарства в липосомы может изменить фармакокинетику и биораспределение препарата, приводящее к повышению эффективности противоопухолевой терапии и снижению

токсичности [28; 29]. Важную роль в этом процессе играет измененная неоваскуляризации опухоли, способствующая проникновению и накоплению липосом в опухоли [5; 6; 42; 43]. Специфическую доставку липосом в опухоль могут обеспечить МКА к опухоли-ассоциированным антигенам [4; 6; 30]

Для достижения необходимого терапевтического эффекта инкапсулированный в везикулы препарат должен быть доступным для клеток-мишеней [7; 8; 16; 31; 32; 33]. Далее липосомы интернализуются клетками-мишенями или разрушаются различными способами (ферментативным гидролизом либо воздействием извне – например, ультразвуком, температурой) возле поверхности клеток с последующим высвобождением препарата и его захватом этими клетками. Кроме того, липосомы преодолевают МЛУ [40]. Производные нитрозомочевины являются активно используемым классом противоопухолевых соединений. Они обладают широким спектром противоопухолевой активности. В условиях организма соединения этого класса гидролитически распадаются с образованием алкилирующих и карбамоилирующих частиц, что обуславливает их биологическое действие. В клинической практике применяются лекарственные формы аранозы и лизомустина в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций. В лаборатории лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН были разработаны липосомальные лекарственные формы этих соединений [10; 11; 13–15; 24; 26; 38].

В настоящее время все еще ведется поиск новых соединений из класса нитрозомочевин, свя-

занный с попытками расширить спектр их противоопухолевого действия, снизить побочные и токсические эффекты, увеличить избирательность противоопухолевого действия, а также обусловленный тем, что опухоли не обладают перекрестной резистентностью к различным представителям этой группы препаратов.

Одним из таких соединений является OR-2011, синтезированный в Институте органической химии им. И.Я. Пастера.

Цель нашей работы – сравнение цитотоксического действия липосомальных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевин: аранозы, лизомустина и OR-2011.

Материалы и методы

Сравнение цитотоксичности липосомальных препаратов проводили с помощью МТТ-теста, основанного на восстановлении дегидрогеназами живых метаболически-активных клеток желтой соли 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) с образованием фиолетовых кристаллов формазана.

Количество полученного формазана зависит от числа клеток и их жизнеспособности и определяется фотометрически. Цитотоксический эффект характеризует ИК₅₀ – концентрация вещества, вызывающая гибель 50 % клеток

Араноза – 3-α-L-арабинопиранозил-1-метил-нитрозомочевина – метильное производное мочевины, носителем цитотоксической группы в котором является L-арабиноза.

Липосомальную лекарственную форму аранозы изучали в концентрациях 0,9 мг/мл; 0,45 мг/мл; 0,225 мг/мл; 0,112 мг/мл; 0,056 мг/мл.

Лизомустин – 2-хлорэтилнитрозоуреидопроизводное аминокислоты лизина – относится к группе нитрозоалкилмочевин и представляет собой смесь двух изомеров.

Исследовали его липосомальную лекарственную форму в концентрациях 1 мг/мл; 0,5 мг/мл; 0,25 мг/мл; 0,125 мг/мл; 0,062 мг/мл и 0,031 мг/мл.

OR-2011 – нитрозопроизводное аминокислоты орнитина из группы нитрозоалкилмочевин, представляет собой смесь двух изомеров.

Липосомальную форму OR-2011 исследовали в концентрациях 1 мг/мл; 0,5 мг/мл; 0,25 мг/мл; 0,125 мг/мл; 0,062 мг/мл; 0,031 мг/мл и 0,015 мг/мл.

МТТ-тест проводили на клеточной линии диссеминированной меланомы человека *Mel Z* [19].

Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % ТЭС, 10мМ HEPES (Sigma, США), 2мМ L-глутамин (Sigma, США), 40 нг/мл гентамицина (ICN, США), 0,1% 1000-кратного р-ра аминокислот и 0,1% 1000-кратного р-ра витаминов (ПанЭко, Россия) при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. и 0,1% 1000-кратного р-ра витаминов (ПанЭко, Россия), при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

Для открепления клеток с пластика использовали р-р Версена.

Клетки отмывались чистой бессывороточной средой RPMI-1640 и пересаживались в 96-луночные плоскодонные планшеты (Costar, USA) по 4×10³ клеток в 180 мкл полной среды RPMI-1640 на лунку.

Для оценки цитотоксического действия липосомальных препаратов в каждую лунку добавляли по 20 мкл препарата в разных концентрациях, и

инкубировали с клетками в течение 24; 48 и 72 ч в 5 %-ном CO₂-инкубаторе при 37 °С.

Через 24; 48 и 72 часа в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ[3-(4,5 диметилтиазол-2-ил)-2,5 дифенилтетразолий бромид] (маточный раствор 5мг/мл, конечная концентрация 1мг/мл), и инкубировали 4 ч при 37 °С в 5 %-ном CO₂-инкубаторе.

После образования формазана надосадочную жидкость удаляли. Осадок растворяли, добавляя в лунки по 200 мкл ДМСО.

Планшеты помещали на 5–7 мин в термостат при температуре 37°С, после чего встряхивали на шейкере в течение 10 минут. Затем измеряли интенсивность окрашивания среды на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций «АИФР-01 Униплан» (ЗАО «Пикон») при λ=530 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Выживаемость клеток рассчитывалась по формуле:

$$\text{Выживаемость}(\%) = \frac{\text{Оптическая плотность клеток в опыте}}{\text{Оптическая плотность контрольных клеток}} \times 100\%$$

Результаты

Проведено сравнение цитотоксической активности трех производных нитрозометилмочевины на линии клеток меланомы человека *Mel Z*, полученной в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН [19; 41]. Все три препарата оказывали цитотоксическое действие на клетки дозозависимым образом (рис. 1–3). Липосомальная араноза через 24 ч инкубации была более эффективна. IC₅₀ для липосомальной аранозы составила 0,45 мг/мл, а для аранозы-лио – 0,9 мг/мл (рис. 1А).

После инкубации клеток с аранозой в течение 48 и 72 ч эффект обеих форм аранозы был практически одинаковым (рис. 1Б–В).

Лизомустин оказался эффективнее аранозы. IC₅₀ для обеих лекарственных форм лизомустина составила около 0,125 мг/мл после инкубации в течение 24 и 48 ч (рис. 2А–Б) и 0,062 мг/мл через 72 ч инкубации (рис. 2В).

Лизомустин-лио оказывал более сильное цитотоксическое действие при использовании тех же самых концентраций. Более выражено токсическое действие лизомустина-лио в отличие от его липосомальной формы было также показано ранее А.В. Ланцовой и соавт. [13–15; 34].

Цитотоксическое действие OR-2011 было наиболее выраженным, особенно его липосомальной формы. После инкубации клеток с препаратом в течение 24 ч ИК₅₀ для липосомальной формы было 0,025 мг/мл, для OR-2011-лио – 0,125. Далее при инкубации 48 и 72 ч ИК₅₀ для липосомальной формы оставалась на тех же значениях, а для OR-2011-лио достигла 0,062 мг/мл.

Заключение

Таким образом, сравнение цитотоксического действия известных препаратов из класса производных нитрозомочевины – аранозы и лизомустина, а также нового препарата OR-2011 показало, что наиболее эффективным является OR-2011. Особенно выраженным цитотоксическим действием обладает липосомальная лекарственная форма OR-2011.

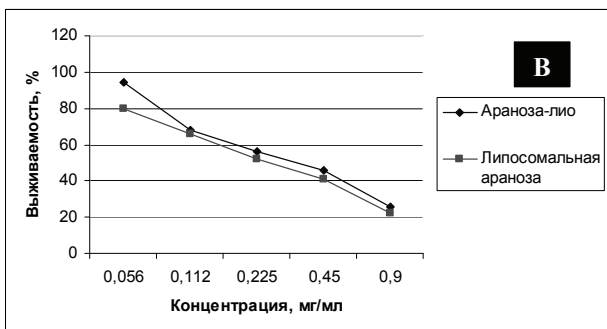
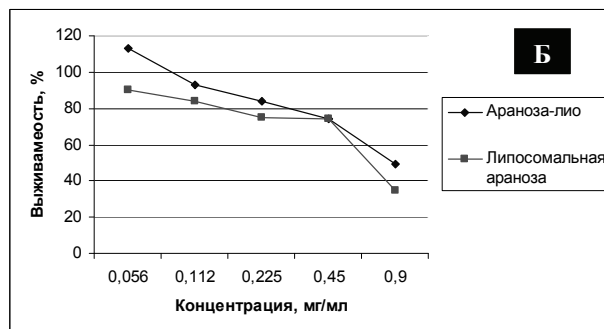
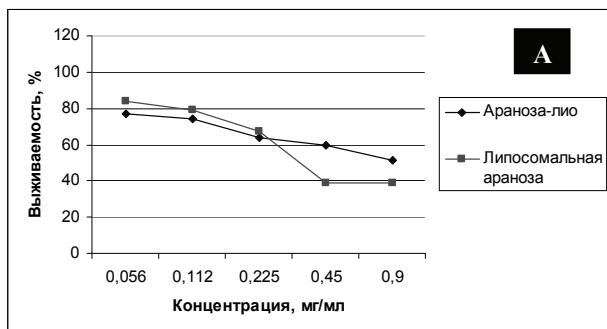


Рис. 1. Влияние аранозы на клетки линии *Mel Z*:

А – 24 ч;

Б – 48 ч;

В – 72 ч

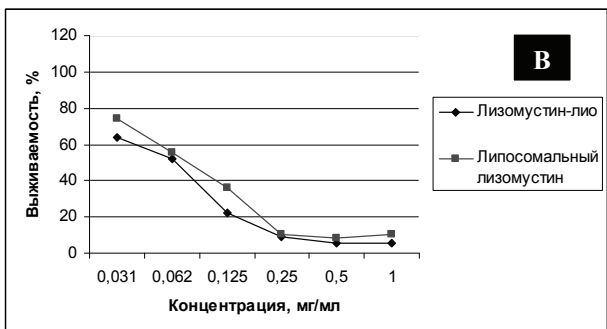
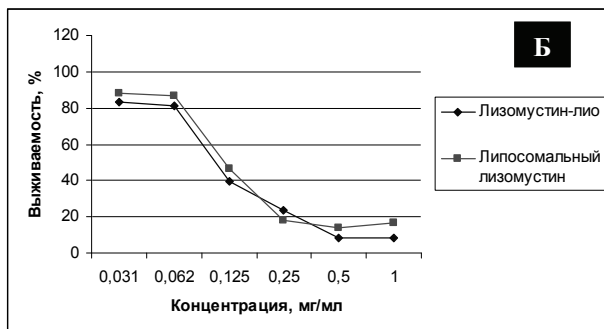
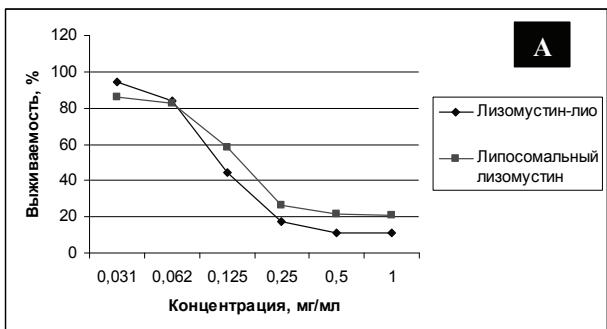
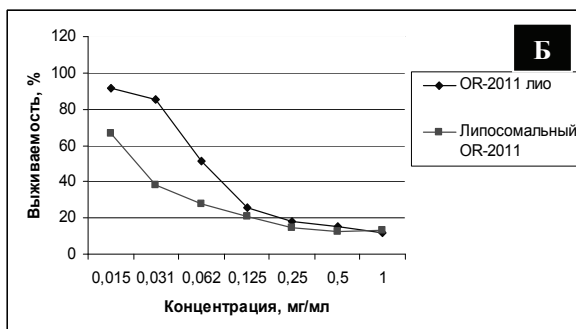
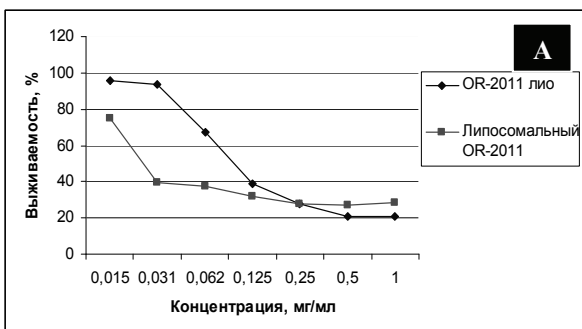


Рис. 2. Влияние лизомустина на клетки линии *Mel Z*:

А – 24 ч;

Б – 48 ч;

В – 72 ч



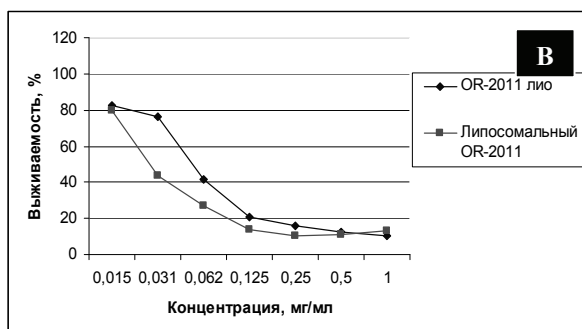


Рис. 3. Влияние OR-2011 на клетки линии *Mel Z*:

А – 24 ч;

Б – 48 ч;

В – 72 ч

Литература

1. Альбассит Б., Барышникова М.А., Игнатъева Е.В. и др. Разработка липосомальной лекарственной формы нового соединения из класса нитрозоалкилмочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т.12, №2. – С.5.
2. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Соколова З.А., Косоруков В.С. Разработка липосомальной конструкции, содержащей лизат опухолевых клеток // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 5.
3. Барсуков Л.И. Липосомы // Соровский образовательный журнал. – 1998. – 10. – С. 2–9.
4. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека // Гематология и трансфузиология. – 1990. – №8. – С. 4.
5. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 23–30.
6. Барышников А.Ю., Барышникова М.А. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7.
7. Барышникова М.А., Зангиева М.Т., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных нанокапсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–5.
8. Гуревич Д.Г., И.Г. Меерович И.Г., Г.А. Меерович Г.А. и др. Влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления тиосенса в опухоли // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 45–9.
9. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. и др. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 21–7.
10. Казеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной лекарственной формы аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
11. Казеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
12. Кортова М.А., Рябова А.З., Игнатъева Е.В. и др. Изучение эффективности включения фотосенса в пространственно стабилизированные липосомы // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, №4. – С. 96–101.
13. Ланиова А.В. Создание и биофармацевтическое изучение липосомальных лекарственных форм противоопухолевых препаратов производных нитрозомочевины. Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – М., 2006. – 24 с.
14. Ланиова А.В., Оборотова Н.А., Перетолчина Н.М. и др. Разработка и изучение стерически стабилизированной липосомальной формы лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 19–23.
15. Ланиова А.В., Оборотова Н.А., Перетолчина Н.М. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности липосомальных лекарственных форм препаратов производных нитрозоалкилмочевины // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – 2(14). – С. 25–9.
16. Левачева И.С., Барышникова М.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов липосомами // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 32.
17. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 1. Липосомы в ФДТ // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 4. – С. 3–8.
18. Меерович И.Г., Оборотова Н.А. Применение липосом в фотохимиотерапии: 2. Липосомальные формы для создания фотоактивируемых липосомальных препаратов в фотобиологических исследованиях // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 6–12.
19. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланоиды – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник РАМН. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
20. Михайлова Т.В., Барышникова М.А., Клименко О.В. и др. Разработка липосомальной формы противоопухолевой вакцины // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 62–6.
21. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
22. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.

23. Оборотова Н.А. Основные проблемы создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 2. – С. 27–31.
24. Оборотова Н.А., Лопатин П.В. 30 лет лаборатории разработки лекарственных форм ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 3–7.
25. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – № 3–4. С. 33–40.
26. Преображенская М.Н., Лопатин П.В., Переводчикова Н.И. и др. Новое противоопухолевое лекарственное средство араноза // II Российский конгресс Человек и лекарство. – М., 1995. – С. 203.
27. Смирнова З.С., Меерович И.Г., Лукьянец Е.А. и др. Фенилтиозамещенные фталоцианины – новые фотосенсибилизаторы ближнего инфрокрасного диапазона // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 54–60.
28. Саквина О.И., Барышников А.Ю. Липосомы в направленной доставке противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 4. – С. 80–5.
29. Смирнова З.С., Оборотова Н.А., Макарова О.А. и др. Эффективность и фармакокинетика липосомальной лекарственной формы фотосенсибилизатора «Фотосенс» на основе сульфатфалоцианина // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39, № 7. – С. 3–7.
30. Соколова Д.В., Ташина Е.В., Кортава М.А. и др. Анти-MUC-1 иммунолипосомальная конструкция доксорубина для направленной доставки в опухоль // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 99–103.
31. Ташина Е.В., Оборотова Н.А. Селективная доставка препаратов в опухоль с помощью термочувствительных липосом и локальной гипертермии // Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7, № 3. – С. 4–12.
32. Ташина Е.В., Костин К.В., Оборотова Н.А. Особенности инкапсулирования лекарственных препаратов в липосомы // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 8. – С. 30–40.
33. Ташина Е.В., Мецзякова В.В., Игнатъева Е.В. и др. Биофармацевтические исследования термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубина // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 40–7.
34. Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 54–61.
35. Толчева Е.В., Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. и др. Анти-CD5-иммунолипосомы как транспортная система для направленной доставки лекарственных препаратов к CD5+клеткам // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 38–43.
36. Хугаева О.В., Яворская Н.П., Голубева И.С. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности различных лекарственных форм метаксантрона // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 3. – С. 51–4.
37. Чан Тхи Хай Иен, Поздеев В.И., Меерович Г.А. и др. Липосомальная лекарственная форма фотодитазина // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 105–7.
38. Шадрина А.В., Петолчина Н.М., Полозкова А.П. и др. Биофармацевтические исследования липосомального лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 49–53.
39. Швец В.И., Краснопольский Ю.М. Липосомы в фармации. Продукты нанотехнологии // Провизор. – 2008. – № 3. – С. 18–24.
40. Шоуа И.Б., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Действие липосомального доксорубина на клетки линии, экспрессирующие активный pgr170 // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 1. – С. 20–3.
41. Mikhailova I.N., Morozova L.Ph., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // Melanoma Research. – 2008. – № 5. – P. 303–13.
42. Vartanian A.A., Stepanova E.V., Grigorjeva I. et al. VEGFR1 and PKCa signaling control melanoma vasculogenic mimicry in a VGFR2 kinase-independent manner // Melanoma Research. – 2011. – 21(2). – P. 91–8.
43. Vartanian A.A., Stepanova E.V., Gutorov S.V. et al. Prognostic significance of periodic acid-schiff-positive patterns in clear cell renal carcinoma // The Canadian Journal of Urology. – 2009. – 16(4). – P. 4726–32.

**НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ
РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН**



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:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

УДК 616.5-006.81-085.277.3:547.495.4

*В.А. Горбунова, Л.В. Манзюк, Л.В. Демидов Г.Ю. Харкевич***ЛИЗОМУСТИН – ОТЕЧЕСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ
ИЗ ГРУППЫ ПРОИЗВОДНЫХ НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ В ЛЕЧЕНИИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ***ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва***Резюме**

Представлены результаты проведенных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН клинических испытаний по применению перспективного отечественного противоопухолевого препарата из класса производных нитрозомочевины – лизомустина. Показано, что его эффективность в режиме монотерапии при диссеминированной меланоме кожи составляет 18,8 %, что не уступает эффективности стандартной химиотерапии дакарбазином. Лизомустин характеризуется умеренной токсичностью, связанной с миелосупрессией. Его эффективность повышается при использовании в сочетании с цисплатином, винкристином, дактиномицином. Лизомустин и его комбинации рекомендованы для применения при меланоме кожи.

Ключевые слова: меланома кожи, нитрозомочевины, лизомустин.

*V. Gorbunova, L. Manzyuk, G. Kharkevich, L. Demidov***RUSSIAN NITROSOUREAS
IN METASTATIC MELANOMA***FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» RAMS, Moscow***Abstract**

The results of «N.N. Blokhin RCRC» research on novel promising Russian nitrosourea Lysomustine are represent. It was shown that single drug effectiveness in metastatic melanoma is 18,8 % for Lysomustine that is comparable with DTIC standard chemotherapy. The drug are associated with moderate myelosuppression. Its clinical efficacy could be encouraged in combination with Cisplatin, Vincristine and Dactinomycin. Based on these results Lysomustine containing regimens were approved for the treatment of metastatic melanoma.

Key words: skin melanoma, nitrosoureas, lysomustin.

Введение

Низкая эффективность лекарственного метода лечения диссеминированной меланомы кожи (МК) стимулирует поиск новых эффективных противоопухолевых агентов. В настоящее время существует 4 группы цитостатиков, эффективность которых в режиме монотерапии при метастатической МК превышает 10 %, – это производные имидазолкарбоксамидов, нитрозомочевины, платины, винкалкалоиды. Практически все они были разработаны и испытаны за рубежом. В нашей стране проводилась и продолжается активная научно-экспериментальная работа, направленная на создание оригинальных противоопухолевых препаратов и новых лекарственных форм уже известных препаратов [1; 2; 4; 6-13; 16]. В этой связи особый интерес вызывают результаты клинических исследований нового отечественного цитостатика из группы производных нитрозомочевины – лизомустина, обладающего способностью глубокого угнетения синтеза ДНК.

Материалы и методы

Лизомустин – 2-хлорэтилнитрозоуреднопроизводное аминокислоты лизина – относится к группе нитрозоалкилмочевины и представляет собой смесь 2 изомеров (активного и малоактивного). Препарат синтезирован в Институте органического синтеза УрО РАН, лекарственная форма разработана в ФГБУ «РОНЦ им.Н.Н. Блохина» РАМН.

Результаты

Клинические испытания лизомустина были начаты в 1988 г. В исследованиях I фазы, прове-

денных у 70 больных с различными злокачественными новообразованиями, в том числе – у 36 больных с метастатической МК, показано, что максимально переносимая доза препарата составляет 950 мг/м² при однократном введении и 450 мг/м² при введении в 1 и 8 дни. Дозолимитирующей токсичностью препарата является угнетение тромбо- и миелопоэза, возникающее при дозах 550–770 мг/м² 1 раз в 4 недели или 450 мг/м² в 1 и 8 дни. Среди других побочных явлений отмечены тошнота и рвота (от 34 до 53 %), гепатотоксичность в виде повышения уровня печеночных трансаминаз и щелочной фосфатазы (8–26 %), частичная обратимая алопеция (100 %). В то же время не было выявлено признаков кардио-, нефро- или легочной токсичности [3; 5; 15].

Уже в ходе I фазы исследования отмечена чувствительность к препарату меланомы кожи. Так, частота отдельных регрессий метастазов МК в легкие составила 8 % (2/24) при введении лизомустина в дозе 210 мг/м² в 1 и 8 дни, еще у 4 больных (17 %) в течение 6 месяцев наблюдалась стабилизация процесса.

На II фазе исследования эффективность лизомустина оценена у 74 больных диссеминированной меланомой кожи. Препарат вводили в разовой дозе 400–500 мг/м² в/в струйно в 40–60 мл 5 % раствора глюкозы 1 раз в 4–6 недель. Больные получили 142 курса лечения. Тошнота и рвота I–II ст. отмечены у 37,8 % больных (28/74). Гематологическая токсичность была умеренной: анемия I–II ст. выявлена у 27,7 %, лейкопения II–III ст. – у 31 % и тромбоцитопения I–III ст. – у 18 % больных.

Из 74 включенных в исследование больных частичные регрессии выявлены у 14 (18,8 %), еще у 19 пациентов отмечена стабилизация процесса, в том числе длительная 6 и более месяцев – у 8 боль-

ных. Чувствительными к препарату оказались метастазы МК в мягкие ткани, лимфоузлы, легкие, головной мозг.

По результатам II фазы клинических исследований в 1999 г. Фармакологический комитет МЗ РФ разрешил практическое применение лизомустина при меланоме кожи.

С 1996 г. в НИИ клинической онкологии РОНЦ РАМН проводилась III фаза клинического изучения лизомустина в составе лекарственных комбинаций. Полученные экспериментальные данные показали потенцирование его противоопухолевой активности в комбинации с цисплатином. Эффект 2 режимов комбинированной химиотерапии был оценен у 45 больных диссеминированной меланомой кожи:

1. Лизомустин 400 мг/м² в/в струйно в 1-й день, винкристин 2 мг в/в в 1-й и 8-й дни, цисплатин 30 мг/м² в/в капельно в 3–6 дни, интервал – 28 дней;
2. Лизомустин 300 мг/м² в/в струйно в 1-й и 8-й дни, блеомицин 30 мг в/м в 3–5 дни, цисплатин 80 мг/м² в/в капельно в 2-й и 9-й дни, интервал – 4–6 нед.

Результаты лечения представлены в таблице [1]. Общая эффективность 2 режимов комбинированной химиотерапии при диссеминированной меланоме составила 31 %. Однако между собой они

существенно различались: комбинация с винкристином показала 21,7 % частичных регрессий опухоли, в то время как комбинация с блеомицином была эффективной у 42,1 % больных, включая 10,5% полных регрессий. Такое различие в эффективности, в первую очередь, обусловлено различными курсовыми дозами лизомустина (400 и 600 мг/м²) и цисплатина (120 и 160 мг/м²). Более высокие дозы этих препаратов во второй комбинации привели к значительному росту его токсичности: тошнота и рвота I–III ст. наблюдалась у всех больных, гипертермия I–II ст. отмечена в 47 % случаев. Лейкопения I–III ст. и нейтропения I–IV ст. развились у трети больных, тромбоцитопения I–IV ст. – у 26 % и анемия I–III ст. – у 21 % больных.

Заключение

Результаты экспериментальных и клинических исследований оригинального отечественного цитостатика из группы нитрозомочевины лизомустина показали его эффективность у больных диссеминированной меланомой кожи, не уступающую таковой дакарбазина, который до последнего времени остается стандартом лекарственного лечения. Препарат может быть рекомендован при диссеминированной меланоме кожи в монорежиме и в составе лекарственных комбинаций.

Таблица

Эффективность полихимиотерапии с использованием лизомустина при диссеминированной меланоме кожи (III фаза клинических исследований)

Режим лечения	Авторы	п больных (оценено)	Эффективность			
			ПР*	ЧР*	Стабилизация*	Прогрессирование*
Лизомустин Винкристин Цисплатин	[4]	26 (23)	–	5 (21,7)	6 (26,1)	12 (52,2)
Лизомустин Блеомицин Цисплатин	[2]	19 (19)	2 (10,5)	6 (31,6)	7 (36,8)	4 (21,1)
Всего	–	45 (42)	2 (4,8)	11 (26,2)	13 (31)	16 (38,1)

*В скобках – %; ПР – полная регрессия; ЧР – частичная регрессия

Литература

1. Барышников А.Ю., Барышникова М.А. Иммунолипосомы и мишени их действия // Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И.Менделеева 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 60–7
2. Барышников А.Ю., Оборотова Н.А., Герасимова Г.К., Кубасова И.Ю. Противоопухолевые препараты, разработанные в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина РАМН // Вестник Московского общества онкологов. – 2004. – № 11. – С. 3–4.
3. Бесова Н.С., Горбунова В.А., Герасимова Г.К. и др. Нитруллин – новый оригинальный отечественный препарат из группы нитрозомочевины // В сб.: «Клиническая фармакология и терапия». – 1995. – 4 (4). – С. 18–20.
4. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В., Бунатян Н.Д. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 4. – С. 21–7.
5. Булат Ю.В., Базин И.С., Жарков С.А., Гарин А.М. Комбинация цисплатина, блеомицина, нитруллина при диссеминированной меланоме // Тезисы 2-го Съезда онкологов СНГ. – Киев, 2000. – абстракт 787.
6. Горбачева Л.Б., Кукушкина Г.В., Перетолчина Н.М. Актуальные проблемы фармакологии и поиск новых лекарственных препаратов // Труды конференции. – Томск, 1990. – Т. 4. – С. 98–101.
7. Ланиова А.В. Создание и биофармацевтическое изучение липосомальных лекарственных форм противоопухолевых препаратов производных нитрозомочевины. – Автореф. дис. ... канд. фарм. навк. – М., 2006. – 24с.
8. Ланиова А.В., Оборотова Н.А., Перетолчина Н.М. и др. Разработка и изучение стерически стабилизированной липосомальной формы лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – 4. – С. 19–23.
9. Ланиова А.В., Оборотова Н.А., Перетолчина Н.М. и др. Сравнительное изучение противоопухолевой активности липосомальных лекарственных форм производных нитрозомочевины // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – 2(14). – С. 25–9.
10. Мороз Л.В., Бородкина А.Г., Надеждина Т.М. Эффективность аранозы и нитруллина при диссеминированной меланоме кожи // Тезисы Съезда онкологов стран СНГ, 1996.
11. Оборотова Н.А. Основные проблемы создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для внутривенного введения // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т. 2, № 2. – С. 27–31.
12. Оборотова Н.А., Лопатин П.В. 30 лет лаборатории разработки лекарственных форм ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 3–7.
13. Оборотова Н.А., Лопатин П.В., Барышников А.Ю. Биофармацевтические аспекты создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов // Российский онкологический журнал. – 2002. – № 5. – С. 8–11.
14. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал общества им. Д.И. Менделеева. – 2012. – Т. LVI, № 3–4. – С. 33–40.
15. Переводчикова Н.И., Горбунова В.А., Петухова И.Н. Первичное клиническое изучение нитруллина // В сб.: «Химиотерапия опухолей в СССР». – Москва, 1989. – вып. 54. – С. 201–6.
16. Шадрин А.В., Перетолчина Н.М., Полозкова А.П. и др. Биофармацевтические исследования липосомального лизомустина // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. Т. 3, № 1. С. 49–53.

Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием
«Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике»
Москва, 20-21 марта 2014 года

ТЕЗИСЫ

Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, И.А. Пасова, Б.А. Бердов

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ

ПОСЛЕ ИММУНОТЕРАПИИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА И ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА

ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, Обнинск, Калужская область

Задачи исследования. Оценить субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у онкологических больных раком желудка и кишечника и маркеров активации лимфоцитов на этапах сопроводительной иммунотерапии с использованием активированных *in vitro* лимфоцитов.

Материалы и методы. В работе оценен фенотип В-, Т-, NKT-, NK-лимфоцитов периферической крови и маркеры активации (HLA-DR, CD38, CD69, CD314, CD25) у 13 пациентов с диссеминированными формами рака желудка и толстой кишки. Лимфоциты выделяли по стандартной методике и культивировали в полной питательной среде с ростовыми факторами (инсулин, трансферин) и цитокинами (IL-2 и IL-15) в CO₂ инкубаторе 7-10 дней. Фенотипирование флуоресцентно меченых лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре FACScan.

Результаты и выводы. Показано, что лимфоциты хорошо активируются и пролиферируют *in vitro*. До лечения у 5 (38 %) больных отмечалось снижение относительного числа В-лимфоцитов. У 46 % больных наблюдалось повышение абсолютного и у 78 % относительного содержания Трег-клеток (CD4⁺CD25⁺). С другой стороны, более чем у половины пациентов (62 %) увеличено число NK-клеток. Число активированных лимфоцитов (HLA-DRall) у больных в среднем составило 17,87 %, CD25⁺ клеток – 9,79 %, CD38⁺ – 28,27%, а CD69⁺ – 22,92 %. Среднее содержание рецептора NKG2D (CD314⁺) на всех лимфоцитах составило 41,2 %, а на NK-клетках – 17,13 %.

После иммунотерапии у всех больных сохранился исходно низкий уровень В-лимфоцитов (ср. 5%) и повышенное содержание Трег. Выявлено увеличение экспрессии маркеров CD25⁺, CD314⁺, CD38⁺, HLA-DRall на всех лимфоцитах и на Т-лимфоцитах (HLA-DR, CD38⁺). Отмечено незначительное снижение в кровяном русле NK-клеток (на 7%) и активированных NK-клеток (CD314⁺, CD69⁺). Через несколько месяцев после иммунотерапии наблюдается положительная тенденция в увеличении экспрессии маркеров HLA-DRall, CD25⁺, CD314⁺ на всех лимфоцитах и на HLA-DR⁺ Т-клетках.

Адоптивная иммунотерапия хорошо переносится, характеризуется отсутствием побочных эффектов и может рекомендоваться как сопроводительная к лучевой и химиотерапии при заболеваниях раком желудка и кишечника.

С.М. Адекенов¹, С.Н. Шин², В.С. Шнаукица²

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТА «АРГЛАБИН» ПРИ ПОВЫШЕННОЙ ДОЗЕ

¹АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Казахстан

² Испытательный Центр РГП на ПХВ «Национальный Центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗ РК, Алматы, Казахстан

Актуальность. Препарат «Арглабин» разработан в Международном научно-производственном холдинге «Фитохимия» (г. Караганда, Республика Казахстан) на основе сесквитерпенового лактона, выделенного из эндемичного растения полыни гладкой и зарегистрирован в качестве противоопухолевого средства в Республике Казахстан (регистрационное свидетельство РК-ЛС-5-000725) и Российской Федерации (регистрационное удостоверение ЛС-001578).

Задачи исследования. Изучить воздействие лекарственного препарата «Арглабин», проявляющееся после однократного и многократного введения в различных дозах.

Материалы и методы. Экспериментальные животные: мыши весом 18–23 г; крысы – 165–200 г.

Результаты и выводы. На основании полученных экспериментальных данных при изучении острой токсичности на обоих видах лабораторных животных установлено, что препарат «Арглабин» относится 3-му классу токсичности, т.е. умеренно токсичные препараты. Видоспецифичностью действия изучаемый препарат не обладает. Препарат в дозе, эквивалентной 500 мг/м² у человека, практически не влияет на периферическую кровь, что свидетельствует о его низкой токсичности по отношению к органам кроветворения. Также «Арглабин» не вызывает глубоких ультраструктурных изменений внутренних органов гематологии в дозах, ниже эквивалентной 500 мг/м² для человека.

Таким образом, рекомендуемая клиническая доза для человека может быть увеличена до 450 мг/м².

А.В. Аустова

ОСОБЕННОСТИ ОПЕРАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ У БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ ТУЛОВИЩА

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского МЗ России, Саратов

Актуальность. Меланома кожи – это злокачественная опухоль с вариабельным и непредсказуемым клиническим течением. Стойкое излечение после иссечения, на ранних стадиях развития, может быть у 80–90% больных. В настоящее время четко показано, что широкое иссечение опухоли не улучшает результатов лечения. Невозможность измерения толщины опухоли до операции диктует необходимость учета толщины кожи различных ее участков.

Задача исследования. Показать целесообразность учета толщины кожи на различных участках туловища при планировании объема операции при меланоме кожи туловища.

Материалы и методы. Материалом исследования послужили данные о 285 больных меланомой кожи туловища I–III стадий, находившихся на лечении с 2001 по 2011 гг. Наиболее частой локализацией опухоли была область спины (55,2 %). На коже живота меланома была у 22,4 %, на коже передней грудной стенки – у 17,2 %, ягодичной области – у 5,2 % пациентов. Выполнялось иссечение опухоли с окружающими тканями, с последующей пластикой дефекта свободным или перемещенным кожным лоскутом. Отступ от границ опухоли определялся в зависимости от полученных при микроморфометрическом исследовании толщины кожи.

Результаты. По результатам микроморфометрического исследования, средние величины общей толщины кожи составили 1906,0 мкм (в области грудной стенки) – 3883,6 мкм (в области живота). Больные с локализацией меланомы на животе и в ягодичной области отобраны в первую группу (104 человека). Вторую группу составили больные с локализацией опухоли на коже передней грудной стенки и спины (187 человек). Средний размер меланомы в двух группах существенно не отличался и составил: в первой группе – 1,4 см, во второй группе – 1,6 см. Больным из первой группы выполнено экономное иссечение опухоли с отступом от визуальных границ 2 см. Пациентам второй группы – широкое иссечение с отступом 3–4 см. Проводили морфологический контроль абластичности операции. Во всех случаях по линии резекции опухолевого роста не было. При исследовании толщины опухоли (Breslow) в обеих группах существенно не отличалась, составив 2,6 мм и 2,4 мм, соответственно. Период наблюдения составил 5 лет. Местный рецидив в первой группе был у 11,5 %, во второй группе – у 10,7 % человек. Отдаленные метастазы, соответственно, у 5,7 % и 5,3 %.

Выводы. Знание толщины кожи на различных участках туловища у больных меланомой позволяет уменьшить объем оперативного вмешательства без риска ухудшения отдаленных результатов.

*А.С. Алексеева¹, М.Р. Капкаева², О.Н. Щегловитова², Е.В. Свищевская¹,
Г.В. Пазынина¹, Н.В. Бовин¹, Е.Л. Водовозова¹*

СПЕЦИФИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ И НАКОПЛЕНИЕ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛИПОСОМ С ЛИГАНДОМ СЕЛЕКТИНОВ СИАЛИЛ-ЛЬЮИС X

¹Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

Актуальность. Нами показано на модели карциномы легких Льюис (LLC), что оснащение 100-нм-липосом, нагруженных липофильным пролекарством мелфалана, тетрасахаридным лигандом селектинов сиалил Льюис X (SiaLe^X) обеспечивает их транспорт (после в/в введения) к эндотелию опухолевых сосудов и последующий антивазкулярный эффект [Kuznetsova et al. J. Drug Target., 2014]. Селектины (белки адгезии) экспрессируются на активированных лейкоцитах, тромбоцитах и эндотелиальных клетках.

Цель исследования. Сравнительное исследование взаимодействия SiaLe^X-липосом и безадресных липосом с эндотелиальными клетками *in vitro* на модели клеток эндотелия кровеносных сосудов, полученных из пупочной вены человека (HUVEC).

Материалы и методы. Липосомы состава фосфатидилхолин / фосфатидилинозит / диолеилглицерид мелфалана BODIPY-меченый фосфатидилхолин / $\pm$ конъюгат SiaLe^X, 8:1:1:0.05:0.2–1 (мол.), получали экструзией через мембранные фильтры с порами 100 нм. Использовали первичную культуру клеток HUVEC, прошедшую не более 2-х пассажей. Активацию клеток фактором некроза опухоли α (hr ФНО α) проводили 4 ч при 37°C.

Результаты. С помощью конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии подтвержден рост экспрессии Е-селектинов на поверхности клеток при увеличении концентрации ФНО α (0.1–50 нг/мл). Активированные клетки в 5 раз эффективнее связывали SiaLe^X-липосомы (10% мол. SiaLe^X); прединкубация с избытком антител к Е-селектину ингибировала связывание липосом на 70%, а аналогичная обработка IgG не влияла на связывание. Увеличение содержания SiaLe^X (2–10% мол.) приводило к росту связывания липосом с HUVEC, причем только в случае активированных клеток. Спектрофлуориметрия клеточных лизатов выявила 50%-ное увеличение накопления SiaLe^X-липосом во внутриклеточной фракции активированных клеток, по сравнению с липосомами без адреса.

Выводы. Введение SiaLe^X-конъюгата в состав цитотоксических липосом обеспечивает их специфическое связывание и увеличение накопления в активированных клетках HUVEC, что согласуется с антивазкулярным эффектом этих липосом, показанным ранее *in vivo* на модели LLC.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-00069.

Б. Альбассит¹, М.Т. Зангиева, Н.В. Грищенко², М.А. Барышникова², Е.В. Игнатьева², В.С. Косоруков², В.П. Краснов³, А.Ю. Барышников^{1,2}

ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ OR-2011 ИЗ КЛАССА НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕЛАНОМЫ

¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

³Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

Цель исследования. Разработка нового липосомального противоопухолевого препарата OR-2011 из класса нитрозомочевина для лечения меланомы.

Материалы и методы. Фосфотидилхолин ЕРС, холестерин и PEG-2000-DSPE смешивали в колбе вместимостью 150 мл, добавляли хлороформ и выпаривали на ротационном испарителе на водяной бане при температуре 30±2 °С под вакуумом в течение 40 минут до образования липидной пленки. Для получения липосом пленку смывали физиологическим раствором с препаратом, а затем экстрадировали через фильтры с диаметром пор 400 нм, 200 нм и 100 нм. Размер липосом измеряли с помощью наносайзера. Для определения включения препарата в липосомы его пропускали через хроматографическую колонку, заполненную сефадексом G-50, в качестве элюента использовали раствор натрия хлорида 0,15 М. На выходе из колонки получали 2 фракции: первая – липосомы с препаратом, вторая – не включившийся препарат, в которых с помощью спектрофотометра измеряли количество препарата. Липосомы лиофилизировали на сублимационной сушке Christ GAMMA 2-16 LSC, дозируя во флаконы по 2 мл, в качестве криопротектора использовали 4% раствор сахарозы. Методом МТТ на клеточных линиях меланомы человека исследовали цитотоксическую активность полученных липосом в сравнении с субстанцией

Результаты и выводы. Выбран оптимальный состав и отработана технология получения липосомальной лекарственной формы OR-2011. С целью повышения стабильности лекарственной формы проведена лиофилизация липосомальной дисперсии. Для количественного определения содержания OR-2011 в липосомах предложен метод спектрофотометрии при длине волны 230 нм. Включение OR-2011 в липосомы составило 43,2 %, размер частиц – 150 нм. Было показано, что липосомальная лекарственная форма OR-2011 обладает более сильным цитотоксическим действием, чем субстанция.

И.И. Андреяшкина¹, Г.М. Евдокимов², С.В. Аверьянова², И.Н. Сидоров²

ОСОБЕННОСТИ ОСЛОЖНЕНИЙ У СТОМИРОВАННЫХ БОЛЬНЫХ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ХИМИОТЕРАПИИ

¹ГУЗ ООД № 2, Саратов

²ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского, Саратов

Актуальность. Около 50% больных колоректальным раком химиотерапия проводится с наличием у них временного или постоянного наружного кишечного свища (стомы).

Цель исследования. Изучить осложнения, развившиеся у больных колоректальным раком со стомой при проведении химиотерапии (ХТ).

Материал и методы. Проведён анализ частоты и выраженности осложнений при проведении ХТ у 227 стомированных больных колоректальным раком при различных схемах химиотерапии.

Результаты. При проведении химиотерапии у стомированных больных распределение по применяемым схемам химиотерапии было следующим: Mayo 95(42%) больных; FOLFIRI – 52(23 %); FOLFOX – 52(23 %); Кселода – 28(12 %). Диарейный синдром диагностирован у 106 (47 %) больных. Степень выраженности была следующей: I–II ст. – у (73 %); III–IV ст. – у (27 %). Наиболее выраженный диарейный синдром – III–IV ст. отмечался у больных при применении схемы FOLFIRI. В данной когорте больных имелись отличия выраженности диарейного синдрома в зависимости от локализации стомы, так при наличии илеостомы диарейный синдром – III–IV ст. встречался наиболее часто и составил 80 %. При этом, наряду с выраженным диарейным синдромом у 24 больных с илеостомой наблюдались выраженные «изменения» слизистой кишки и кожи вокруг нее, что потребовало применения лечебных мероприятий. Отмечался один летальный случай, причиной которого были выраженные диарейный и интоксикационный синдромы. Задержка эвакуации кишечного содержимого наблюдалась у 32(14 %) пациентов. Наиболее часто данный вид осложнения отмечался при применении схемы Мейо – 42 %. При применении капецитабина (кселода) данный вид осложнения привел острой кишечной непроходимости, который купировался консервативным методом лечения.

Выводы. При проведении химиотерапии у больных колоректальным раком с наличием стомы наиболее часто возникают осложнения, связанные с нарушением пассажа кишечного содержимого: диарейный синдром – 47 % и задержка эвакуации – 14 %. Данные осложнения требуют лечебных мероприятий, направленных на нормализацию «стула», уходом за слизистой кишки и кожи вокруг нее. При диарейном синдроме III–IV степени необходим комплексный подход в лечении, обуславливающий применение диетотерапии, коррекции водно-электролитного баланса и применении ферментных препаратов.

Н.О. Антонова¹, М.А. Лапицина², Е.Н. Кабачков², А.П. Веселов¹, В.Д. Сень², А.А. Терентьев²

ДИНАМИКА ПРОМИЕЛОЦИТАРНО-ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ ЯДЕРНЫХ ТЕЛЕЦ В КЛЕТКАХ MCF7 ПРИ ДЕЙСТВИИ КОМПЛЕКСОВ ПЛАТИНЫ РАЗНОЙ СТРУКТУРЫ

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Нижний Новгород

²Институт проблем химической физики РАН, г. Черноголовка, Московская область

Задачи исследования. Промиелоцитарно-лейкемические ядерные тельца (ПМЛ-ЯТ) – динамические субъядерные макромолекулярные белковые образования, большая часть которых связана с ядерным матриксом. С ПМЛ-ЯТ связывают функцию регуляции процессов транскрипции, апоптоза, клеточного старения, опухолевой супрессии. Их количество, размер и локализация зависят от физиологии и транскрипционной активности клетки. Целью работы было исследование влияния комплексов платины разной структуры на динамику и локализацию ПМЛ-ЯТ в опухолевых клетках.

Материалы и методы. Исследования проводили на клетках MCF7 (аденокарцинома молочной железы человека). На клетки действовали комплексами платины разной структуры – цисплатином и аминонитроксильным комплексом платины (IV) (BC131) в дозе IC₅₀ на протяжении 12 часов. Визуализацию ПМЛ-белков и ламина В проводили на фиксированных препаратах клеток и изолированного ядерного матрикса путем непрямого двойного иммунофлуоресцентного окрашивания.

Результаты и выводы. По данным флуоресцентной микроскопии в контроле в ядрах клеток MCF7 присутствует диффузный ПМЛ-белок, а ПМЛ-тельца представлены небольшим количеством и распределены по ядру. В ядрах некоторых клеток наблюдается скопление ПМЛ-ЯТ на периферии ядра. В образцах ядерного матрикса, изолированного из контрольных клеток, отсутствует диффузная фракция ПМЛ-белка, но наблюдаются крупные белковые конгломераты по периферии скелетной структуры. При действии цисплатина наблюдается деградация ПМЛ-ЯТ, диффузное распределение ПМЛ-белка по всему ядру, значительная часть ПМЛ-белка локализована в цитозоле. При действии комплекса BC131 наблюдается распад ПМЛ-ЯТ и концентрирование РМЛ-белка вокруг ядрышек и на периферии ядра. На препаратах ядерного матрикса клеток, обработанных комплексами платины, ПМЛ-белок обнаружен не был, что может быть связано с распадом ПМЛ-ЯТ и утратой связи ПМЛ-белков с ядерным матриксом. Таким образом, в эквитоксических дозах платиновые комплексы разной структуры отличаются по влиянию на динамику и локализацию ПМЛ-ЯТ и ПМЛ-белков, что может свидетельствовать о разных механизмах их цитотоксичности.

Г.Н. Апрышко

РЕСУРСЫ ИНТЕРНЕТ В ИНФОРМАЦИОННОМ ОБЕСПЕЧЕНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» РМН, Москва

Эффективное использование Интернет-доступных информационных ресурсов по химии, биологии и биологически активным веществам способно обеспечить интеграцию между коллективами специалистов разных профилей (химики, биологи, медики, ветеринары, фармацевты и др.), работающих в области экспериментальной химиотерапии опухолей и повысить эффективность исследований по поиску активных противоопухолевых веществ. Опыт показывает, что по разным причинам не все научные сотрудники полноценно используют ресурсы Интернет при поиске необходимой информации. В докладе описываются основные Интернет-ресурсы информационной среды экспериментальной химиотерапии опухолей и особенности их использования. Премущественное внимание уделяется поиску информации в специализированных, но мало используемых научными сотрудниками, ресурсах Национального института США – фактографической базе данных по противоопухолевым веществам Open NCI Database и интегрированной химико-биологической справочной системе Developmental Therapeutics Program, а также созданной совсем недавно Британской базой знаний canSAR, в которой интегрированы биологические, химические, фармакологические и клинические данные, имеющие отношение к созданию лекарств и трансляционным исследованиям в химиотерапии опухолей. Описана также база данных широкого фармакологического профиля Integrity фирмы Thomson Reuters, США, содержащая данные по противоопухолевым препаратам, находящимся на разных стадиях исследований от первичного скрининга до внедрения в клиническую практику. Охарактеризованы такие ценные ресурсы, как поисковые платформы PubChem и Chemical Structure Lookup Service, позволяющие вести поиск в разных близкопрофильных базах данных по единому запросу.

К.О. Асланян¹, М.Н. Холодцова^{2,3,4}, И.А. Аполихина⁵

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЕ АЛАСЕНСА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ФДТ ПРИ ВВК

¹ФППОВ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

²Институт Общей Физики, РАН, Москва

³Université de Lorraine, (CRAN), UMR 7039, Франция

⁴CNRS, CRAN UMR7039, Франция

⁵ФГБУ «НЦ АГ и П им. академика В.И. Кулакова» МЗРФ

Актуальность. Урогенитальный кандидоз является широко распространенным заболеванием, может возникать у лиц обоего пола и наиболее часто наблюдается у женщин репродуктивного возраста. Внедрение современных технологий в клиническую микробиологию позволило расширить исследования и показать, что отрицательное воздействие факторов внешней среды на микрофлору макро организма различной локализации, в том числе влагалища, ведет к разнообразной патологии как воспалительного, так и невоспалительного генеза.

Цель исследования. Оценка эффективности и безопасности проведения фотодинамической терапии (ФДТ) с препаратом Аласенс у женщин с хроническим вульвовагинальным кандидозом.

Материалы и методы. В исследование были включены 60 пациенток: 20 с вульвовагинальным кандидозом, 25 – бактериальным вагинозом и 15 – с неспецифическим вагинитом. Перед каждым сеансом ФДТ и после были сняты спектры флуоресценции ФС во влагалище и вульве у пациенток. Всем пациенткам проводилось 4 сеанса ФДТ диодным лазером (длина волны 400 нм) с периодичность раз в 3 дня. Эффективность лечения оценивалась на основании микроскопии мазков по Грамму, ПЦР в режиме реального времени (фемофлор), результатов бактериологических посевов, и спектрального анализа данных, т.е. флуоресцентной диагностики.

Результаты и выводы. Отмечается, что после 4 сеанса не было отличий накопления фотосенсибилизатора в слизистой влагалища больных хроническим вульвовагинальным кандидозом и здоровой ткани, таким образом, возможно сделать вывод о высокой эффективности проведенной терапии. Исходя из полученных данных, можно заключить, что именно 4 сеанса ФДТ, проводимые 1 раз в 3 дня, являются достаточными для достижения лечебного эффекта. Эффективность терапии составила 95% ($p \leq 0,01$). Кроме того, при долговременном наблюдении пациенток в течение 18 месяцев было выявлено снижение рецидивов до 5 раз. Важно также отметить высокую эффективность ФДТ в лечении бактериального вагиноза и устойчивых к другим видам терапии неспецифических кольпитов.

Г.А. Атажанова, О.Г. Рязанцев, Р.И. Сейдахметова, С.М. Адекенов

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ И ИХ КОМПОНЕНТОВ

АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Казахстан

Актуальность. Анализ сведений о противоопухолевых свойствах эфирных масел и их основных компонентов свидетельствует об ингибирующей активности роста опухолевых штаммов у D-лимонена, периллового спирта, гераниола, карвеола, фарнезола, неролидола, линалоола, β-цитронеллола и ментола. При этом, перилловый спирт является эффективным в качестве ингибитора фарнезил протеин трансферазы. Перилловый спирт в тесте на хомяках сократил рост опухоли поджелудочной железы, а также оказался эффективным в снижении роста опухоли печени и толстой кишки. Гераниол предотвратил рост культивируемых опухолевых клеток меланомы у крыс.

Задачи исследования. Скрининг 42 образцов эфирных масел и их компонентов на цитотоксическую активность.

Материалы и методы. Эфирные масла, основные компоненты и их производные. Наличие цитотоксической активности определялось в отношении личинок морских рачков *Artemia salina* (Leach) в условиях культивирования *in vitro*.

Результаты и выводы. Все исследованные на цитотоксическую активность образцы эфирных масел обладали биологическим действием в отношении личинок морских рачков *Artemia salina*. Сравнительно высокой цитотоксической активностью в ряду исследованных образцов обладают эфирные масла *Eryngium planum* L., *Ptarmica salicifolia* (Besser) Serg., *Chaeophyllum prescottii* DC, *Cnidium dubium* Schkuhr Thell, *Thymus lavrenkoanus* Klokov, *Lophanthus schrenkii* Levin, *Peucedanum morissonii* Bess, *Hyssopus cuspidatus* Boiss, *Thymus vulgaris* L., *Thymus dmitrievae* L., *Scutellaria subcaespitosa* Pavlov, *Tanacetum ulutavicum* Tzvelev, *Thymus crebrifolius* Klokov.

Среди индивидуальных компонентов эфирных масел сравнительно высокой цитотоксической активностью обладают сабинол и сабинилацетат. Из испытуемых образцов производных монотерпеноидов слабой цитотоксической активностью обладают оксим камфоры, бромид оксима камфоры, тетрабромид лимонена.

Таким образом, благодаря многообразию компонентного состава, эфирные масла являются потенциальным источником новых соединений с противоопухолевой активностью.

С.Б. Ахметова¹, С.М. Адекенов²

К ВОПРОСУ ИЗУЧЕНИЯ

БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АРГЛАБИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

¹*Карагандинский Государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан*

²*Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Казахстан*

Актуальность. Сесквитерпеновые лактоны являются перспективной группой растительных соединений в плане создания на их основе новых противоопухолевых препаратов, что связано, с их структурными особенностями и относительной доступностью данных природных соединений. Ранее авторами изучена антибактериальная, противогрибковая и противовирусная активности сесквитерпенового лактона арглабина и его производных (гидрохлорида диметиламиноарглабина, тетрабромкарбенпроизводного арглабина, метилйодида диметиламиноарглабина) по отношению к тест-культурам *S.aureus*, *B.subtilis*, *E.coli*, *Ps.aeruginosa*, выраженную способность подавлять рост в отношении грибов *A. flavus*, *T.mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis*.

Задачи исследования. оценить способность сесквитерпенового лактона арглабина и его производных (гидрохлорида диметиламиноарглабина, тетрабромкарбен производного арглабина, метилйодида диметиламиноарглабина) проявлять антибактериофаговую активность к эшерихиозному фагу (медиус, санкт-петербург).

Материалы и методы. Испытания проводили по общепринятой методике определения противофаговой активности, в эксперименте использовались эталонные штаммы *E.coli* и специфический для этой бактерии эшерихиозный жидкий бактериофаг.

Результаты и выводы. В результате исследований установлено, что изученные образцы: сесквитерпеновый лактон арглабин и его производные (гидрохлорид диметиламиноарглабина, тетрабромкарбен производное арглабина, метилйодид диметиламиноарглабина) – проявляют антибактериофаговую активность к эшерихиозному т-четному бактериофагу, результаты экспериментального исследования коррелируют с данными антивирусной активности сесквитерпенового лактона арглабин и его производных (гидрохлорида диметиламиноарглабина, тетрабромкарбен производного арглабина, метилйодида диметиламиноарглабина).

В результате, изучение биологических свойств арглабина и его производных показало, специфическая активность проявленная в экспериментальных системах *in vitro* в том числе и на модели эшерихиозного бактериофага доказывает, что активность арглабина и его производных зависит как от особенностей строения их молекулы.

Н.А. Бабушкина

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Институт проблем управления им. В.А. Трапезникова РАН

На протяжении многих лет борьбы с онкологическими заболеваниями происходит совершенствование уже хорошо изученных методов лечения и активная разработка новых методов противоопухолевой терапии. Все методы лечения направлены на максимальное уничтожение опухолевых клеток. Для каждого метода характерны различные механизмы воздействия на опухолевые клетки, вызывающие их гибель. При сравнении эффективности различных методов противоопухолевой терапии, как в экспериментальных исследованиях, так и в клинической практике необходимо использовать единый количественный критерий оценки эффективности лечения. В данной работе представлен количественный критерий оценки эффективности лечебного воздействия на основе математических моделей, описывающих экспериментальные кинетические роста опухоли в контроле и после лечебного воздействия. Эффективность лечебного воздействия определяется длительностью задержки роста опухоли от начала введения препарата до момента, когда опухоль после частичной или длительной ремиссии снова достигает исходного размера в момент начала лечения. Длительность задержки роста опухоли легко определяется в эксперименте и согласуется с клиническим подходом к оценке эффективности лечения. В работе приведены результаты оценки эффективности противоопухолевой терапии по предложенному критерию, разработанному на основании математического описания механизмов гибели опухолевых клеток при высокодозовой химиотерапии, химиотерапии на ферромагнитных частицах (ФМЧ) и при вакцинотерапии вирусом венесуэльского энцефаломиелимита лошадей (ВЭЛ), который вызывает двухэтапную иммунную реакцию в организме. Получены зависимости «доза – эффект» и определены значения параметров этих функций, что является необходимой основой для последующих расчетов оптимальных режимов применения лечебных воздействий. Сравнительный анализ эффективности трех методов противоопухолевой терапии по данному критерию, полученный в результате расчетных экспериментов на математической модели показал, что метод вакцинотерапии вирусом ВЭЛ является наиболее эффективным по сравнению с высокодозовой химиотерапией и химиотерапией на ФМЧ. Использование математического моделирования для описания механизма гибели опухолевых клеток позволяет выявить влияние на эффективность лечебного воздействия множества сопутствующих параметров, которые отражают специфику метода противоопухолевой терапии. Проведение исследований с использованием математического моделирования для оценки эффективности различных доз и методов лечебных воздействий может являться необходимой составляющей экспериментальных исследований, как на этапе первичного скрининга препаратов, так и на последующих этапах изучения эффективных режимов противоопухолевой терапии. Расчетный эксперимент на математической модели позволяет сокращать время проведения исследований, рационально планировать проведение эксперимента и тем самым сокращать количество животных и препаратов, что является экономически целесообразным.

А.Н. Балаев, В.Н. Осипов, В.Е. Федоров

**МЕТОД ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ЦИКЛИЗАЦИИ
И ОДНОВРЕМЕННОГО УДАЛЕНИЯ ЗАЩИТНОЙ АСМ-ГРУППЫ
ПРИ СИНТЕЗЕ СУБСТАНЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА ОКТРЕОТИДА
ЗАО «ФАРМ-СИНТЕЗ», МОСКВА**

Задачи исследования. Разработка нового метода окислительной циклизации и снятия Асм защитной группы используемого на последней стадии синтеза противоопухолевого препарата Октреотида, исключаящее применение токсичных и пожароопасных реагентов и растворителей.

Материалы и методы. Октреотид – синтетический циклический пептид, аналог природного гормона Соматостатина, обладающий большей избирательностью и продолжительностью действия. Октреотид применяют при лечении опухолей гастро-энтеро-панкреатической системы (в т.ч. карциноидные опухоли, глюкагономы, инсуломы, гастриномы). Известные в настоящее время методы основаны либо на 2-стадийном синтезе с применением высокотоксичных солей ртути, сероводорода и взрывоопасной перекиси водорода, либо на одностадийном процессе с использованием раствора йода в метиловом спирте, который также является токсичным и горючим растворителем. Поэтому разработка нового более безопасного метода синтеза, особенно при масштабном производстве, является актуальной задачей.

Результаты. Разработанный нами новый одностадийный метод окислительной циклизации и одновременного деблокирования с образованием –S-S– связи основан на использовании водного раствора трёхлористого калия. Этот метод исключает токсичные и горючие реагенты, является технологически приемлемым и легко масштабируемым. Следует отметить, что метод является универсальным для водорастворимых пептидов и позволяет также получать другие аналоги гормона Соматостатина содержащие –S-S– связи.

Выводы. В результате проделанной работы разработан новый метод синтеза Октреотида (и др. аналогов Соматостатина), основанный на использовании водного раствора трёхлористого калия для одновременной окислительной циклизации и снятия Асм защиты. Предложенный способ отличается простотой, более безопасный, является легко масштабируемым и технологически приемлемым.

А.А. Балакина, В.А. Мумятова, Ю.И. Кукушкина, В.Д. Сень, А.А. Терентьев

**ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ
В КЛЕТКАХ ЛИНИИ MCF-7 ПРИ ДЕЙСТВИИ КОМПЛЕКСОВ ПЛАТИНЫ (IV)**

Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Московская область

Актуальность. Известно, что активные формы кислорода (АФК) являются важными посредниками в путях клеточной гибели. Кроме того, АФК участвуют в пролиферации опухолевых клеток через активацию сигнальных путей митоза. Изучение роли АФК, анти- и прооксидантов в механизмах клеточной гибели позволит создавать новые препараты для таргетной терапии, основанные на изменении редокс-статуса клеток опухоли.

Цель исследования. Изучение функционирования антиоксидантной системы опухолевых клеток при действии комплексов платины(IV) в норме и при подавлении белка p53.

Материалы и методы. В работе использовали линию опухолевых клеток MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека). Для определения уровня экспрессии генов *sod1*, *sod2*, *cat*, *gpx1* использовали метод ПЦР в реальном времени. Подбор пар праймеров проводили с помощью программы PrimerBLAST. Выделение РНК из клеток проводили с помощью GeneJET RNA Purification Kit (Fermentas). Обратную транскрипцию и ПЦР-РВ проводили с использованием готовых смесей (Евроген) по методике производителя. Сатраплатин и аминонитроксильные комплексы платины наносили в дозе IC50 с экспозицией 12 ч. Опыты проводили в трехкратной повторности.

Результаты и выводы. Определено, что все исследуемые соединения приводили к активации транскрипции генов *sod1*, *sod2*, *cat* и *gpx1*, что может являться доказательством важной роли АОС в механизмах клеточного ответа на действие комплексов платины(IV). Было проведено исследование влияния комплексов платины(IV) на экспрессию генов АОС при подавлении функций белка p53. Роль p53 в регуляции экспрессии генов АОС предполагала наличие изменений количества матричной РНК в присутствии пифитрина. Было выявлено, что подавление функций белка p53 приводит к существенному снижению экспрессии исследуемых генов, что говорит как о важной роли p53 в регуляции транскрипции генов АОС, так и о роли компонентов АОС в механизмах клеточного ответа на генотоксические воздействия.

М.А. Барышникова, Н.В. Грищенко, А.П. Полозкова

ВЛИЯНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ АРАНОЗЫ НА ИНДУКЦИЮ АПОПТОЗА

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

Цель исследования. Изучение апоптоза, индуцированного действием двух лекарственных форм аранозы, на клеточных линиях меланомы человека, обладающих различным иммунологическим фенотипом.

Материалы и методы. Исследование проводили на клеточных линиях меланомы человека Mel Mtp, Mel Ibr и Mel Z, полученных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН [Михайлова И.Н. и др., 2005]. Клеточные линии культивировали в стандартных условиях. Для эксперимента клетки пересаживали в 6-луночные планшеты, через сутки в лунки с клетками добавляли лекарственные формы аранозы – лиофилизат для приготовления раствора для инъекций (араноза-лио) и липосомальную. Контролем служили интактные клетки, которые инкубировали в тех же условиях, но без препарата. Через 24 ч проводили определение апоптоза методом двойного окрашивания аннексином V-FITC и пропидиумом йодидом (An/PI). Оценку проводили по следующим критериям: живые клетки – An⁺/PI⁻, ранние апоптотические клетки – An⁺/PI⁺, поздние апоптотические или некротические клетки – An⁺/PI⁺.

Результаты. Под действием аранозы-лио через 24 ч инкубации количество клеток в раннем апоптозе (An⁺/PI⁺) на клеточных линиях Mel Mtp, Mel Ibr и Mel Z составляло 32%, 33% и 31% соответственно; количество клеток в позднем апоптозе (An⁺/PI⁺) составляло 10%, 11% и 9% соответственно. При инкубации с липосомальной аранозой через 24 ч количество клеток линии Mel Mtp в раннем апоптозе (An⁺/PI⁺) составляло 53%, линии Mel Ibr – 41% и линии Mel Z – 39%; количество клеток в позднем апоптозе (An⁺/PI⁺) составляло 13% для линии Mel Mtp, 16% для линии Mel Ibr и 18% для линии Mel Z.

Выводы. Показано, что обе лекарственные формы аранозы вызывают гибель клеток меланомы человека через 24 ч инкубации преимущественно по механизму раннего апоптоза. Однако липосомальная лекарственная форма аранозы вызывает более выраженную индукцию и раннего и позднего апоптоза, чем араноза-лио. Это может быть связано с тем, что липосомальная араноза попадает в клетку путем, отличным от аранозы-лио. Также показано, что Араноза-лио вызывает одинаковую индукцию апоптоза на всех исследованных клеточных линиях, в то время как липосомальная араноза больше всего индуцирует ранний апоптоз на клеточной линии Mel Mtp, у которой отсутствует CD95 рецептор, отвечающий за клеточную гибель по механизму внешнего апоптоза.

Ю.В. Береснева, Ф.А. Ибрагимов, Ю.Ю. Ассесорова

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ 5-ФТОРУРАЦИЛА И СОЕВОГО БЕЛКА, БОГАТОГО ИЗОФЛАВОНАМИ, НА ПОЗДНИХ СРОКАХ РАЗВИТИЯ ОПУХОЛИ

Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

Актуальность. В Институте биоорганической химии АН РУз получена стандартизированная комбинация полипептидов из соевой муки с молекулярной массой 12,5–79,0 кДа, обогащенная изофлавоном (содержание дайдзеина на грамм белка составляет в среднем 1,50±0,3 мг, генистеина – 0,52±0,02 мг).

Задачи исследования. Сравнительная оценка противоопухолевого действия соевого белка, богатого изофлавоном, вводимого в монорежиме и в комплексной терапии с 5-фторурацилом на позднем этапе развития опухоли.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 60 беспородных мышах обоего пола, с первоначальной массой 16–21 г. Трансплантацию солидной опухоли Саркома 180 (С180) производили гомогенатом опухолевой ткани в стерильном физиологическом растворе подкожно в область бедра по 0,2 мл. Противоопухолевая терапия проводилась при моновоздействии (I группа – соевый белок, II группа – 5-фторурацил) и комплексном воздействии (III группа – соевый белок совместно с 5-фторурацилом) изучаемых веществ. Соевый белок растворяли в дистиллированной воде и вводили зондом в желудок мышам с саркомой 180 в дозе 75 мг/кг (I и II группы) на 10-й день после перевивки опухоли. Пероральное введение продолжали ежедневно в течение 10 дней. 5-фторурацил вводили животным внутривентрально на 10-й, 12-й и 14-й день после перевивки опухоли, в дозе 228 мг/кг (II и III группы животных). Контрольная группа животных (IV группа) получала эквивалентное количество дистиллированной воды в дни введения соевого белка. Забой проводился на 28-й день после перевивки опухоли.

Результаты. Настоящее исследование показало, что через 8 дней с момента окончания лечебного воздействия, соевый белок, вводимый в монорежиме, вызывает торможение роста опухоли до 71,3 % по массе и до 73,0 % по объему. При введении соевого белка совместно с 5-фторурацилом, значение ТРО по массе составило 91,9 %, а по объему – 92,6 %. Терапия, проводимая только 5-фторурацилом, вызвала торможение роста опухоли на 86,2 % по массе и на 85,6 % по объему.

Вывод. Дополнение цитостатической химиотерапии модификаторами природного происхождения, в данном случае соевым белком, богатым изофлавоном, усиливает противоопухолевое воздействие и улучшает результаты лечения в целом.

*Т.Н. Богатыренко¹, Л.М. Байдер³, З.В. Куроптева³, Н.П. Коновалова¹,
И.В. Серков², Т.Е. Сашенкова¹, Д.В. Мищенко¹*

ОПТИМИЗАЦИЯ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЦИТОСТАТИКОВ С ПОМОЩЬЮ ОРИГИНАЛЬНЫХ НПВС

¹Институт Проблем Химической Физики РАН, Черноголовка, Московская область

²Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Московская область ³Институт Биохимической физики РАН, Москва

Задача исследования. Исследовать возможность усиления цитотоксического действия циклофосфана с помощью модифицированного нестероидного противовоспалительного соединения (НСПВС)-Ind-NO.

Материал и методы. Противоопухолевую активность изучали на лимфолейкозе мышей Р-388 линии BDF₁. Критерием эффективности лечения служило увеличение средней продолжительности жизни (СПЖ) и число излеченных животных. Исследуемые соединения вводили внутривентально 7-кратно в дозе 40 мг/кг. Циклофосфан (ЦФ) в субтерапевтической дозе 20 мг/кг вводили двукратно на первые и шестые сутки после перевивки опухоли.

Результаты. В рамках проводимого нами поиска эффективных хемосенсибилизаторов противоопухолевых соединений, обладающих полифункциональной активностью было исследовано влияние комбинации ЦФ с Ind-NO на мышей с лимфолейкозом Р-388. Индометацин-NO (Ind-NO) – оригинальное соединение, синтезированное в Институте физиологически активных веществ РАН. Содержит в своей структуре типичное нестероидное противовоспалительное вещество (НСПВС) индометацин, в боковую цепь которого введена группировка, содержащая нитратную функцию. За счет введения нитратной группировки Ind-NO является донором оксида азота. Механизм многофакторного действия НСПВС до конца не ясен. Известно, что большинство НСПВС являются ингибиторами циклооксигеназной активности (COX-1 или COX-2) – одного из ключевых ферментов метаболизма арахидоновой кислоты – простагландин-Н-синтазы. При лечении животных одним ЦФ в субтерапевтической дозе СПЖ увеличивалась в три раза по сравнению с нелеченым контролем. Выживших животных не было. Сам по себе Ind-NO в исследуемой дозе не проявлял антилейкемической активности. Животные так же гибли одновременно с контролем. А вот комбинация ЦФ с Ind-NO увеличивала СПЖ на 40 % по сравнению с монотерапией ЦФ. В предыдущих работах при исследовании изменений метаболических парамагнитных центров в тканях печени и крови животных после введения доноров оксида азота нами было показано снижение сигнала ЭПР цитохрома Р-450 и образование функционально неактивного комплекса цитохрома Р-450-NO. Динамика изменения (ингибирования) сигнала цитохрома Р-450 в печени прослеживалась вплоть до 5-ти часов после введения препарата. Мы предполагаем, что пролонгация ингибирования цитохрома Р-450 является одной из возможных причин повышения химиотерапевтического действия ЦФ и уменьшения его токсичности.

Выводы. Таким образом, использование модифицированных НСПВС, обладающих разными типами активности для усиления действия цитостатика ЦФ даже в субтерапевтических дозах может приводить к интересным результатам – увеличивать среднюю продолжительность жизни животных на 40 %.

Т.А. Богущ, А.С. Шатурова, Е.А. Дудко, А.Б. Равчеева, А.В. Конухова, Б.Е. Полоцкий

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ БЕТА В ТКАНИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЁГКОГО И МЕТАСТАЗОВ В ЛЁГКОМ ОПУХОЛЕЙ ДРУГОЙ ПЕРВИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

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

Задачи исследования. Открытие нового класса эстрогеновых рецепторов (ЭР) – ЭРβ, создало предпосылки для развития новой стратегии лечения первичного и метастатического поражения лёгкого – антиэстрогеновой терапии. В настоящем исследовании проведена сравнительная количественная оценка экспрессии ЭРβ в ткани немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ), а также метастазов в лёгком опухолей другой первичной локализации. Главный вопрос, на который мы попытались ответить – какое число пациентов с указанной патологией лёгких являются потенциальными кандидатами на проведение антиэстрогеновой терапии.

Материалы и методы. Проведена иммунофлуоресцентная количественная оценка уровня, интенсивности и частоты экспрессии ЭРβ в ткани НМРЛ, а также метастазов в лёгком опухолей другой первичной локализации (суммарно 83 образца) с использованием проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Экспрессия ЭРβ выявлена в подавляющем числе исследованных опухолей и метастазов в лёгком – у 92 и 86 % пациентов соответственно. Средний уровень экспрессии ЭРβ в ткани НМРЛ составил 42,0 %, а в метастазах оказался ниже – 34,6 % (p=0,03), при этом различий между интенсивностью экспрессии ЭРβ в группах сравнения не выявлено (p=0,06). Первичные опухоли с высоким уровнем экспрессии ЭРβ (более чем в 50 % клеток) и суммарно с низким и умеренным показателем (в 10–29 % и 30–49 % клеток соответственно) выявлены в 35 и 65 % случаев, а метастазы с аналогичными показателями экспрессии ЭРβ – у 14 и 86 % пациентов соответственно. Аналогично, у пациентов с НМРЛ опухоли с высокой интенсивностью экспрессии ЭРβ выявлены в 1,5 раза чаще, чем при метастатическом поражении органа – в 60 и 40 % случаев соответственно.

Выводы. Экспрессия в опухоли ЭРβ прогнозирует более благоприятное течение болезни, одной из причин этого может быть больший метастатический потенциал опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии ЭРβ. Около 70 % пациентов с НМРЛ и с метастатическим поражением органа являются потенциальными кандидатами на проведение антиэстрогеновой терапии в адъювантном режиме.

Исследование поддержано грантами РФФИ (№ 13-04-01004-а, 12-04-00028-а, 14-04-31734-мол-а) и стипендией Президента РФ (СП-376.2012.4).

*Л.З. Болиева¹, Ю.М. Букреев², Н.К. Власенкова²,
И.М. Лученко², В.В. Решетникова², Н.Ю. Соколов³, А.В. Сергеев²*
**АНТИКАНЦЕРОГЕННАЯ И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ
 НОВЫХ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

¹Северо-Осетинская государственная медицинская академия, Владикавказ

²ФГБУ «РОНЦ им Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

³ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь им. акад. Н.Н. Бурденко» МО России, Москва

Актуальность. Многочисленные эпидемиологические исследования убедительно продемонстрировали наличие обратной зависимости между количеством потребляемых с продуктами питания аскорбиновой кислоты (АК), альфа-токоферола (ТФ), ликопина (ЛП), бета-каротина (БК) и риском развития рака различных локализаций. В РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН разработана серия лечебно-профилактических препаратов на основе перечисленных биологически активных веществ: «Бетаск» (БТ), «Каскатол» (КАС), «Каскорутол» (КАР), «Томатол» (ТОЛ).

Цель исследования. Изучение антиканцерогенной и иммуномодулирующей активности разработанных препаратов.

Материалы и методы. Препараты БТ, КАС, КАР получены от фирмы ЗАО «Холдинг-«ЭДАС», ТОЛ получен от фирмы ООО «Инвест». Опухоли печени и пищевода индуцировали у крыс линии Вистар N-нитрозодиэтиламино, который добавляли к питьевой воде в концентрации 100 мг/л в течение 4 месяцев. Препараты давали крысам вместе с кормом ежедневно в дозе 0,4 г/кг по БК в течение всего эксперимента. Продолжительность опыта составляла 38–46 недель. Иммуномодулирующую активность изучали по ранее описанным методикам.

Результаты. Все препараты при систематическом введении животным достоверно ингибировали на 20–45% химический канцерогенез как при использовании их в фазе инициации и промоции, так и при применении только на стадии промоции. Антиканцерогенная активность препаратов проявлялась в снижении частоты, множественности и темпов роста опухолей, в удлинении латентного периода их появления, замедлении малигнизации неопластических изменений. Индекс множественности (число опухолей на одну крысу) при использовании БТ, КАС и КАР снижался в 1,8–2,5 раза по сравнению с контролем. Средний латентный период появления опухолей в контроле составлял 94,2±21,8 дней, а при использовании БТ и КАС 130±21,2 и 142±29,5 дней. Антиканцерогенная активность препаратов проявлялась в зависимости от гистогенеза и органной локализации опухолей. БТ, КАС и КАР повышали в 2–4 раза функциональную активность цитолитических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и перитонеальных макрофагов как у интактных мышей, так и в условиях вторичного иммунодефицита, индуцированного у животных противоопухолевым цитостатиком аранозой или циклофосфаном. Были проведены наблюдения по оценке возможности использования разработанных препаратов в группах онкологического риска («злостные» курильщики, женщины с мастопатиями и др.). При длительном систематическом применении КАС, КАР или ТОЛ отмечено повышение уровня БК в плазме крови, улучшение показателей антиоксидантной системы и коррекция показателей иммунологического статуса.

Выводы. Проведенные исследования позволяют рассматривать разработанные лечебно-профилактические препараты в качестве потенциальных средств химиопрофилактики рака.

Е.И. Борисенко, О.В. Кочеткова, И.В. Шапошникова, Ю.Н. Потапов

СТАТУС HER2 РАКА ЖЕЛУДКА

Воронежское областное патологоанатомическое бюро

Воронежский областной клинический онкологический диспансер

Актуальность. Повышение эффективности лекарственного лечения больных раком желудка возможно при использовании совместно с цитостатической терапией таргетных препаратов. В настоящее время трастузумаб является единственным из этой группы лекарственных средств, одобренным для лечения распространенного рака желудка.

Задачи исследования. Изучить HER2-статус в злокачественных эпителиальных опухолях желудка.

Материалы и методы. Материалом послужили эпителиальные опухоли желудка, оперативно удаленные у 231 больного с I–III стадиями процесса. Мужчин – 131, женщин – 100. Моложе 40 лет – 8 пациентов, старше 40 – 223 человека. Средний возраст пациентов 63 года. После рутинного гистологического исследования и подтверждения диагноза карциномы желудка исследовали HER2 статус новообразования по стандартному алгоритму и методике. В опухолях с неопределенным HER2-статусом 2+ исследовали амплификацию гена HER2 методом гибридизации *in situ* (FISH).

Результаты. Аденокарциномы различной степени дифференцировки были у 191 из 231 больных. У 15 пациентов была недифференцированная карцинома, у 23 – перстневидноклеточная, нейроэндокринная карцинома – у 2 больных. Неопределенный HER2-статус (2+) выявлен в 11 аденокарциномах – у 8 мужчин и 3 женщин. Методом FISH амплификация гена HER2 обнаружена у 3 мужчин. Гиперэкспрессия белка HER2/neu (3+) имела место в 17 аденокарциномах – у 8 мужчин и 9 женщин. Таким образом, HER2-позитивный статус выявлен у 20 из 191 (10,47 %) больных с аденокарциномой желудка. Средний возраст пациентов с HER2 позитивным статусом составил 63 года. Высокодифференцированная аденокарцинома имела у 5 больных (25 %), умеренно дифференцированная аденокарцинома – у 10 (50 %), низкодифференцированная – у 5 (25 %), I стадия у 4 человек (20 %), II стадия – у 11 человек (55 %), III стадия – у 5 человек (25 %).

Выводы. Большая часть раков желудка представлена аденокарциномами различной степени дифференцировки. Гиперэкспрессия HER2 имела место только в этой гистологической подгруппе у каждого 10 пациента. Не выявлено значимой зависимости между HER2-статусом рака и степенью дифференцировки опухоли, полом, возрастом пациентов.

В.А. Борисов¹, О.А. Гусева², С.В. Хайдовков²

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ С ВТОРИЧНЫМИ ИММУНОДЕФИЦИТАМИ ОНКОГЕННОЙ И НЕОНКОГЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ.

¹Центр Избирательной Хронотерапии, Москва, Россия;

²ФГБУ Федеральный Научно-Клинический Центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева. МЗ РФ, Москва

Цель исследования. Оценка основных и малых субпопуляций иммунокомпетентных клеток при иммунологических нарушениях у больных с вторичными иммунодефицитами, вызванными заболеваниями онкогенной и неонкогенной этиологии.

Материалы и методы. Обследовано 8 человек со злокачественными солидными опухолями (группа 1) и 8 человек без злокачественных новообразований (группа 2). Идентификацию субпопуляций лимфоцитов венозной крови проводили методом проточной цитофлуориметрии. Клетки окрашивали мАТ производства компании Beckman Coulter (США) с последующей регистрацией на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США).

Результаты. У больных группы 1 отмечено увеличение содержания Т-клеток за счет цитотоксических Т-лимфоцитов и незначительное снижение Th, относительно нормативных значений. Выявлено достоверное снижение T_{reg}-клеток, а также повышение CD3⁺HLA-DR⁺ Т-лимфоцитов и Th-эффекторов. Среди В-клеток наблюдалось достоверное снижение количества В2-клеток и В-клеток памяти при одновременном увеличении доли В1-клеток. Отмечено выраженное снижение цитокинпродуцирующих НК-клеток. Напротив, у лиц группы 2 выявлено повышение количества T_{reg}-клеток и цитокинпродуцирующих НК-клеток. Кроме того, наблюдалось снижение уровня наивных Th с одновременным увеличением доли Th-эффекторов. В обеих группах отмечалось повышение уровня CD8⁺ НК-клеток, а также NKT-лимфоцитов.

Выводы. Таким образом, выявлены достоверные различия в составе клеточного звена иммунитета при формировании вторичных иммунодефицитов, у пациентов с заболеваниями онкогенной и неонкогенной этиологии. Полученные данные могут служить отправной точкой в разработке тактики иммунореабилитационных мероприятий, направленных на компенсацию недостаточной иммунореактивности и адекватное восстановление клеточно-опосредованных иммунных реакций в организме. Предложенный алгоритм исследований позволяет проводить мониторинг состояния иммунной системы пациентов в процессе иммунореабилитационных мероприятий.

Л.М. Борисова¹, М.П. Киселева¹, В.П. Герасименя², С.В.Захаров², З.С.Смирнова¹

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ

ЭКСТРАКТА МИЦЕЛИЯ ВЕШЕНКИ «ОВОДОРИН®» СИРОП НА ЛИМФОЛЕЙКОЗ Р388

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

²ООО «Инбиофарм», Москва

Актуальность. В настоящее время внимание многих исследователей направлено на изучение способности экстрактов базидиальных грибов подавлять рост злокачественных опухолей. Среди таких грибов выделяется вешенка устричная, или обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*), из экстракта мицелия которой в ООО «Инбиофарм» был получен препарат ОВОДОРИН® сироп. Проведенные ранее исследования показали способность компонентов экстракта *Pleurotus ostreatus* 1137 блокировать пролиферацию и индуцировать апоптоз в различных культурах раковых клеток.

Цель исследования. Изучить противоопухолевую активность препарата ОВОДОРИН® сироп в отношении лимфолейкоза Р388.

Материалы и методы. Исследование проводили на мышах-гибридах BDF1 (C57Bl/6 × DBA/2) массой 18–20 гр. Р-388 перевивали подкожно по 106 опухолевых клеток в 0,2 мл среды 199. Критериями оценки служили: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ,%) опытных мышей по сравнению с контрольными животными. Препарат ОВОДОРИН® сироп вводили внутрь в дозах 50 мг/кг, 60 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг, 100 мг/кг и 120 мг/кг при разных режимах.

Результаты. ОВОДОРИН® сироп проявлял равный противоопухолевый эффект в дозах 80 мг/кг, 90 мг/кг и 100 мг/кг при ежедневном введении в течение 5 дней: ТРО = 62 %, 66 % и 60 % соответственно, непосредственно после окончания введения препарата и не оказывал влияния на УПЖ. Увеличение длительности введения препарата до 10 и 15 дней не вызывало увеличения противоопухолевого эффекта. При этом терапевтический эффект равный 60 % ТРО наблюдали только непосредственно после 5-кратного введения. Наибольшая эффективность получена при предварительном введении ОВОДОРИН® сиропа в дозе 100 мг/кг в течение 3 дней до перевивки и 7 дней после перевивки опухоли, когда ТРО составило 66 %, и наблюдали тенденцию увеличения продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными животными (УПЖ=13%). Выявлена также тенденция увеличения массы тела опытных мышей, получавших ОВОДОРИН® сироп, по сравнению с контрольными животными в течение 12 дней опыта.

Выводы. Результаты по противоопухолевой активности ОВОДОРИН® сиропа дают основание продолжить исследования препарата при комбинированной терапии опухолей с целью возможности рекомендовать его как препарат сопровождения при химиотерапии.

Ю.А. Борисова, И.Ж. Шубина, Г.Б. Смирнова, М.В. Киселевский, Е.М. Трещалина

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА
ПРОЭСТРОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ СЕКОИЗОЛАРИЦИРЕЗИНОЛА
В СРАВНЕНИИ С ТАМОКСИФЕНОМ ПО ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКЕРАТИНОВ SK19+
В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ МЫШЕЙ *IN VIVO***

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

Актуальность. Одной из задач доклинического изучения нового антиэстрогена, функционального аналога тамоксифена (ТАМ), секоизолаорицирезинола (СЕКО) было исключение характерного для лигнанов дозозависимого проэстрогенного действия, поддерживающего метастазирование, в т.ч. рака молочной железы. Исследование выполнено с одним из наиболее эффективно используемых молекулярных внутриклеточных маркеров цитокератином 19 (СК19), избирательно экспрессирующемся в неизмененной ткани молочной железы и опухолях и появляющимся в клетках крови и костном мозге только при микрометастазировании.

Задачи исследования. Оценить *in vivo* возможное проэстрогенное действие СЕКО в сравнении с ТАМ при дозовом диапазоне, ориентированном на применение в качестве антиэстрогена.

Материалы и методы. Использованы 4 группы мышей-самок BDF₁: группы 1–3 (n=15, с Ca755 РЭ⁺), группа 4 (n=3, без опухоли). Мышам группы 1 и 2 проведен 10-дневный курс лечения СЕКО в разовой дозе 250 мг/кг или ТАМ в разовой дозе 50 мг/кг соответственно. Эффективность ингибирования роста опухоли (n=10) оценена с помощью стандартного критерия ТРО% в сравнении с мышами без лечения (группа 3). Экспрессия СК19 определена через 24 ч после курса в периферической крови и костном мозге всех мышей (n=5) по величине средней геометрической интенсивности флюоресценции (ИФ_{ср.геом}) с помощью флюоресцирующих FITC-меченых МКА методами проточной цитометрии и имуно-флюоресценции со световой и люминисцентной микроскопией. Данные представлены в виде гистограмм, обработаны статистически по методу Фишера и проанализированы с помощью программы WinMDI 2.8. Достоверными считали различия при p<0,05.

Результаты. Показано, что показатели экспрессии СК19, рассчитанные по интенсивности флюоресценции, были практически идентичными у всех мышей с опухолью без лечения или получивших эффективное лечение препаратами с ТРО=59%, (p<0,05). В клетках крови ИФ_{ср.геом}=32,48±3,75 против 30,14±2,33 и 39,07±2,30, в клетках костного мозга ИФ_{ср.геом}=31,94±5,02 против 28,87±13,70 и 28,02±9,50, соответственно. У здоровых мышей эти показатели равны «0».

Выводы. В результате проведенного исследования установлено, что у мышей с эстрогензависимой молочной железой Ca755 РЭ⁺ в клетках костного мозга и периферической крови обнаружена практически одинаковая экспрессия эпителиального маркера СК19 независимо от лечения каким-либо препаратом. Таким образом, СЕКО или ТАМ в эффективных дозах и схемах лечения этой опухоли не изменяли количество СК19 клеток и, соответственно, не проявляли проэстрогенного действия.

А.А. Боровский, А.С. Федюлов, Т.В. Трухачева, С.В. Шляхтин, И.И. Сакович,

А.В. Борисов, С.А. Гузов, Д.П. Веевник, А.В. Шамкалович

**РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ ГОЛОВНОГО
МОЗГА
С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ**

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

НФЦ РУП «Белмедпрепараты», Минск, Беларусь

УЗ «ГК БСМП», Минск, Беларусь

Цель исследования. Изучить эффективность технологии лечения первичных опухолей головного мозга на основе интраоперационной лазерной фотодинамической терапии с использованием фотосенсибилизатора второго поколения Фотолон.

Материалы и методы. В основную группу включены 43 пациента, с глиомами III–IV степени по классификации ВОЗ, 1993 г. В контрольную группу включен 71 пациент с глиомами III–IV степени. Достоверных различий между группами по полу, возрасту, общему состоянию пациентов не было. В качестве источника оптического излучения использовался лазер с длиной волны 670±30 нм. производства НПЦ «ЛЭМТ», с мощностью на выходе 0,6–2,5 Вт. Препарат применяли в диапазоне доз 1,8–2,5 мг/кг массы тела больного. Фотосенсибилизатор растворяли в 30–60 мл 0,9% раствора хлорида натрия и вводили внутривенно в течение 10 минут. Лазерное облучение проводили через 15–20 минут от начала введения ФОТОЛОНА в рассчитанном отрезке времени и мощности излучения до достижения общей поглощенной световой дозы 50–250 Дж/см². Основные конечные точки: выживаемость. Суррогатные конечные точки: дермато/гемато/ликторологические осложнения.

Результаты. Кумулятивная доля выживших пациентов основной группы при 1-годовом наблюдении составила 76,8 %, медиана выживаемости – 77,3 недели. В контрольной группе, кумулятивная доля выживших при 1-годовом наблюдении составила 25,0 %, медиана выживаемости – 22,0 недели. Интра/периоперационной смертности в обеих группах не отмечено. Все больные выписаны после заживления операционных ран и улучшения общего состояния в среднем на 14,7 ± 4,2 сутки после операции.

Выводы. Выживаемость пациентов основной группы оказалась достоверно выше, чем выживаемость пациентов контрольной (значение логарифмического критерия рангов z=-5,93; различия достоверны при уровне значимости p=0,01). Введение фотолон не сопровождалось значимыми сдвигами показателей системной гемодинамики, респирации, фототоксическими осложнениями.

Е.В. Бочаров¹, А.В. Ревущин², Р.В. Карпова¹, Ю.Н. Соловьев¹,
А.А. Вершинская¹, С.В. Чулкова¹, Г.В. Павлова², О.А. Бочарова¹

ЛЕЧЕБНЫЙ РЕЖИМ ВВЕДЕНИЯ КОМПЛЕКСНОГО ФИТОАДАПТОГЕНА СПОСОБСТВУЕТ ЛЕЙКОЦИТАРНОЙ ИНФИЛЬТРАЦИИ ОПУХОЛЕЙ ПЕЧЕНИ У ВЫСОКОРАКОВЫХ МЫШЕЙ

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

²ФГБУ Институт биологии гена РАН, Москва

Задачи исследования. Изучить морфологические изменения в ткани печени высокораковых мышей СВА при лечебном воздействии комплексного фитоадаптогена.

Материалы и методы. Комплексный фитоадаптоген фитомикс-40 – стандартизованный препарат, включающий компоненты 40 растительных экстрактов; обладает иммуномодулирующим, адгезиогенным, интерферогенным, антимуtagenным, антиоксидантным, радиопротекторным эффектами. В работе использовали 140 мышей: 1 группа (n=70) – контрольная; 2 группа (n=70) – опытная, мыши получали фитомикс-40 с водой курсами, начиная с 6-месячного возраста (периода возникновения первых опухолей) до естественной гибели животных. Исследование проводили на парафиновых срезах гепатокарцином мышей. Часть срезов окрашивали гематоксилин-эозином для морфологического исследования. На других срезах проводили иммуногистохимическое выявление CD8, CD11a, CD11b антигенов на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, с использованием антител, меченых пероксидазой.

Результаты. В возрасте 4 месяцев у мышей обеих групп опухоли не были выявлены. В возрасте 8 месяцев у 10 % животных контрольной группы обнаружены трабекулярные гепатокарциномы умеренной дифференцировки. В возрасте 22 месяцев у всех мышей контрольной группы и у 69,2 % мышей опытной группы выявлены умеренно и низкодифференцированные трабекулярные и трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы. Вместе с тем в печени мышей опытной группы выявлена массовая лейкоцитарная инфильтрация опухолей и признаки деструкции. Фенотипирование мигрировавших лимфоцитов иммуногистохимическим методом определило наличие лейкоцитарных интегринов CD11a CD11b, а также CD8 антигена на их поверхности. В печени мышей контрольной группы инфильтрации лимфоцитами опухоли не наблюдали.

Выводы. Лечебное воздействие комплексного фитоадаптогена способствует инфильтрации опухолевых узлов цитотоксическими CD8+ лимфоцитами, что обеспечивается адгезионными механизмами с участием CD11a и CD11b лейкоцитарных интегринов. Очевидно, это имеет значение для замедления опухолевого процесса, повышения выживаемости и улучшения соматического состояния животных.

Г.Е. Бриль¹, А.В. Егорова¹, А.Б. Правдин², Г.В. Пономарев³

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ РАСТВОРОВ ДИМЕГИНА И ФОТОДИТАЗИНА ПОД ВЛИЯНИЕМ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

¹Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, Саратов

²Государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов

³Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва

Актуальность. Большинство используемых в настоящее время для проведения фотодинамической терапии фотосенсибилизаторов (ФС) содержат в своей структуре асимметричные атомные группировки. Последнее позволяет предполагать различие фотоотклика молекул ФС на разнополяризованный свет.

Задача исследования. Провести сравнительный анализ влияния лазерного излучения с различным характером поляризации на процесс дегидратационной самоорганизации гидрофильных фотосенсибилизаторов димегина (Д) и фотодитазина (ФД).

Материалы и методы. ФС разводили в 0,9% растворе натрия хлорида (10 мг/мл). Процесс самоорганизации изучали методом клиновидной дегидратации. Растворы ФС предварительно облучали красным полупроводниковым лазером (λ 660 нм, 1 Дж/см²) с насадкой, позволяющей получать линейно- и циркулярнополяризованный свет. Анализировались качественные и количественные характеристики полученных фаций.

Результаты и выводы. При облучении раствора Д циркулярно поляризованным светом с левым направлением вращения отмечалась деструктуризация центральной и промежуточной зон фации, изменение количества, среднего размера и структурной неоднородности объектов периферической зоны. В фациях ФД, облученных левополяризованным светом, отмечалось появление промежуточной зоны, а также изменение структуры центральной области. Достоверно различались площади периферических зон фаций, средний размер, число объектов и степень их структуризации в ободковой зоне. Наиболее существенные различия в структуре фаций Д и ФД наблюдались при сравнительном анализе образцов, полученных при облучении линейно- и левополяризованным светом. Различия были обнаружены и при анализе эффектов правополяризованного и линейнополяризованного света. Так, в фациях Д различия касались размеров ободковой зоны фации, среднего размера объектов периферической и центральной зон фации, а также показателя энтропии периферической, промежуточной и центральной зон. В фациях ФД достоверно изменялись размеры ободковой и центральной зон, средний размер и количество объектов, а также показатель изрезанности поверхности центральной области. Следовательно, структурные перестройки ФС при неизменной длине волны зависят от характера поляризации лазерного излучения.

С.А. Будкевич, Т.М. Ермоленко, Т.В. Трухачева, К.А. Фроленков

**ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ КЛОФАРАБИН,
КОНЦЕНТРАТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНФУЗИЙ 1 МГ/МЛ
ВО ФЛАКОНАХ 20 МЛ ПРОИЗВОДСТВА РУП «БЕЛМЕДПРЕПАРАТЫ»**

РУП «Белмедпрепараты», Минск

Задачи исследования. Разработать стабильный и эффективный противоопухолевый препарат на основе клофарабина для лечения детей с рефрактерными формами или рецидивами острого лейкоза.

Материалы и методы. Для разработки препарата использована субстанция 2-хлор-9-(2'-деокси-2'-фтор-β-D-арабинофуранозил)-9Н-пурин-6-амин (≥99,5 %), для контроля качества субстанции и лекарственного средства использовались методы ВЭЖХ, ГЖХ, УФ и ЯМР спектроскопии.

Результаты. Оригинальный препарат на основе клофарабина Clolar (Клолар) американской компании Genzyme Corp. используется в онкологической практике за рубежом, однако до настоящего времени не зарегистрирован в странах СНГ. РУП «Белмедпрепараты» разработан препарат Клофарабин, концентрат для приготовления раствора для инфузий 1 мг/мл во флаконах 20 мл. Разработанная технология получения препарата обеспечивает его исключительную стабильность.

При изучении стабильности лекарственного средства в условиях ускоренных (40 ± 2 °C) испытаний в течение срока наблюдения 12 месяцев суммарное содержание примесей увеличилось с 0,15 % до 1 %. Долгосрочные (25 ± 2 °C) испытания в течение срока наблюдения 24 месяца показали отсутствие нарастания примесей, неизменным оставалось и содержание действующего вещества. Оценка качества препарата проводилась с использованием высокочувствительных методов анализа на основе валидных методик. В настоящее время в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии (г. Минск) проводятся клинические испытания по оценке эффективности, переносимости и безопасности препарата «Клофарабин, концентрат для приготовления раствора для инфузий 1 мг/мл во флаконах 20 мл», производства РУП «Белмедпрепараты» у пациентов детского возраста с рецидивирующим или рефрактерным острым лейкозом I/II фаза.

Выводы. Разработана технология получения и современные аналитические методики оценки качества препарата Клофарабин, концентрат для инфузий. Препарат характеризуется высокой стабильностью. Иницированы клинические испытания по оценке эффективности и безопасности лекарственного средства.

*П.М. Бычковский¹, Э.А. Жаврид², А.В. Ваккер², Ю.Г. Шанько³, А.Л. Танин³,
Е.А. Короткевич³, А.Ф. Смеянович³, Т.Л. Юркович⁴, Ф.Н. Капуцкий⁴, Д.А. Адамчик¹, С.А. Беляев⁴*

**РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА «ЦИСПЛАЦЕЛ»**

¹УП «Унитехпром БГУ», Минск, Беларусь

²РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

³ГУ «РНПЦ неврологии и нейрохирургии» МЗ РБ, Минск, Беларусь

⁴НИИ ФХП БГУ, Минск, Беларусь

bychkovsky@tut.by

В Республике Беларусь разработано лекарственное средство пролонгированного действия «Цисплацел», представляющее собой цисплатин, иммобилизованный на биорассасывающемся полимерном носителе и предназначенное для локальной химиотерапии злокачественных опухолей головного мозга, головы и шеи.

Клинические испытания препарата «Цисплацел», проведенные в ГУ «РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова» МЗ РБ на 65 пациентах с различными новообразованиями головы и шеи свидетельствуют о том, что в результате местного применения «Цисплацела» после не радикальных удалений первичных и рецидивных опухолей различной локализации на голове и шеи приводит к сокращению количества рецидивов в среднем на 25–40% по сравнению с контрольной группой больных, что свидетельствует об эффективности местного применения препарата «Цисплацел». В результате проведенных клинических испытаний в ГУ «РНПЦ неврологии и нейрохирургии» МЗ РБ было установлено, что эффективность препарата «Цисплацел» в качестве противоопухолевого средства послеоперационной локальной химиотерапии супратенториальных глиом головного мозга (Grade III-IV) в сочетании с лучевой терапией (95 пациентов) оценивается как положительная: наблюдалось достоверное увеличение продолжительности безрецидивного периода с $31,9 \pm 2,8$ недель (контрольная группа) до $50,8 \pm 3,2$ недель (опытная группа) ($p < 0,05$) и продолжительности жизни больных более, чем в 2 раза с $211 \pm 21,4$ до $427,5 \pm 28,4$ дня. Кумулятивная выживаемость, рассчитанная по таблицам продолжительности жизни (Life table method) в основной группе, была выше, чем в контрольной, что также свидетельствует о большей эффективности полученного препарата, в сравнении с нативным цисплатином.

«Цисплацел» (производитель – УП «Унитехпром БГУ») рекомендован к применению в медицинской практике в качестве лекарственного средства для имплантации в ложе удаленной супратенториальной нейроэпителиальной опухоли головного мозга, а также в мягкие ткани и полости в месте удаленной опухоли органов головы и шеи.

*М.И. Валуева¹, Т.С. Хлыстова¹, Н.Д. Олтаржевская¹, М.А. Коровина¹,
В.П. Сокуренок², Л.И. Корытова², А.В. Мешечкин²*

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
ЛЕЧЕБНЫХ ГИДРОГЕЛЕВЫХ МАТЕРИАЛОВ «КОЛЕГЕЛЬ»
В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ЛУЧЕВЫХ РЕАКЦИЙ**

¹ООО «Колетекс», Москва

²ФГБУ «РНЦРХТ», Санкт-Петербург

Задачи исследования. Оценить эффективность использования гидрогелевого материала «Колегель-ДНК-Л-Ч» на основе альгината натрия с дезоксирибонуклеатом натрия, лидокаином и экстрактом черники в качестве средства для профилактики и лечения лучевых реакций и осложнений слизистых при проведении курса лучевой терапии.

Материалы и методы. Пациентам по поводу злокачественных опухолей прямой кишки подводилась лучевая терапия области малого таза на аппарате SL 20 МэВ. Одновременно проводилась химиотерапия по схеме XELOX. «Колегель-ДНК-Л-Ч» вводили в объеме 20 мл в прямую кишку в виде микроклизмы с экспозицией до 6–8 часов 1 раз в сутки до стихания повреждений в течение 1 месяца.

Результаты и выводы. Применение «Колегель-ДНК-Л-Ч», направленно подводящего лекарственные препараты непосредственно к очагу поражения, снимает болевые ощущения в области прямой кишки, купирует кровотечение в течение в среднем 3 суток (в контроле – 7 и 10 суток соответственно), способствует заживлению раневой поверхности на слизистой прямой кишки в течение 10–15 дней (в контроле – 17–25 дней). Химиолучевое лечение проведено до запланированных суммарных доз у 80 % пациентов. Больные колоректальным раком переносили введение «Колегель-ДНК-Л-Ч» геля удовлетворительно без побочных явлений. Повторное введение геля в домашних условиях пациенты легко осуществляли самостоятельно. Исследование показало, что применение материала гидрогелевого во время проведения лучевой терапии дает возможность минимизировать лучевые реакции слизистой прямой кишки. Лучевые реакции имели меньшую степень выраженности и развивались в более поздние сроки облучения, в основном к концу подведения запланированных суммарных доз, что позволило провести лучевое лечение без перерыва. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности использования рассматриваемого материала для профилактики и лечения лучевых реакций и повреждений, рекомендации его к использованию в практическом здравоохранении.

*Д.П. Веевник¹, А.С. Федулов², А.С. Боровский², А.В. Шамкалович², С.А. Гузов²,
Т.Л. Юркинович³, С.А. Беляев³, В.В. Комар¹, Н.К. Юркинович³, Т.В. Трухачева⁴, С.В. Шляхтин⁴*

**ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ ЛОКАЛЬНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЕПАРАТА «ТЕМОДЕКСА» (ОТ ЭКСПЕРИМЕНТА К КЛИНИКЕ)**

¹Учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», Минск, Беларусь

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск

³Учебно-научно-производственное республиканское унитарное предприятие «Унитехпром Белорусского государственного университета», Минск, Беларусь

⁴Республиканское унитарное предприятие «Белмедпрепараты», Минск, Беларусь

Цель исследования. Изучить безопасность, переносимость и эффективность локальной химиотерапии в комплексном лечении злокачественных опухолей головного мозга с использованием противоопухолевого лекарственного средства «Темодекс».

Материалы и методы. «Темодекс» – препарат, разработанный УНП РУП «Унитехпром БГУ» и РУП «Белмедпрепараты» для локальной химиотерапии, представляющий собой темозоломид, ассоциированный на биodeградирующей матрице на основе высокозамещенного фосфата декстрана. Дизайн исследования – открытое, ретроспективное, когортное, контролируемое с параллельными группами. В исследование включено 41 пациент с глиальными опухолями головного мозга (Gr II–Gr IV), которым интраоперационно, в ложе удаленной опухоли имплантировали «Темодекс», с содержанием активного вещества (темозоломид) – 100,0 мг (основная группа). В качестве контроля – оценивались результаты лечения 95 пациентов с верифицированными глиальными опухолями, которые получали стандартную комбинированную терапию. Суррогатные конечные точки – выживаемость и длительность безрецидивного периода. Контрольная и основная группа были сопоставимы по клинко-демографическим характеристикам. Всем пациентам основной и контрольной группы проводилось МРТ/КТ исследование с контрастным усилением до проведения операции, на 2–3 день после операции, на 7–10 сутки, через 3 месяца, 6 месяцев, 12 месяцев.

Результаты. Безопасность и переносимость препарата оценивали исходя из выраженности и динамики общемозговой и очаговой неврологической симптоматики, гематотоксичности, выраженности послеоперационного локального или диффузного отека головного мозга. У подавляющего большинства пациентов отмечен регресс очаговой неврологической симптоматики, наблюдавшейся до проведения операции. В раннем послеоперационном периоде умерло два пациента, причиной смерти которых была ТЭЛА.

Заключение. Предварительный анализ результатов применения технологии интраоперационной локальной химиотерапии с применением противоопухолевого лекарственного средства «Темодекс», указывает на удовлетворительную безопасность и переносимость препарата.

В.Н. Волгин¹, Е.Ф. Странадо², Р.В. Кагояни³, М.А. Кабанова¹, И.В. Булгакова⁴

ЛЕЧЕНИЕ БАЗАЛЬНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА КОЖИ ГОЛОВЫ И ШЕИ МЕТОДОМ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

¹Главный военный клинический госпиталь им. акад. Н.Н. Бурденко, Москва

²Государственный научно-исследовательский центр лазерной медицины Минздрава России, Москва

³Ставропольская государственная медицинская академия, Ставрополь

⁴Клиника «Столица», Москва

Актуальность. Во всем мире отмечается постоянный рост заболеваемости базально-клеточным раком кожи (БКРК). Преимущественной локализацией БКРК является область головы и шеи (75,9–97,8 %), главным образом кожа лица. Возможности полной эрадикации опухолей значительно расширились с появлением фотодинамической терапии (ФДТ) как нового современного высокоэффективного метода лечения.

Цель исследования. Оценка эффективности ФДТ при лечении первичного и рецидивного БКРК головы и шеи.

Материалы и методы. За 10-летний период локализация на голове и шее составила 87 % среди всех БКРК (на голове – 83,4 %, на шее – 3,6 %). В том числе в области носа – 21,7 %, в периорбитальной области – 19,7 %, на щеках – 15 %, в области ушной раковины и наружного слухового прохода – 15,4 %, на коже лба – 13,7 %, на волосистой части головы – 11,7 %, на висках – 10,7 %, губах – 2,7 %, в носогубной складке – 1,7 %. ФДТ проведена 504 больным. Первичный БКРК был у 338 больных (67,3 %), рецидивный – у 165 (32,3 %). Использовали фотосенсибилизаторы (ФС) отечественного (фотогем, фотосенс, фотодитазин) и зарубежного производства (фоскан, Германия; фотолон, Беларусь). Лечение проводилось на лазерных установках: ИННОВА-200 («Когерент», США), МЕТАЛАЗ, ПОЛЮС-2, МИЛОН, ЛАТУС (Россия) КЕРАЛАЗ (Германия). Курс ФДТ включал однократное введение ФС и 1-2 сеанса облучения.

Результаты и выводы. Полная резорбция опухолей (ПР) наступила у 89,1 % больных, в том числе при первичном БКРК – у 93,2%, при рецидивном – у 80,6 %. Эффективность ФДТ с фотодитазинном составила 96,1 %, с фосканом – 89,2 %, с фотолоном – 88,9 %, с фотосенсом – 82,1 %, с фотогемом – 78,4 %. При диспансерном наблюдении от 6 месяцев до 8 лет частота рецидивов составила в среднем 13,7 %, при ФДТ с фотодитазинном – 5,2 %, с фосканом – 6,9 %, с фотогемом – 24,3 %, с фотосенсом – 19,7 %, с фотолоном – 15,6 %. Наш опыт свидетельствует о высокой терапевтической эффективности метода ФДТ при лечении первичного и рецидивного БКРК головы и шеи, в том числе с локализацией в областях, трудно доступных для традиционных методов лечения (ушная раковина, наружный слуховой проход, нос, угол глаза, веки). Резистентности к ФДТ не наблюдалось. В результате лечения достигнуты хорошие и отличные косметические результаты.

И.Г. Гатауллин, Р.К. Шакиров, М.Г. Гордеев

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МУТАЦИЙ ГЕНА K-RAS У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

ГОУ ДПО КГМА Минздрава России, Казань

ГАУЗ «РКОД МЗ Республики Татарстан», Казань

Актуальность. Одной из важнейших соматических мутаций, обнаруженных в опухолях толстой кишки, является мутация в гене KRAS, выявленная в опухолях толстой кишки с частотой от 30% до 50%. Мутация в гене KRAS может стать новым фактором прогноза в рамках даже одной и той же стадии заболевания.

Цель исследования. Выявление частоты мутации в гене KRAS у больных колоректальным раком в Республике Татарстан, и оценка влияния мутации на течение и прогноз заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены 120 больных колоректальным раком, получивших комбинированное лечение в ГАУЗ «РКОД МЗ Республики Татарстан». Пациентам был проведен генетический анализ на наличие мутации в гене KRAS на материале, полученном в результате оперативного вмешательства.

Результаты. Из 120 пациентов у 35 выявлена мутация в гене KRAS, у 85 пациентов имелся «дикий» тип гена KRAS (частота мутаций составила 26,7 %). При этом 25 мутаций обнаружено в 12 и 13 кодонах, 7 мутаций в 61 кодоне и 3 – в 146 кодоне. Результаты исследования показали, что у русского населения мутантный тип гена KRAS выявляется чаще (в 38,9 %) чем у татарского населения (в 21,2 %). Данная зависимость является статистически значимой ($p=0,045$). Мутация в гене KRAS чаще встречалась у женщин, чем у мужчин (37,7% и 20,3% соответственно). Данные зависимости значимы ($p=0,045$).

Опухоли толстой кишки с мутантным геном KRAS более склонны к лимфогенному метастазированию (в 54,2 %), чем опухоли с «диким» типом (в 45,8 %), что косвенно свидетельствует о более агрессивном течении опухолевого процесса при мутантном типе гена ($p=0,004$). Больные с мутантным типом гена чаще имеют отдаленные синхронные метастазы (в 63,6%), чем больные с «диким» типом (в 36,4 %) Данная зависимость является статистически значимой ($p=0,0001$). Таким образом, опухоль с мутантным типом гена обладает агрессивным течением и высоким потенциалом к метастазированию. Годичная выживаемость пациентов с «диким» типом гена KRAS составила 96,5%, с мутантным типом гена 88,6% ($p=0,0012$).

Выводы. Мутация в гене K-RAS является независимым значимым прогностическим признаком. Генетические исследования необходимо включить в стандарт обследования больных колоректальным раком в качестве предиктивных маркеров для оценки течения и прогнозирования отдаленных результатов лечения.

*Н.В. Голубцова, А.Е. Бармашов, О.С. Бузова, П.К. Иванов,
К.А. Барышников, К.А. Парсункова, Г.З. Чкадуа, И.Н. Михайлова*

**ИЗМЕНЕНИЕ СЫВОРОТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ
РАСТВОРИМОГО АНТИГЕНА CD 44 У БОЛЬНЫХ МЕЛАНМОЙ**

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

ГУП «МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва.

Задачи исследования. Изучение корреляции между содержанием сывороточного уровня растворимого антигена CD 44 и белка S-100, как маркера прогрессии опухоли, у больных диссеминированной меланомой кожи в процессе вакцинотерапии дендритными клетками для иммунологической оценки эффективности проводимой противоопухолевой терапии

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы сывороток крови от 31 больного диссеминированной меланомой, получавших после удаления первичной опухоли вакцину на основе аутологичных дендритных клеток в течение года. В качестве контроля использовались образцы сывороток крови 15 здоровых доноров.

Растворимый антиген CD44 (sCD44std) определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с помощью диагностических тест-систем Bender MedSystems® (Австрия). Учет результатов проводился спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Результаты выражали в нг/мл.

Определение сывороточного уровня белка S-100 (S-100 A1B и S-100 BB формы) проводили иммуноферментным методом с использованием диагностической тест-системы CanAg Diagnostics (Швеция). Учет результатов проводился спектрофотометрически при длине волны 405 нм. Результаты выражали в нг/л.

Результаты и выводы. При проведенном исследовании пациенты, в зависимости от исходного уровня CD44, делились на две группы: 1 группа (n=16) с нормальными значениями CD44 и группа 2 (n=15) с повышенными значениями CD44 относительно значений данного маркера в группе здоровых доноров. Был проведен анализ содержания уровня S-100 в образцах сывороток крови в группах 1 и 2. Выявлено статистически достоверное повышение сывороточного уровня S-100 у больных группы 1 ($p<0,05$), а у больных группы 2 отмечено незначительное повышение уровня данного антигена ($p>0,05$). Таким образом, нормальный уровень CD44 указывает на неблагоприятное течение заболевания. Установлено, что в группе 1 (n=16) медиана времени до прогрессирования составила $14,0\pm 7$ месяцев, в группе 2 (n=15) медиана времени до прогрессирования составила $22,0\pm 18,0$ месяцев.

*Е.В. Горанская, М.А. Каплан, В.Н. Капинус, Ю.А. Рагулин,
Е.В. Ярославцева, И.С. Спиченкова, А.М. Шубина, О.В. Боргуль, М.В. Таибова.*

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В ЛЕЧЕНИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ФГБУ МРНЦ Минздравсоцразвития России, Обнинск

Актуальность. По данным отечественных авторов, при проведении ФДТ внутрикожных метастазов РМЖ полные регрессии (ПР) достигнуты в 39–51 %, частичные (ЧР) – в 36 %, стабилизация процесса – в 4 %, объективный положительный ответ – в 87–98 % случаев. По сведениям американских ученых объективный ответ был получен в 100 % наблюдений, ПР – в 65 %. Европейские исследователи также достигли полного ответа в 100 %, ПР – в 73 %, ЧР – в 18 % случаев.

Цель исследования. Изучить эффективность ФДТ при лечении кожных метастазов РМЖ.

Материалы и методы. Анализ проведен на основании результатов лечения 46 больных РМЖ с метастатическим поражением кожи, получавших ФДТ в период с 1998 по 2012 г. в клинике ФГБУ МРНЦ. В качестве ФС использовали фотолон, препарат вводили внутривенно капельно на физиологическом растворе в дозе 0,9–1,6 мг/кг.

Результаты. Средний возраст пациенток составил 59,8 года (от 39 до 72 лет). На момент лечения у 27 (59 %) больных были выявлены только внутрикожные метастазы, у 19 (41 %), помимо поражения кожи имелись метастазы в другие органы. Суммарно у пациенток, было проведено лечение 535 очагов. Размер полей облучения варьировал от 1 до 6 см, число полей – от 1 до 30, плотность мощности – от 0,11 до 0,56 Вт/см², выходная мощность – от 0,3 до 2 Вт, плотность энергии – от 50 до 600 Дж/см². Результаты лечения внутрикожных метастазов РМЖ оценивали через 1–2 месяца после окончания лечения: из 535 (100 %) очагов ПР была отмечена в 33,64 % (n = 180) случаев, ЧР – в 39,43 % (n = 211), стабилизация – в 22,61 % (n = 121), прогрессирование – в 4,29 % (n = 23). Объективный ответ получен в 73,07 % наблюдений, лечебный – в 95,68 %.

Выводы. ФДТ в 96 % случаев позволяет достичь лечебного эффекта. Метод может применяться при невозможности проведения хирургического вмешательства, ЛТ и ХТ. ФДТ выгодно отличается избирательностью поражения опухолевой ткани, отсутствием тяжелых местных и системных осложнений и возможностью повторения лечебной процедуры. Использование ФДТ в паллиативных целях позволяет уменьшать объем опухоли и улучшать качество жизни больных РМЖ с метастазами в кожу.

О.В. Горюнова, И.В. Ярцева, Н.А. Машалова, Н.К. Власенкова

АМИНОКИСЛОТНЫЕ АНАЛОГИ N-ГЛИКОЗИДОВ ИНДОЛОКАРБАЗОЛОВ

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

Задачи исследования. Синтезировать аминокислотные производные N-гликозидов индолопирролокарбазола и бисиндолилфурандиона в качестве потенциальных противоопухолевых соединений.

Материалы и методы. Последовательным взаимодействием ацетилированного рибопиранозилиндола или 2',3'-секорибопиранозилиндола с оксалилхлоридом, затем с 3-метилиндолилуксусной кислотой были получены бисиндолилфурандионы и превращены путём фотосинтеза в фуранокарбазолы. Нагревание в течение 2-3 часов при 130°C раствора в диметилформамиде ацетилрибопиранозидов бисиндолилфурандиона или ацетилгликопиранозидов фуранокарбазолов с метиловыми эфирами аминокислот в присутствии триэтиламина привело к получению производных аминокислот. Деацетилирование углеводной части гликозидов проводили в безводных условиях действием поташа на раствор в метаноле соответствующих ацетилгликозидов. Полученные соединения были очищены хроматографией на силикагеле и охарактеризованы методами ЯМР- и УФ-спектроскопии.

Результаты. При взаимодействии метиловых эфиров глицина или аланина с фуранокарбазолами или бисиндолилфурандионами происходит трансформация фуранового цикла в пиррольный, причём α-аминогруппа аминокислоты встраивается в пятичленный цикл агликона. Производные глицина и аланина, полученные из N-ацетилгликозидов фуранокарбазола, образуются с выходами от 69 % до 89 %, стерически менее напряжённый бисиндолилфурандион вступает в реакцию в указанных условиях лишь частично, выход производного глицина составляет 38 %, а производного аланина 39 %. Деацетилированные N-гликозиды были получены с выходом не менее 84 % при сохранении сложноэфирной группы аминокислотного остатка. Синтезированные таким образом аминокислотные аналоги противоопухолевого антибиотика ребеккамицина были изучены *in vitro* на клетках карциномы яичника СаОv и показали IC₅₀>10 мкМ.

Выводы. N-Гликозиды индолопирролокарбазола и бисиндолилдона, замещённые в пятичленном цикле остатками метиловых эфиров глицина или аланина, не обнаружили выраженной цитотоксической активности. Намечен синтез новых аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола с открытой карбоксильной группой, что улучшит растворимость соединений и их цитотоксические свойства.

В.С. Горячева

РОЛЬ ТЕРМОГРАФИИ В ДИАГНОСТИКЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского МЗ РФ, Саратов

Актуальность. Рак молочной железы – одна из самых актуальных проблем современной клинической онкологии. Он по-прежнему занимает первое место в структуре заболеваемости злокачественных новообразований у женщин. Раннее выявление рака – важная стратегия для снижения смертности от этого заболевания и цель всех программ скрининга. В своевременной диагностике используют комплексное обследование, включающее сочетание клинического, инструментально-диагностического (маммография, УЗИ-диагностика), морфологического исследований. Ещё одним методом диагностики рака молочной железы является термография. Это неинвазивный, бесконтактный метод, позволяющий регистрировать изображение распределения температуры.

Цель исследования. Выявление термографических признаков вовлечения молочной железы в патологический процесс.

Материалы и методы. В клинике факультетской хирургии и онкологии амбулаторно, за период с 2000 по 2003 гг. обследовано 90 женщин с непальпируемыми опухолями в молочной железе. Диаметр опухолей от 0,5 до 1,5 см. Используя результаты термографии, всех пациенток разделили на две группы. Первую группу (63 %) составили женщины, у которых не было очагов гипертермии на термограмме. Во вторую группу вошли пациентки с гипертермией на термограммах (37 %). Возраст больных – от 15 до 64 лет. Термографию выполняли на аппарате IRISYS 4010.

Результаты. У пациенток первой группы в плане обследования выполнена тонкоигольная биопсия под контролем УЗИ с цитологическим исследованием. В дальнейшем больным произведена секторальная резекция и при плановом гистологическом исследовании у 3 % диагностирован рак. Термографическая картина при наличии очагов разогрева характеризовалась зонами повышения температуры с тяжистыми контурами, разность температур над которыми с контралатеральной точкой составила 2–2,5 градуса. После термографии и тонкоигольной биопсии под контролем УЗИ также выполнялась секторальная резекция и при гистологическом исследовании констатировано, что у 72 % пациенток этой группы был рак. В 28 % наблюдений диагностирована фиброзная мастопатия.

Выводы. Термографическое исследование является дополнительным методом диагностики опухолей молочной железы и может быть рекомендовано как скрининг-тест при непальпируемых опухолях молочной железы.

Е.В. Гребёнкина, С.В. Гамаюнов, Н.М. Шахова, С.С. Кузнецов

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ

ГБУЗ НО НООД, НГМА, ИПФ РАН, Нижний Новгород

Актуальность. Оптимальным методом профилактики рака шейки матки является адекватное лечение CIN, что в современных условиях требует органосохраняющих и патогенетически обоснованных подходов. Наиболее соответствующей этим требованиям является фотодинамическая терапия (ФДТ).

Цель исследования. Определение эффективности и безопасности проведения ФДТ у больных с CIN III, c-r colli uteri in situ. Задачи исследования: оценка терапевтического патоморфоза CIN III, c-r colli uteri in situ после проведения ФДТ; клиническая оценка эффективности ФДТ при CIN III, c-r colli uteri in situ; анализ побочных эффектов и осложнений.

Материалы и методы. Нами обследовано и пролечено 15 пациенток репродуктивного возраста (от 26 до 38 лет) с диагнозом CIN III and cervical cancer in situ. Комплексное клиническое обследование включало: ОКТ-кольпоскопию, бактериоскопию, ВПЧ-тестирование, цитологическое исследование, биопсию шейки матки. Использовались фотосенсибилизаторы (ФС) хлоринового ряда в дозе 1 мг/кг в/в капельно в течение 30 минут на 200 мл физиологического раствора. Лазерное воздействие осуществлялось на длине волны 662 нм. Лечение было двухэтапным: 1 этап – ФДТ шейки матки, 2 этап (через 60 дней после ФДТ) – конизация шейки матки с выскабливанием цервикального канала. Использовалась полипозиционная методика лазерного воздействия (цервикальный канал и влагалищная порция шейки матки). Плотность энергии лазерного излучения составляла 150 Дж/см², плотность мощности – 280 мВт/см².

Результаты. При CIN инфицированность ВПЧ высокого онкогенного риска была выявлена у 13 пациенток, 2 женщины были вирус-негативными. После ФДТ завершение процессов эпителизации наступало к 4 неделе. В это время полная эрадикация ВПЧ выявлена у 10 пациенток из 13 ВПЧ положительных. При оценке патоморфоза ткани шейки матки после ФДТ с последующей конизацией и выскабливанием цервикального канала у 6 пациенток с CIN III данных за CIN не было, у 7 женщин (из них у 4 с c-r in situ, 3 с CIN III) были отмечены мелкие фокусы CIN I, у 2 больных с CIN III были выявлены фокусы CIN II. В краях резекции у всех пациенток CIN 0. Сроки наблюдения составили 12 мес. ОКТ-кольпоскопия, цитологическое, вирусологическое, гистологическое исследование проводятся каждые 3 мес. За время наблюдения – 1 рецидив c-r in situ шейки матки, что потребовало повтора ФДТ.

Выводы. Таким образом, ФДТ шейки матки является альтернативным методом лечения CIN с сохранением анатомической и функциональной целостности органов. Показанный в работе в большинстве случаев выраженный патоморфоз говорит о противоопухолевой эффективности ФДТ, а также выраженном противовирусном эффекте ФДТ.

Е.Ю. Григорьева, Е.Ю. Колдаева, А.В. Смирнова, Ю.В. Стукалов

ИССЛЕДОВАНИЕ

ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НАНОКОНСТРУКЦИЙ

НА ОСНОВЕ ДЕНДРИМЕРОВ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН

Задачи исследования. Изучение цитотоксической активности наноконструкции (НК) с RGD-пептидом и рением-188 на основе дендримеров.

Материалы и методы. Исследование цитотоксической активности созданной наноконструкции (НК – дендример RGD-¹⁸⁸Re), проведено *in vitro* на культуре аденокарциномы легких LLC1. При приготовлении рабочих растворов исследуемых соединений для полного связывания ¹⁸⁸Re брали не менее, чем 100-кратный избыток модифицированного дендримера. Клеточные линии культивировали в стандартной среде RPMI 1640 с 10% инактивированной телячьей эмбриональной сывороткой (FCS), 2 мМ глютамин, гентамином. Определение пролиферативного индекса (ИП) проводили в 12-луночных планшетах (рассев по 400–500 тыс. клеток на лунку, объем среды 1мл). Определение % гибели клеток по связанной радиоактивной метке проводилось в 96-луночных планшетах. Дозы радиоактивности ¹⁸⁸Re для каждого из соединений (¹⁸⁸Re – контроль и НК) составляли: 0,018 МБк; 0,037 МБк; 0,074 МБк на лунку. Культивирование клеток проводилось при 37 °C и 5% CO₂ в течение 60 минут. Количество погибших клеток оценивали через 1ч и 3 ч как сумму радиоактивностей среды и суммарной отмывки по отношению к внесенному количеству ¹⁸⁸Re на колодезном счетчике фирмы Gamma (Венгрия). Индекс пролиферации определяли подсчетом количества выросших клеток через 12, 38, 72 ч.

Результаты и выводы. Проведенные исследования на культуре клеток LLC1 по показателю связывания радиоактивной метки исследуемыми носителями через 1 час инкубации показали, что при разных дозах рения процент гибели клеток максимален при дозе 0,074 МБк и составляет: 99,5 % для НК, 64,4 % для контроля. При дозе 0,037 МБк гибель составляет: 81,6 % для НК и 26,2% соответственно. Доза 0,018 МБк приводила к гибели 47,8 % клеток для НК и 22,9 % для контроля. При определении ИП для культуры клеток LLC1 через 12 ч, 38 ч и 72 ч культивирования клеток исследуемыми носителями было показано: 1. Прямое действие ¹⁸⁸Re на клетки приводит к 69–70 % их гибели и не обладает доза-зависимым эффектом в заданном дозовом диапазоне. 2. Для НК гибель клеток носит доза-зависимый характер и достигает 98,7 ± 2,4 % при дозе 0,074 МБк. Можно предположить, что НК встраивается в клеточные структуры, либо путем интернализации в клетки опухоли, либо контактируя с интегринами мембран опухолевых клеток.

Е.Ю. Григорьева, Е.Ю. Колдаева, А.В. Смирнова, Ю.В. Стукалов

ИЗУЧЕНИЕ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НАНОКОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ДЕНДРИМЕРОВ

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

Задачи исследования. Изучение биораспределения и терапевтической эффективности наноконструкции (НК) с RGD-пептидом и рением-188 на основе дендримеров.

Материалы и методы. При приготовлении рабочих растворов исследуемых соединений для полного связывания ^{188}Re брали не менее, чем 100-кратный избыток модифицированного дендримера. В работе использовали мышей C57Bl/6 с подкожно трансплантированной аденокарциномой легких Льюиса LLC1.

Изучение биораспределения. На 10-й день после трансплантации опухоли животным вводили системно 0,2 мл соединений, содержащих, 1,85 МБк на 1 животное. Через 1, 3, 6, 9, 12 ч после инъекции животных декапитировали. Для количественного определения НК (дендример-RGD- ^{188}Re) брали кровь, опухоль, печень, почки и легкие. Радиоактивность органов определяли по гамма – составляющей. Рассчитывали: количество радиоактивности образца на 1 г навески (СРМ/г); коэффициенты дифференциального накопления (КДН).

Изучение терапевтической эффективности. Через два дня после трансплантации опухоли вводили однократно системно 0,2 мл следующих соединений: ^{188}Re связанный с НК и контроль - ^{188}Re . Дозы радиоактивного ^{188}Re составляли: 0,3 МБк, 1,85 МБк, 3,7 МБк на животное. Проводили измерение размеров опухоли.

Результаты и выводы. Проведенные исследования биораспределения ^{188}Re (контроль), и НК показали: на всех сроках наблюдения НК дает преимущественное накопление ^{188}Re в опухоли по сравнению с контролем. Содержание НК в интервале 1–6 ч выходит на плато. Можно отметить стабильное превышение концентраций ^{188}Re в опухоли по отношению ко всем органам (тканям) мышей кроме крови с 1 до 12 ч после введения НК (градиент концентраций ^{188}Re между опухолью и тканями мышей 1,3–3,9). Показано, что при введении НК доза 0,3 МБк по своему влиянию на рост опухоли не отличается от контрольных животных. Доза 1,85 МБк дает задержку роста опухоли 3–4 дня, доза 3,7 МБк обеспечивает задержку роста опухоли до 7–9 дней. ТРО максимально выражено для дозы 3,7 МБк. Носителем, обеспечивающим хороший терапевтический эффект, является НК при активности рения, равной 3,7 МБк на животное (Тзад = 7–9 дней, УПЖ >50 %, ТРО= 95,7 % до 7 суток и 91 % – до 14 суток). Таким образом, созданные наноконструкции могут рассматриваться в качестве базового элемента перспективных противоопухолевых препаратов.

Н.Я. Гридина, В.Д. Розуменко, В.В. Белошицкий,

Н.Г. Драгунова, О.Н. Величко, О.И. Веселова, А.П. Колисниченко

ПРОВЕДЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ГЛИОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДУЛЯЦИИ КЕТАМИНОМ И ВЕРАПАМИЛОМ АКТИВНОСТИ ИОНОТРОПНЫХ NMDA – РЕЦЕПТОРОВ НА КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Государственное Учреждение “Институт нейрохирургии им. акад. А.П.Ромоданова АМН Украины”, Киев, Украина, gridinanina@ukr.net

Задачи исследования. При диагностике первичных глиом и их рецидивов актуальной задачей является дифференциальная диагностика между опухолевыми и локальными воспалительными процессами в головном мозге, между доброкачественными и злокачественными глиомами. Рост и прогрессия глиом во многом зависят от опухоль-ассоциированного воспаления, имеющего существенные отличия с воспалением неопухолевого генеза. Активатором воспалительного процесса является наличие некрозов в тканях организма. Механизм некротической гибели тканей головного мозга во многом зависит от активности ионотропных NMDA-рецепторов. Верапамил и кетамин влияют на активность ионотропных NMDA-рецепторов, изменяя при этом степень агрегации клеток крови. В экспериментах *in vitro* можно модулировать активность NMDA-рецепторов с помощью кетамина и верапамила таким образом, что она будет достоверно отличаться между воспалительными и опухолевыми процессами в головном мозге, а также между доброкачественными и злокачественными степенями анаплазии глиом.

Материалы и методы. Исследования агрегации клеток крови проводили у больных с глиомами головного мозга (110 чел.), с черепно-мозговыми травмами (27 чел.) и у доноров (35 чел.) с помощью плазмонно-резонансного спектрометра «Plasmon». Кетамин и верапамил добавляли в кровь в соотношении 1:10 перед исследованием на спектрометре в интервале разведений бидистиллятом от 10^{-1} до 10^{-5} степени.

Результаты и выводы. При воздействии кетамина на агрегацию клеток крови в разведении 10^{-4} степени отмечены статистически достоверные отличия между показателями агрегации крови у больных с черепно-мозговыми травмами и глиомами IV стадии ($p \leq 0,01$). Эти данные могут быть использованы при дифференциальной диагностике между воспалительными и опухолевыми процессами в тканях головного мозга в дооперационном периоде.

При добавлении в кровь верапамила, разведенного в 10^{-4} степени, отмечены достоверные отличия ($p \leq 0,01$) между показателями уровня агрегации клеток крови в группах больных с глиомами II стадии. По отношению к показателям в группах больных с глиомами IV стадии, что может лечь в основу разработки методов дифференциальной диагностики у больных с продолженным ростом глиом.

М.А. Грин¹, Р.И. Решетников¹, Р.И. Якубовская², Е.А. Плотникова²,
Н.Б. Морозова³, А.В. Феофанов³, А.В.Ефременко³, Д.Э.Ермакова^{1,3}, А.А.Цыганков⁴, А.Ф. Миронов¹

**АМИНОАМИДЫ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА А,
ОБЛАДАЮЩИЕ ВЫСОКОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ**

¹Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва

²Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Минздрава РФ, Москва

³Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

⁴Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пуцун, Россия

Актуальность. Выбор природных пигментов для создания высокоэффективных фотосенсибилизаторов (ФС) нового поколения обусловлен рядом причин, включая их распространенность в природе, интенсивное поглощение в длинноволновой области спектра, возможность химической модификации боковых заместителей, структурную близость к эндогенным порфиринам, что предполагает низкий уровень токсичности подобных соединений и быстрое выведение из организма.

Цель исследования. Создание ФС бактериохлороинового ряда у которых отрицательный заряд на периферии хлороинового макроцикла заменен на положительный путем введения заместителя с терминальной аминогруппой. В связи с тем, что в опухолевых очагах кислотность среды повышена, протонирование аминогруппы и генерирование положительного заряда может способствовать изменению распределения ФС в организме и увеличению его тропности к опухолям.

Результаты. В данной работе получены аминоксиды бактериохлороина путем взаимодействия метилового эфира бактериофеофорбида с диаминоалканами, имеющими различную длину углеродной цепи. Биологические испытания бактериоаминоксидов показали, что они обладают высокой фотоиндуцированной активностью в отношении клеток человека различного эпителиального происхождения при наномолярных концентрациях и обеспечивают высокую дозозависимую противоопухолевую эффективность у животных с опухолями различного генеза. При дозах ФС 2,5 и 5,0 мг/кг обнаружены 100 % торможение роста опухоли и 100 % излеченность животных в течение 120 суток наблюдения за счет селективного накопления в опухоли и быстрого выведения из организма.

Выводы. Таким образом, данный модификационный ряд бактериохлороинов может рассматриваться как перспективная группа природных фотосенсибилизаторов нового поколения.

А.Н. Гришанина, Т.А. Богущ

ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕНОТИПА

МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ГЕМЦИТАБИНА

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

Актуальность. Рак легкого – одна из самых распространенных форм злокачественных новообразований, которые часто обладают множественной лекарственной устойчивостью (MDR) к химиотерапии. Гемцитабин (Гем) – противоопухолевый препарат, который используют для лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) в сочетании с препаратами платины и таксанами. Из-за токсичности производных платины актуален вопрос об эффективности комбинаций гемцитабина с другими препаратами.

Задачи исследования. Авторы попытались ответить на вопрос, может ли быть Гем модификатором MDR, подобно препаратам платины.

Материалы и методы. Функционирование ABC-транспортёров Pgp и MRP, маркеров MDR, оценивали методом проточной цитофлуориметрии по накоплению MDR-препарата доксорубина в клетках биопсийного материала опухолей. Эффект воздействия Гем на активность ABC-транспортёров сравнивали с эффектами их ингибиторов верапамила и генистеина.

Результаты. Фенотип MDR был выявлен во всех исследованных опухолях: примерно в 30% случаев обнаружена экспрессия функции Pgp, и во всех случаях – MRP. Выявлено два типа реакции опухолевых клеток на воздействие ингибиторов ABC-транспортёров и Гем: увеличение накопления доксорубина в цитоплазме или увеличение его накопления в ядре и связывание с ДНК. При всех использованных концентрациях Гем увеличение цитоплазматического накопления доксорубина наблюдалось чаще по сравнению с ядерным.

Выводы. Накопление доксорубина в клетках НМРЛ может увеличиваться при воздействии и цисплатина, и Гем, однако эффект цисплатина выявляется практически всегда, а эффект Гем – приблизительно в половине случаев. Цисплатин в подавляющем большинстве случаев увеличивает поступление доксорубина в ядро, а Гем значительно чаще увеличивает его накопление в цитоплазме. Из сказанного следует, что по силе модифицирующего эффекта Гем уступает цисплатину, но в силу его невысокой токсичности этот препарат может быть полезен, как модификатор, в комбинациях с MDR-препаратами при лечении НМРЛ.

Поддержано РФФИ (гранты № 12-04-00028, № 13-04-01004).

*И.Д. Гулякин, Е.В. Санарова, А.В. Ланцова,
А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, Н.А. Оборотова, Т.Д. Миникер, Л.В. Эктова*

**РАЗРАБОТКА НАНОСТРУКТУРИРОВАННОЙ
МОДЕЛИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛОКАРБАЗОЛА ЛХС-1208**
ФГБУ «РОНЦ ИМ. Н.Н.БЛОХИНА» РАМН, МОСКВА

Актуальность. В лаборатории химического синтеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» разработана субстанция производного индолоккарбазола – ЛХС-1208. Особенностью механизма действия соединений этого класса является их способность взаимодействовать с несколькими мишенями и, следовательно, индуцировать различные пути гибели опухолевых клеток. Субстанция обладает сильной ингибирующей активностью в отношении киназ – циклинзависимой киназы (Cdk1), протеинкиназы С и тирозинкиназы и второй мишенью является двухцепочечная ДНК и комплекс ДНК с топоизомеразой.

Задача исследования. Разработка состава и технологии получения модели липосомальной лекарственной формы с ЛХС-1208.

Материалы и методы. В процессе определения оптимального состава липосомальной формы с ЛХС-1208 в качестве вспомогательных компонентов выбраны лецитин, холестерин и PEG-2000 DSPE, в молярном соотношении 100:6:4, которые растворяли в ацетон-хлороформной смеси (4:1). Весовое соотношение препарат : липиды составляло 1:110. Липосомы получали по методу Бэнгхема, упариванием ацетон - хлороформного раствора компонентов на ротаторном испарителе до образования полупрозрачной липидной пленки. Затем ее гидратировали водой для инъекций и получали липосомы, которые измельчали, последовательно пропуская через поликарбонатные мембранные фильтры (Nuclepore, Whatman, Великобритания) с уменьшающимся размером пор 0,45 и 0,22 мкм на экструдере Lipex™ Thermobarrel Extruder 10 мл (Канада). Количественное определение содержания препарата в липосомах проводили на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Inc., Австралия) при длине волны 320 нм (± 2 нм). Анализ среднего диаметра везикул измеряли на приборе Submicron Particle Sizer Nicomp-380.

Результаты и выводы. Средний диаметр липосом с ЛХС-1208 составил после получения 202 ± 10 нм. При хранении в холодильнике в течение 24 ч происходило расслоение липосом на две фракции, что говорило о том, что данный состав нестабилен, в связи с этим для увеличения срока годности целесообразным является применение метода лиофилизации. В настоящее время проводится подбор криопротекторов, введение которых в состав липосом является необходимым в процессе сублимации для защиты липосомального бислоя от воздействия повреждающих факторов.

М.А. Гуреев¹, В.Г. Трибулович^{1,2}, А.В. Гарабаджви¹, Дж. Мелино¹

**ВЛИЯНИЕ ОПТИЧЕСКОЙ ИЗОМЕРИИ
НА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОДУЛЯТОРОВ АКТИВНОСТИ БЕЛКА p53**

¹СПбГТИ(ТУ), Санкт-Петербург

²ФГБУ НИИ Гриппа, Санкт-Петербург

Задачи исследования. Разработка препаратов, модулирующих активность белка p53 – одного из главных онкосупрессоров, является одним из актуальных направлений в лечении рака. Основная мишень для данных препаратов – белок MDM2, участвующий в процессах регулирования активности p53 и его убиквитин-зависимой протеасомальной деградации.

Материалы и методы. В ходе разработки новых классов ингибиторов MDM2, с целью повышения сродства к мишени и их мембранотропности, было предложено включить в их структуру аминокислоты с введенными в них каркасными структурами. За основу был взят класс ингибиторов MDM2, разработанных Хардкастлом и соавт., на основе изоиндолинонового ядра. Также, в расчётах учитывается влияние энантиомерии аминокислот на активность соединений. Влияние оптической изомерии связано с различной пространственной ориентацией каркасного заместителя в L- и D- изомерах аминокислот, что в свою очередь может отразиться на фармакологической активности соединения. Потенциальная мишень-специфичность соединений оценивается с помощью молекулярного докинга в среде программ LeadFinder и LeadIT.

Результаты и выводы. Для эксперимента были выбраны два соединения из серии изоиндолиноновых ингибиторов MDM2, содержащих в своей структуре два линкера (на основе 2,2-циклопропан-1,3-пропандиола и пропан-1,3-диола) через которые присоединены аминокислоты в L- и D- формах, включающие каркасные структуры (адамантан, борнан, хинуклидин). Докинг структур показал наличие существенных различий в сродстве ингибиторов к p53-связывающему участку MDM2 зависящих от стереоизомерии аминокислот. Так, например, расчётное значение константы связывания ингибитора с присоединённым через 2,2-циклопропан-1,3-пропандиоловый линкер, L-адамантилглицином, на 1 порядок меньше чем у D-изомера ($K_i = 2,87 \cdot 10^{-8}$ против $3,12 \cdot 10^{-7}$). Визуализация и анализ результатов молекулярного докинга, показали что L- изомер адамантилглицина эффективно заполняет полость сформированную участками Met62-Tyr67-Gln72 а аминокислота формирует водородную связь с атомом кислорода в Gly58, что и приводит к повышению его активности. Остальная же часть молекулы (изоиндолиноновое ядро, хлорфенильная и нитробензильная группы) взаимодействуют идентично вне зависимости от оптической изомерии аминокислотного заместителя.

*И.В. Гусев¹, Н.А. Федоренко², Н.Д. Олтаржевская¹,
Л.В. Демидова², И.В. Дрошинева², Е.А. Дунаева², О.Б. Дубовецкая², С.А. Кожевникова²*
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОСТРУКТУРИРОВАННЫХ АЛЬГИНАТНЫХ ДИСКОВ
С 5-ФТОРУРАЦИЛОМ В ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ
ШЕЙКИ МАТКИ И ПРЯМОЙ КИШКИ**

¹ООО «Колетекс», Москва

²ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, Москва

Задачи исследования. Определение эффективности использования высокоструктурированных дисков «Колегель-5-фтур-диск» на основе биополимера альгината натрия для местного подведения препарата 5-фторурацила с целью радиосенсибилизации при проведении лучевой терапии злокачественных опухолей шейки матки (РШМ) и прямой кишки (РПК). Высокоструктурированные мягкие, формоустойчивые диски на основе биodeградируемого полимера альгината натрия предназначены для направленной доставки введенного в них цитостатика и радиомодификатора 5-фторурацила ректально и вагинально, непосредственно к очагу поражения (опухоли шейки матки или прямой кишки).

Материалы и методы. Диски «Колегель-5-фтур-диск» при предоперационной химиолучевой терапии РШМ IIb-IIIb стадии (T1-2bN0-1M0) применяли до начала облучения в течение 5 дней в виде аппликаций. К опухоли шейки матки подводили «Колегель-5-фтур-диск», содержащий 0,3г 5-фторурацила. Суммарная доза 5-фторурацила на курс составляла 1,5 г. Далее проводили сочетанную лучевую терапию на область малого таза в СОД-40 Гр. Исследуемая группа составила 38 пациенток с плоскоклеточным РШМ. При химиолучевом лечении аденогенного РПК диски «Колегель-5-фтур-диск» вводились в прямую кишку на ночь накануне первого дня облучения и в течение всего курса лечения в дозе 5-фторурацила 0,1г на введение. Суммарная доза за курс лечения составила 2,0 г. Суммарная очаговая доза лучевой терапии составляла 48 Гр. Исследуемая группа – 24 пациента с верифицированным диагнозом рака прямой кишки.

Результаты. При предоперационной химиолучевой терапии с «Колегель-5-фтур-диск» проявлений общей токсичности не отмечено. Всем 38 пациенткам с РШМ удалось выполнить радикальное оперативное вмешательство. При анализе данных планового морфологического исследования у 63,3 % больных была зарегистрирована III–IV степень лечебного патоморфоза. При РПК в исследуемой группе степень резорбции опухоли оценивали субъективно. На первой неделе лечения у 2/3 пациенток улучшился пассаж по кишечнику, исчезли явления дискомфорта в прямой кишке. Лечение проведено всем запланированным больным в намеченные сроки и не увеличило число послеоперационных осложнений.

Выводы: использование высокоструктурированных дисков с 5-фторурацилом «Колегель-5-фтур-диск» в группе пациентов с РШМ и РПК при агрессивной предоперационной химиолучевой терапии обеспечило усиление степени резорбции опухоли при меньших суммарных дозах 5-фторурацила, снижение общей токсичности лечения, и возможность выполнения второго этапа лечения (операции) в запланированный срок.

Е.В. Давыдов

ОПЫТ КОМБИНИРОВАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ФДТ И ХИМИОТЕРАПИИ

Ветеринарная клиника «Россотимо», Москва

Задачи исследования. Оценить возможность комбинированного применения фотодинамической терапии (ФДТ) и химиотерапии при терапии злокачественных опухолей, а именно: 1) применения доксорубина в монорежиме, с последующей ФДТ; 2) применения доксорубина и цисплатина, с последующей ФДТ; 3) применения циклофосфана в монорежиме, с последующей ФДТ.

Материалы и методы. ФДТ проводилась у мелких домашних животных (МДЖ) с наружными и внутренними опухолями различной этиологии и локализации (в том числе фибросаркома, остеосаркома и аденокарцинома молочной железы). Хлорин Е6 применялся внутривенно в дозах 0,8 —1,0 мг/кг. Доксорубин применялся в дозе 30 мг/м² и 25 мг/м². Циклофосфан применялся в дозе 300 мг/м². Цисплатин применялся в дозе 70 мг/м². Использовался диодный лазер мощностью 1,5 Вт, с длиной волны 662 нм. Активация ФС проводилась через 3 часа после введения. Плотность энергии составляла 300—500 Дж/см².

Результаты. Результаты лечения оценивались по клиническим и патоморфологическим признакам. Клинически наблюдалась полная регрессия (ПР), частичная регрессия (ЧР) или стабилизация. При сравнении различных методов отмечено, что комбинированное применение химиотерапии и ФДТ (по сравнению со стандартной ФДТ) приводит к более выраженному эффекту, влияние на опухоль оказывалось комплексное: местное воздействие ФДТ и общее воздействие химиотерапевтических препаратов (которые воздействуют как на опухоль, так и на возможные метастазы).

Выводы. Показана возможность применения и эффективность комбинированного применения химиотерапии и ФДТ. Необходимы дальнейшие исследования комбинированного применения.

*О.Н. Дерябина, П.М. Канаев, Н.А. Плотникова,
С.П. Кемайкин, С.В. Харитонов, Т.В. Харитоновна, И.В. Карьгина*

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА И МЕТФОРМИНА НА ПРОЦЕССЫ АНГИОГЕНЕЗА ОПУХОЛЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ У МЫШЕЙ

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск

Актуальность. Ангиогенез – неотъемлемая часть нормального эмбриогенеза и онтогенеза, высокорегулируемый многостадийный процесс формирования сети капилляров из эндотелиальных клеток, выстилающих мелкие венулы.

Задачи исследования. Изучить воздействие мелатонина и метформина на процессы ангиогенеза в ткани индуцированного рака шейки матки.

Материалы и методы. 120 мышей были разделены на 4 группы: 3 опытные группы по 30 животных, 30 животных составили контрольную группу по канцерогену. Животные 1-ой группы получали мелатонин. Животные 2-ой группы получали с питьевой водой в течение всего дня метформин. Животные 3-ей группы получали с питьевой водой в течение всего дня метформин и мелатонин. Животные 4-ой группы составили контрольную группу по канцерогену и получали питьевую воду без добавления мелатонина и метформина. Изучалась экспрессия ангиогенных факторов в ткани индуцированных опухолей, экспрессия VEGF и количество кровеносных сосудов, окрашенных антителами к CD31, с использованием коммерческих антител и проявочных тест-систем. Подсчитывали количество CD31+ микрососудов в опухоли в не менее 3 полях зрения при увеличении $\times 20$. Экспрессию VEGF определяли в интенсивности окрашивания опухолевых клеток, как 1+ при низкой интенсивности окрашивания, и как 2+ при средней интенсивности окрашивания.

Результаты. В группе контроля интенсивность окрашивания VEGF составила 2+. Под влиянием метформина и совместного использования мелатонина и метформина интенсивность окрашивания VEGF уменьшилась до 1+. В группе контроля количество CD31+ сосудов в поле зрения составляет 15+3. Под воздействием мелатонина данный показатель составил 10+5. Под влиянием метформина и совместного использования мелатонина и метформина количество CD31+ сосудов в поле зрения уменьшилось до 8+3.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение мелатонина и метформина способствует снижению активности ангиогенеза в ткани индуцированных неоплазий.

О.Н. Дерябина, Н.А. Плотникова, С.П. Кемайкин, С.В. Харитонов, Т.В. Харитоновна, И.В. Карьгина **РЕГИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ РАКОМ ЯИЧНИКОВ ЗА ПЕРИОД С 2009 ПО 2013 ГГ. (РЕСПУБЛИКА МОРДОВИЯ)**

ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева», Саранск

Актуальность. Рак яичников занимает третье место в структуре злокачественных новообразований женских половых органов и первое место в структуре смертности от этих заболеваний.

Задача исследования. Выявить уровень заболеваемости раком яичников в Республике Мордовия за период с 2009 г по 2013 г.

Материалы и методы. При изучении заболеваемости раком яичников в Республике Мордовия проводился анализ статистики морфологической верификации диагнозов с учетом количественной характеристики стадийности процесса.

Результаты. Заболеваемость раком яичников в Республике Мордовия в 2009 г. составила 9,88 ‰, в 2010 г. – 2,68 ‰, в 2011 г. – 7,56 ‰, в 2012 г. – 2,56 ‰, в 2013 г. – 8,41 ‰. За период 2009–2013 гг. в Республике Мордовия достоверно увеличилось количество случаев морфологической верификации диагноза рака яичников. За исследуемый период отмечается увеличение выявляемости рака яичников на ранних стадиях в 2011 и в 2013 гг. Так, в 2009 г. количество больных с I стадией рака яичников составило 11,11 %; в 2010 г. – 9,09 %; в 2011 г. – 25,81 %; в 2012 г. – 14,29 %; в 2013 г. – 26,09 %. В 2009 г. количество больных с II стадией рака яичников составило 22,22 %; в 2010 г. – 4,55 %; в 2011 г. – 27,42 %; в 2012 г. – 9,52 %; в 2013 г. – 11,59 %. В 2009 г. на III стадии было выявлено 38,27 %; в 2010 г. – 4,55 %; в 2011 г. – 37,1 %; в 2012 г. – 14,29 %; в 2013 г. – 37,68 %. Количество больных с IV стадией заболевания в 2009 г. – 28,4 %; в 2010 г. – 81,82 %; в 2011 г. – 9,68 %; в 2012 г. – 61,9 %; в 2013 г. – 24,64 % от общего числа больных с впервые установленным диагнозом.

Выводы. Пик заболеваемости раком яичников приходится на возраст 45–49 лет. В результате проведенного анализа эпидемиологии рака яичников в Республике Мордовия за исследуемый период можно сделать следующие выводы: за последние годы отмечается рост заболеваемости раком яичников в регионе; за период с 2009 по 2013 гг. отмечена низкая выявляемость заболеваний раком яичников на ранних стадиях.

М.В. Дмитриева, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ БОРХЛОРИНА

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

Актуальность. На сегодняшний день тонкослойная хроматография (ТСХ) является одним из основных методов в фармацевтических исследованиях, в том числе при установлении подлинности препаратов, так как обеспечивает простое и быстрое проведение разделений, хорошую воспроизводимость, обладает отличной селективностью и оптимален в ценовом отношении. В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН разработана лиофилизированная липосомальная лекарственная форма (ЛЛЛФ) отечественного фотосенсибилизатора хлоринового ряда борхлорина. Для идентификации действующего вещества в ЛЛЛФ предложен метод ТСХ.

Задачи исследования. Обнаружение и идентификация борхлорина в ЛЛЛФ методом ТСХ.

Материалы и методы. Анализ проводили с использованием пластинок «Sorbfil» в следующих системах растворителей: 1) Хлороформ/ метанол (9:1), 2) Хлороформ/ этанол (20:1), 3) Хлороформ/ этанол/ вода (65:25:4), 4) Хлороформ/ этанол/ ЛУК/ вода (40:10:7:3), 5) Хлороформ/ этанол/ пропанол-2/ ЛУК/ вода (6:3:3:2:1), 6) Хлороформ/ ацетон/ ЛУК/ вода (25:15:5:4), 7) Хлороформ/ пропанол-2/ ЛУК/ вода (6:3:2:1), 8) Хлороформ/ аммиак 25% (4:1), 9) Ацетон/ этилацетат/ ЛУК/ вода (15:10:3:5), 10) Этанол/ аммиак водный (7:3), 11) Пропанол-2/ ЛУК/ вода (12:3:1), 12) н-Бутанол/ ЛУК/ вода (6:3:2). ЛЛЛФ борхлорина регидратировали водой и добавляли этанол до получения раствора с концентрацией 0,1 мг/мл. Стандартный 0,1 мг/мл раствор борхлорина получали растворением субстанции в этаноле. На линию старта наносили по 5 мкл раствора препарата и стандарта. После подсушивания на воздухе пластинку помещали в камеру, предварительно насыщенную парами смеси растворителя, и хроматографировали до достижения фронтом растворителя линии финиша (длина пробега 12 см). Затем пластинку вынимали из камеры и подсушивали на воздухе. Обнаружение борхлорина проводили визуально (зеленые пятна).

Результаты и выводы. В ходе исследования в образцах лекарственной формы (ЛФ) и стандарта (Ст) установлены следующие значения R_f : 1) ЛФ – 0,22, Ст – 0,13; 2) ЛФ – 0,06, Ст – 0,02; 3) ЛФ – 1,0, Ст – 1,0; 4) ЛФ – 1,0, Ст – 1,0; 5) ЛФ – 0,55, Ст – 0,60; 6) ЛФ – 0,56, Ст – 0,48; 7) ЛФ – 0,58, Ст – 0,52; 8) ЛФ – 0,08, Ст – 0,06; 9) ЛФ – 0,57, Ст – 0,59; 10) ЛФ – 0,55, Ст – 0,56; 11) ЛФ – 0,36, Ст – 0,13; 12) ЛФ – 0,50, Ст – 0,50. Таким образом, для обнаружения и идентификации борхлорина в ЛЛЛФ рекомендуется проводить ТСХ с использованием 12-й системы растворителей.

*И.Н. Дружкова¹, М.М. Кузнецова¹, М.В. Ширманова¹,
Л.Б. Снопина¹, Н.Н. Проданец¹, В.В. Белоусов^{2,1}, С.А. Лукьянов^{2,1}, Е.В. Загайнова¹*

РЕГИСТРАЦИЯ pH ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМОГО СЕНСОРА

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

²Институт биоорганической химии РАН, Москва

Актуальность. Внутриклеточный уровень pH является важным фактором и лежит в основе многих физиологических процессов в клетке. Установлено, что практически все патологические процессы сопровождаются изменением уровня pH. Известно, что более низкий уровень pH опухолевых клеток обеспечивает повышенную чувствительность к цитокинам и имеет существенное значение в формировании множественной лекарственной устойчивости. Поэтому информация о значении pH необходима для исследования биологии опухоли.

Задача исследования. Разработка метода регистрации уровня pH с помощью генетически-кодируемого сенсора на основе желтого флуоресцентного белка *сrYFP* и флуоресцентного биоимиджинга.

Материалы и методы. Работа выполнена на клетках HeLa Kyoto, экспрессирующих флуоресцентный белок, и на 3D модели опухоли (сфероиды), сформированных из тех же клеток. Оценку флуоресценции *in vitro* проводили на флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse Ti E.

Результаты. Получена 3D-модель опухоли, экспрессирующей флуоресцентный белок, в матриксе. Разработана методика ратиометрической визуализации сигнала сенсора по данным флуоресцентной микроскопии. Значения сигнала откалиброваны с использованием клеточной культуры и набора буферов со значениями pH в диапазоне от 6,7 до 8,0. По результатам исследования *in vitro* показано, что уровень pH в 3D опухолевой модели неоднороден. В центре опухолевого узла наблюдается более щелочное значение внутриклеточного pH, чем на периферии.

Выводы. Полученные результаты указывают на перспективность использования генетически-кодируемого сенсора на основе желтого флуоресцентного белка *сrYFP* для определения уровня внутриклеточного значения pH и проведения дальнейших исследований на опухолях животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки (договор № 11.G34.31.0017).

Е.А. Епифанова¹, А.А. Бабаев¹, О.А. Гамаюнова², С.В. Гамаюнов², В.В. Новиков¹
**СЫВОРОТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ
 ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЁГКИХ**

¹ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород

²ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России, Нижний Новгород

Актуальность. Растворимые формы мембранных молекул адгезии можно рассматривать в качестве эндогенных иммунорегуляторных молекул. В ходе исследований, проводимых различными лабораториями, показана несомненная прогностическая и мониторинговая значимость сывороточного уровня растворимых форм ряда мембранных молекул.

Цель исследования. Изучение сывороточного уровня растворимых молекул адгезии при заболеваниях легких. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: оценить сывороточное содержание растворимых молекул адгезии CD54, CD50, CD18, растворимых комплексов CD18-CD54 и CD18-CD50, олигомерных молекул oCD50 и oCD54 при заболеваниях легких.

Материалы и методы. Материалом для исследований служили 100 образцов сыворотки крови больных различными заболеваниями лёгких (туберкулёз, рак лёгкого, пневмония), предоставленные Нижегородским областным противотуберкулезным диспансером. Основным методом исследования являлся твердофазный иммуноферментный анализ. Для проведения иммуноферментного анализа применяли мышинные моноклональные антитела серии ИКО (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва), а также поликлональные антитела, направленные против поверхностных антигенов лимфоцитов периферической крови человека.

Результаты. В ходе работы у больных было выявлено увеличение сывороточного содержания растворимых молекул адгезии CD54 в 1,5 раза, CD18 в 1,5 раза и oCD54 в 1,1 раза по сравнению с контрольной группой здоровых доноров. Также выявилось увеличение уровня растворимых комплексов CD18-CD54 в 1,6 раза и CD18-CD50 в 1,3 раза у людей с различными заболеваниями легких по сравнению с группой здоровых людей. Несмотря на это относительная концентрация растворимых молекул CD50 и их олигомерной формы oCD50 у людей с различными заболеваниями легких уменьшилась по сравнению с контрольной группой в 1,3 раза и в 1,5 раза соответственно.

Выводы. Таким образом, при заболеваниях легких наблюдалось увеличение уровня растворимых молекул адгезии, что говорит об активации иммунологических реакций.

*Н.П. Ермакова¹, А.П. Бонарцев^{2,3}, О.И. Коняева¹, Н.Ю. Кульбачевская¹,
 А.А. Сергеев¹, А.Л. Зернов¹, С.Г. Яковлев², Г.А. Бонарцева³, К.В. Шайтан², В.М. Бухман¹*
**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
 БИОПОЛИМЕРНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПАКЛИТАКСЕЛА**

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

²МГУ им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Цель исследования. Изучение «острой» токсичности биополимерной лекарственной формы паклитаксела (БЛФП) для лечения опухолевых заболеваний.

Материалы и методы. Исследования проведены на 180 мышах-самцах и самках гибридах B₆D₂F₁, массой 20–23 г, 120 крысах-самцах и самках неинбредных, массой 150–160 г, полученных из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН. БЛФП представляет собой 5% суспензию биополимерных микрочастиц в физиологическом растворе хлористого натрия. Микрочастицы получены методом пьезоэлектрического распыления на биологическом факультете МГУ, содержащие лекарственной субстанции паклитаксела (ПКЛ) в микрочастицах – 10±1%. БЛФП вводили внутривентально однократно мышам в ранже доз от 1000 до 6000 мг/кг, а крысам – от 500 до 2500 мг/кг. В качестве контроля использовали ПКЛ-Тева серии 11G29KD концентрат для приготовления раствора для инфузий 6 мг/мл. ПКЛ-Тева вводили однократно внутривентально в 5% концентрации мышам в дозе 1000 мг/кг, крысам в дозе 500 мг/кг.

Результаты. Установлены расчетные токсические дозы БЛФП для мышей-самцов: ЛД₁₀ – 952(665÷1239) мг/кг; ЛД₅₀ – 1618(1387÷1849) мг/кг, для мышей-самок: ЛД₁₀ – 3714(3317÷4111) мг/кг; ЛД₅₀ – 4372 (4121÷4623) мг/кг, для крыс-самцов: ЛД₁₀ – 591 (447÷735) мг/кг; ЛД₅₀ – 819 (725÷913) мг/кг и для крыс-самок: ЛД₁₀ – 462 (259÷665) мг/кг; ЛД₅₀ – 657 (555÷759) мг/кг. Гибель животных наблюдалась с 3 по 30 сутки после введения БЛФП. Клиническая картина интоксикации на мышах и на крысах после введения в летальных дозах аналогична: уменьшение массы тела на 15–25 %, пилоэрекция, мидриаз, гиподинамия, диарея, анорексия. На аутопсии: препарат в брюшной полости находился свободно белыми кусками и частично осумкован и в виде белого налета на внутренних органах. В просвете кишечника сукровичное содержимое (4–8 сутки), или толстый кишечник растянут сухими каловыми массами (5–30сутки), печень светло-коричневая увеличена, селезенка уменьшена. У выживших животных, получивших сублетальную дозу БЛФП, на 30 сутки в брюшной полости геморрагический экссудат. После введения ПКЛ-Тева гибель животных происходила в течение 2 часов.

Выводы. БЛФП при внутривентальном введении мышам и крысам менее токсична в эквивалентах чем ПКЛ-Тева. Выявлена половая зависимость при внутривентальном применении БЛФП мышам гибридам B₆D₂F₁ по величине расчетных токсических доз: самки примерно в 3 раза менее чувствительны, чем самцы.

Т.М. Ермоленко, А.Д. Мурашко, О.Г. Парахневич, Т.В. Трухачева, Н.П. Янюк

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ПРЕПАРАТ «ВИНОРЕЛБИН», КОНЦЕНТРАТ ДЛЯ ИНФУЗИЙ 10 МГ/МЛ», ПРОИЗВОДСТВА РУП «БЕЛМЕДПРЕПАРАТЫ»

РУП «Белмедпрепараты», Минск, Беларусь

Задачи исследования. Разработать технологию производства стабильного противоопухолевого препарата на основе производного винкаалкалоидов – винорелбин.

Материалы и методы. Для разработки препарата использована субстанция винорелбин тартрат производства Hubei HONCH Pharmaceutical Co., Ltd., для изучения стабильности при контроле качества препарата использовались методы ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрии.

Результаты. РУП «Белмедпрепараты» разработана технология производства, позволяющая на выпуске получить препарат высокого качества и обеспечивающая стабильность лекарственной формы препарата в течение всего срока годности.

Основные примеси, которые могут образовываться в процессе производства и при хранении лекарственного средства – это продукт фотодинамического разложения (примесь А) и продукт деацетилирования – примесь В. Эффективность разработанной технологии подтверждает исключительная стабильность раствора препарата Винорелбин. В растворе, приготовленном для розлива, в течение 48 часов при температуре 25 ± 2 °С отсутствует нарастание примесей, неизменным остается содержание действующего вещества. Это позволило установить в препарате на момент выпуска предельные нормы по содержанию сопутствующих примесей практически на уровне их значений в исходной субстанции: примесь А – до 0,4 %; примесь В – до 0,2 %, любая единичная примесь – до 0,2 %, суммарное содержание примесей – 1,0 %. Результаты проведенных исследований по изучению стабильности в условиях долгосрочных ($2-8$ °С) испытаний подтвердили стабильность разработанного препарата в течение 2 лет. В течение срока годности наблюдается медленный рост примеси А: содержание примеси А – не более 1,0 %, примеси В – не более 0,3 %, любой единичной примеси – не более 0,2 %. Для контроля качества препарата разработана и провалидирована высокоточная методика ВЭЖХ, позволяющая вести количественный контроль за содержанием примесей, что гарантирует высокое качество препарата Винорелбин, концентрат для инфузий 10 мг/мл, производства РУП «Белмедпрепараты».

Выводы. Разработана технология получения препарата Винорелбин, концентрат для инфузий 10 мг/мл, которая обеспечивает его качество и стабильность. Современные методики оценки качества позволяют обеспечить эффективный контроль физико-химических характеристик препарата в процессе производства и при хранении.

Н.В. Ефремова, Е.К. Кречина, Н.А. Дмитриева, Л.Б. Ярыгина

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ФДТ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ ПАРОДОНТА

ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» МЗ РФ, Москва

Актуальность. По данным литературы имеются сведения, подтверждающие антимикробную эффективность метода фотодинамического воздействия на патогенную микрофлору инфекционного очага [Гельфонд Б.Р., 2001; Яшунский Д.В., 2002; Maisch T. et al., 2004]. Однако, в стоматологии сведения о применении ФДТ незначительны. В связи с чем, изучение антимикробного эффекта ФДТ при воздействии на пародонтальную флору актуально.

Цель исследования. Изучить эффективность ФДТ на аэробные микроорганизмы при воспалительных заболеваниях пародонта при воздействии различных фотосенсибилизаторов в зависимости от плотности энергии.

Материалы и методы. У 60 пациентов с диагнозом катаральный гингивит и генерализованный пародонтит были выделены аэробные микроорганизмы из пародонтальных карманов и представлены в виде смешанной культуры стрептококка, *S.albicans*, *E.faecalis* и *E.coli*. В качестве фотосенсибилизаторов были использованы метиленовый синий (0,5–1,0 %), толлуидиновый голубой (0,5–1,0 %) и фотодитазин 0,5 %. Суточные культуры микроорганизмов (в разведении 1:1000) высевали на чашки Петри с селективными питательными средами. Затем посевы облучали лазерным излучением с длиной волны 661 нм и плотностью энергии 90 и 100 Дж/см² с помощью прибора Латус-04 (ЗАО «Полупроводниковые приборы», Санкт-Петербург). Учет результатов проводили через 24 часа путем измерения зоны задержки роста в области лазерного воздействия.

Результаты. Анализ полученных результатов показал, что наибольшая активность лазерного излучения отмечена при плотности энергии 100 Дж/см². По отношению к смешанной культуре стрептококков наибольшая активность ФДТ была определена у всех фотосенсибилизаторов, несколько сниженное действие на *S.faecalis* отмечено при использовании 0,5% метиленового синего. При воздействии ФДТ на *S.albicans* лучшие результаты установлены при использовании 0,5% фотодитазина. При оценке лазерного воздействия на кишечную палочку (*E.coli*) наибольший антимикробный эффект отмечен при использовании фотосенсибилизаторов: 0,5% метиленового синего и 0,5% фотодитазина.

Выводы. Таким образом, эффективность ФДТ терапии зависит не только от длины волны лазерного излучения, но и от плотности энергии. Проведенные исследования выявили различия эффективности антимикробного действия ФДТ на изучаемые виды микроорганизмов.

Л.Ф. Жандарова¹, О.А. Калмыкова², О.М. Конопацкова¹, Н.А. Волкова²

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЛЕЧЕБНОГО ПАТОМОРФОЗА ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского МЗ РФ, Саратов

²НУЗ Дорожная клиническая больница на станции Саратов II ОАО РЖД, Саратов

Актуальность. В связи с широким применением в онкологии комбинированных методов лечения (лучевое, химиотерапевтическое и гормональное воздействие) особое значение приобретает морфологическая характеристика опухолевого процесса. неоценимые данные могут быть получены цитологическим методом. он позволяет провести сравнительное изучение опухоли до начала, в процессе и после операции (по соскобам с разреза тканей и органов, удаленных хирургическим путем).

Задача исследования. Изучить результаты лекарственного патоморфоза при неоадьювантной полихимиотерапии больных раком молочной железы.

Материалы и методы. В клинике онкологии более 20 лет назад разработан и внедрен в практику цитологический метод количественной оценки терапевтического патоморфоза при злокачественных новообразованиях. с этой целью подсчитывается процент дистрофически измененных клеток (пдик-1) рака в исходных препаратах и определяется пдик-2, являющийся суммарным показателем спонтанной дегенерации клеток и лечебного патоморфоза опухоли. разность этих показателей (дельта-пдик) отражает величину истинного лечебного патоморфоза.

Результаты. Терапевтический патоморфоз после неоадьювантной полихимиотерапии по схеме ад с помощью цитологического метода изучен у 158 больных раком молочной железы iiiа (t3n1m0) стадии. преобладали женщины старше 50 лет (69%). после трех курсов неоадьювантной полихимиотерапии всем больным выполнена мастэктомия маддена. целью неоадьювантного химиотерапевтического лечения является достижение полного морфологического регресса опухоли, что значительно улучшает результаты пятилетней выживаемости больных. выраженные проявления патоморфоза отмечены у 34 % больных, незначительный эффект – у 59 % пациентов. полная резорбция опухоли наблюдалась в 7 % наблюдений.

Выводы. Разработанный нами метод определения лечебного патоморфоза цитологическим методом является простым и достоверным. Применение его возможно при различных вариантах лечения.

А.А. Журбина, Г.А. Блувитейн

ПОВТОРНЫЕ ОПЕРАЦИИ У БОЛЬНЫХ С РЕЦИДИВОМ ЗОБА, ВОЗНИКШИМ В ТЕЧЕНИЕ ГОДА ПОСЛЕ ВМЕШАТЕЛЬСТВА

ГУЗ «Областной онкологический диспансер №1», Саратов

ГУЗ «Областная клиническая больница», Саратов

Частота послеоперационного рецидивного зоба, по данным литературы, колеблется в широких пределах от 0,3 до 41%.

Цель исследования. Определение групп риска рецидива заболевания, развивающегося в первый год после оперативного вмешательства.

Материалы и методы. Использованы данные ООД №1 за период с 2001 по 2010 гг.

Результаты. Проведен анализ лечения 95 пациентов с послеоперационным рецидивным зобом оперированных повторно в ООД №1 с 2001 по 2010 годы. Среди них 83 женщины (78,8 %) и 12 мужчин (11,2 %). Средний возраст составил 54±0,4 лет. Из всех пациентов в течение первого года после операции повторно оперированы 29 пациентов (31 %), из них 16 (55,2 %) были в возрасте 50 лет и старше. Женщин 22, мужчин 7. Первично им выполнялись 38 различных вмешательств на щитовидной железе. При анализе пациентов с рецидивами в течение первого года, выявлена группа в 6 человек, которые прооперированы дважды до поступления в клинику. Средний возраст 54±0,3 лет. Женщин 4, мужчин 2. Ранее им выполнено 14 оперативных вмешательств: резекция щитовидной железы – 3 (21,4 %), гемитиреоидэктомия – 3 (21,4 %), субтотальная резекция щитовидной железы – 1 (7,2 %), тиреоидэктомия – 2 (14,2 %), ФФИКШ или лимфоаденэктомия – 3 (21,4 %), широкое иссечение метастаза – 1 (7,2 %), стернотомия – 1 (7,2 %). Морфологические заключения были следующие: фолликулярный рак – 3 (21,4 %), папиллярный рак – 3 (21,4 %), фолликулярно-папиллярный рак – 1 (7,2 %), медуллярный рак – 3 (21,4 %), доброкачественное поражение – 3 (21,4 %), в одном вмешательстве – неизвестно (7,2 %). Этой группе пациентов выполнено 6 различных вмешательств: гемитиреоидэктомия – 1 (16,7 %), субтотальная резекция – 1 (16,7 %), тиреоидэктомия – 2 (33,3 %), операция Крайла – 2 (33,3 %). При морфологическом заключении в 4 случаях (66,7 %) из 6 получен рак различной степени дифференцировки, в 2 (33,3 %) – доброкачественные изменения.

Выводы. Рецидив в течение первого года чаще возникает у пациентов, ранее оперированных по поводу злокачественного поражения щитовидной железы, которым выполнены органосохраняющие операции в возрасте 50 лет и старше, что требует учёта этих факторов при первой операции и расширения объема операции при повторных вмешательствах.

О.И. Задорожная¹, Л.Р. Тилова¹, К.И. Кирсанов¹, М.Г. Якубовская¹,
И.В. Будунова², Г.А. Белицкий¹, Е.А. Лесовая¹

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО СЕЛЕКТИВНОГО АГОНИСТА ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА CPdA *IN VIVO*

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

²Northwestern University, Chicago, USA

Актуальность. Глюкокортикоиды широко используются при лечении гемобластозов. Их биологический эффект реализуется путем активации глюкокортикоидного рецептора, регулирующего экспрессию генов посредством запуска транс-активации, связанной с развитием осложнений, и транс-репрессии, обуславливающей терапевтическое действие. Перспективным направлением исследований является анализ эффектов селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора – аналогов глюкокортикоидов со сниженными побочными эффектами. Ранее мы показали *in vitro*, что соединение этого класса, Cpda, обладает противоопухолевым эффектом на клетки гемобластозов. Однако на моделях гемобластозов *in vivo* эффекты Cpda изучены не были.

Задачи исследования. Оценка влияния селективного агониста глюкокортикоидного рецептора Cpda на рост подкожных ксенографтов лимфомы у бестимусных мышей, изучение молекулярных механизмов биологического действия Cpda и глюкокортикоидов в ткани ксенографтов лимфомы.

Материалы и методы. Иммунодефицитным мышам подкожно вводили 10 млн клеток лимфомы мантийной зоны селезенки линии Granta. На 7 день после перевивки животным было начато внутрибрюшинное введение дексаметазона, Cpda или физиологического раствора. На 32 день эксперимента опухолевую ткань извлекали и анализировали с помощью иммуногистохимии или ПЦР на специфические маркеры пролиферации, апоптоза и транс-активации/транс-репрессии.

Результаты и выводы. Впервые было показано, что новый нестероидный лиганд глюкокортикоидного рецептора Cpda снижает рост ксенографтов лимфомы у иммунодефицитных мышей *in vivo* в 2,5 раза, причем его действие сравнимо с действием глюкокортикоидов. В образцах, полученных от животных, получавших Cpda, наблюдали значительно меньшее количество жизнеспособных клеток, чем в контроле. Также Cpda вызывал более активный запуск механизма транс-репрессии.

М.Т.Зангиева, М.А.Барышникова, Е.В.Игнатьева, В.С.Косоруков, А.А.Матюшин, А.Ю.Барышников

РАЗРАБОТКА СОСТАВА ПРОСТРАНСТВЕННО СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ИММУНОЛИПОСОМ, НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВ HER2-РЕЦЕПТОРА

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

Актуальность. Новым этапом развития нанотехнологии стал метод присоединения лигандов к концу полиэтиленгликоля для создания иммунолипосом. Благодаря этой методике появилась возможность избирательно доставлять лекарственный препарат к опухолевой клетке. В качестве лигандов могут выступать моноклональные антитела, F(ab), пептиды. Использование человеческих антител, в отличие от мышиных, позволяет исключить индукцию иммунного ответа, а также ослабить разрушение препарата в печени, и способствует протеканию таких иммунологических реакций как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность и комплемент-зависимая цитотоксичность, что важно для поражения злокачественных клеток. В связи с этим гуманизированные антитела подходят для активной доставки препарата в опухолевую клетку.

Цель исследования. Разработка состава иммунолипосом, нагруженных доксорубицином, направленных против HER2-рецептора.

Результаты. Инкапсулирование препарата в иммунолипосомы осуществляли по принципу активной загрузки с помощью ионного градиента сульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 5,5. Для чего пустые липосомы помещали во флакон вместимостью 10 мл и добавляли гуманизированные моноклональные антитела, исходя из мольного соотношения белок pNP-PEG₃₀₀₀-lipid 1:40. Смесь перемешивали и добавляли буфер, содержащий 10 мМ HEPES и 145мМ NaCl (pH 8,2-8,4) и раствор Доксорубицина с концентрацией 1 мг/мл. Далее доводили pH в дисперсии 3 М раствором NaOH до значения 8,5–8,6 и инкубировали в течение 12 ч при +4 °C и постоянном перемешивании. Весовое соотношение препарат : липиды составило 0,042:1. Измерение диаметра полученных везикул проводили на приборе Nicomp 380 Submicron Particle Sizer. Для очистки иммунолипосомальной дисперсии от не включившегося препарата и от не присоединившихся антител использовали метод гелефильтрации на колонке C 16/40 (Amersham Biosciences, Швеция), предварительно заполненную сорбентом Sepharose CL-4B и уравновешенную 0,15 М NaCl. Содержание Доксорубицина в иммунолипосомах определяли методом спектрофотометрии при λ 252±2 нм. Размер иммунолипосом составил 140±2 нм. Включение в везикулы Доксорубицина 80,2 %. Содержание цитостатика 1 мг/мл.

Выводы. Получены иммунолипосомы с высокой степенью загрузки препарата, направленные против HER2-рецептора.

Е.Н. Захарова, Т.Н. Заботина, Н.В. Голубцова, И.В. Чинарева, П.К. Иванов, Д.Ю. Блохин
ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ НА ОСНОВЕ МКА СЕРИИ ICO
И ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ALEXA-488

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

Задачи исследования. Оптимизация условий получения флуоресцентных зондов на основе Alexa-488 и мышиных моноклональных антител (МКА) серии ICO для иммунофенотипирования лимфоцитов человека.

Материалы и методы. В работе использовали мышиные МКА (НПЦ МедБиоСпектр, Россия) к В- (CD20, клон ICO-180) и Т-клеточным (CD4, клон ICO-86; CD8, клон ICO-31) рецепторам лимфоцитов человека, сукцинимидный эфир красителя Alexa-488 (Invitrogen, США). Для получения конъюгатов МКА инкубировали с сукцинимидным эфиром флуорофора в молярном соотношении от 1:2 (М:М) до 1:100 (М:М) в карбонатном буфере (рН 8,3) при +18–25 °С в темноте в течение 90 минут. Условия инкубации подбирали экспериментально. Очистку конъюгатов от несвязавшегося флуорофора проводили гель-хроматографией на колонке Sephadex G-25, уравновешенной фосфатно-солевым буфером, рН 7,4. Далее рассчитывали плотность мечения. Полученные конъюгаты стабилизировали 1,0% раствором БСА с 0,1% азида натрия. Специфическую активность конъюгатов оценивали в прямой РИФ с последующим анализом на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD Biosciences, США) и регистрацией флуоресценции по каналу FL1. Для сравнительной характеристики доли антиген-позитивных клеток в популяции (%) и медианы интенсивности флуоресценции (MFI) применяли коммерческие МКА к тем же антигенам, конъюгированные с FITC и PE (BD Biosciences, США).

Результаты. Получены конъюгаты МКА и Alexa-488 с различной плотностью мечения. Показано, что оптимальным соотношением метки и иммуноглобулина для конъюгата CD20/Alexa-488 является диапазон 5–13,5:1 (моль : моль), для конъюгатов CD4/Alexa-488 и CD8/Alexa-488 – диапазон 4–9:1 и 4–10:1 (моль : моль) соответственно. Методом дробного титрования определили рабочие концентрации синтезированных конъюгатов в диапазоне исходных концентраций 0,5–100 мкг/мл: для конъюгатов CD4/Alexa-488 и CD8/Alexa-488 диапазон рабочих концентраций составил 2,5–10 мкг/мл, а для конъюгата CD20/Alexa-488 – 5–50 мкг/мл.

Выводы. Конъюгирование флуоресцентного красителя Alexa-488 с МКА в оптимальных соотношениях не оказывает влияния на иммунохимические свойства последних, что позволяет рекомендовать их к использованию для цитометрического анализа клеточных популяций с анализом по FL-1 каналу флуоресценции.

Ф.А. Ибрагимов, Ю.В. Береснева, Ю.Ю. Ассесорова

ОЦЕНКА ОРГАНОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ 5-ФТОРУРАЦИЛА
И СОЕВОГО БЕЛКА, БОГАТОГО ИЗОФЛАВОНАМИ

Институт биоорганической химии АН РУз, г. Ташкент

Актуальность. В Институте биоорганической химии АН РУз получена стандартизированная комбинация полипептидов из соевой муки с молекулярной массой 12,5–79,0 кДа, обогащенная изофлавоном. Соевый белок на позднем этапе развития опухоли, вводимый в монорежиме, вызывает торможение роста опухоли до 71,3 % по массе и до 73,0 % по объему. При введении соевого белка совместно с 5-фторурацилом, значения ТРО увеличиваются на 20 %.

Задача исследования. Изучить гепатотропное и спленотропное действие 5-фторурацила и соевого белка на позднем этапе развития опухоли.

Материалы и методы. Соевый белок вводили *per os* в дозе 75 мг/кг в течение 10 дней, 5-фторурацил 228 мг/кг внутривенно на 10-й, 12-й и 14-й день после перевивки опухоли. Исследовали гепатотропное и спленотропное действие проводимой терапии методом сравнительной оценки массы печени и селезенки (г) и визуально-тактильной оценки цвета, макроструктуры и консистенции данных органов у животных опытных и контрольной групп.

Результаты. Воздействие соевого белка (I группа), вводимого в монорежиме приводило к статистически значимым изменениям массы печени, которая на 25 % (<0,05) снижалась по сравнению с контролем (нелеченные животные-опухоленосители). При этом масса печени составила ~5,6 % от массы тела мышей, тогда как физиологическая норма находится в пределах 0,40–0,54 %. Во II группе, где соевый белок вводился совместно с 5-фторурацилом, а также в III группе, где терапия проводилась только 5-фторурацилом, снижение массы печени также имело место (соответственно ~6,5 % и ~7,2 % от общей массы животного). Макроскопический осмотр органа показал, что в контрольной группе печень нелеченных животных значительно варьировала по цвету и консистенции, тогда как у животных всех подопытных групп печень не имела существенных различий. Доля селезенки в контрольной группе нелеченных животных-опухоленосителей составила ~2,1 % от массы тела мышей, тогда как физиологическая норма составляет 0,38 %. В I, II и III группе доля селезенки от общей массы животных составила, соответственно, 1,6 %, 2,5 % и 2,4 %. Макроскопический осмотр селезенки не выявил каких-либо визуальных изменений цвета, формы и консистенции органа.

Вывод. Препарат из сои не оказывает токсического и гепатотропного действия.

С.В. Иванников, А.В. Бородин, Т.А. Жарова, В.И. Макаров, К.Г. Линьков, А.М. Тоненков, М.В. Лощенов
**ВИДЕОФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ АРТРОСКОПИЧЕСКАЯ НАВИГАЦИЯ
ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПАТОЛОГИЙ КРУПНЫХ СУСТАВОВ**

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва

Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Задачи исследования. В настоящей работе исследовалось накопление фотосенсибилизатора в крупных суставах человека до, в процессе и после сеанса фотодинамической терапии с применением новых методов и нового диагностического оборудования.

Материалы и методы. Разработаны аппаратура и метод, позволяющие проводить флуоресцентную видеонавигацию в предварительно фотосенсибилизированных с применением препарата Фотодетазин воспаленных тканях плечевого и коленного суставов человека. Аппаратура уникальна своими режимами работы, система способна одновременно выводить на экран два изображения: цветное и флуоресцентное одновременно. Концентрация фотосенсибилизатора определяется в любой требуемой точке изображения в цифровом виде в режиме монитора. Возбуждение флуоресценции производилось лазерным источником света длиной волны 635 нм. Контроль терапевтической дозы лазерного облучения отслеживался по фотобличингу в красном диапазоне длин волн, что позволило проводить диагностику даже при наличии тонких слоев крови на исследуемых тканях. Проверка показаний метода производилась с применением волоконно-оптического спектрометра.

Результаты и выводы. Метод продемонстрировал чувствительность к контрасту интенсивности флуоресценции фотосенсибилизатора в нормальных и воспаленных тканях сустава, что свою очередь, позволяет делать вывод о контрасте накопления фотосенсибилизатора и возможности применения фотодинамической терапии. Также метод доказал свою применимость для контроля хода фотодинамической терапии по степени выгорания фотосенсибилизатора.

О.А. Ивашкевич¹, П.М. Бычковский², Т.Л. Юрkitович³, Д.А. Адамчик¹, А.К. Кононович¹, И.И. Тагиль¹
**СОЗДАНИЕ МАЛОТОННАЖНОГО ПРОИЗВОДСТВА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ И
ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА УНП РУП «УНИТЕХПРОМ БГУ»**

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²УП «Унитехпром БГУ», Минск, Беларусь

³НИИ ФХП БГУ, Минск, Беларусь

Одним из приоритетных направлений развития Республики Беларусь и обеспечения ее национальной безопасности в сфере производства и обращения лекарственных средств является разработка и освоение выпуска фармацевтических субстанций, оригинальных и генерических лекарственных средств для лечения сердечно-сосудистых, онкологических и др. заболеваний

УНП РУП «Унитехпром БГУ» реализует проект «Создание малотоннажного производства фармацевтических субстанций для получения противоопухолевых, кардиотропных и других лекарственных средств, соответствующих стандартам GMP на базе организаций Минобразования», в рамках которого предполагается модернизация имеющегося производства оригинального препарата «Цисплацел» (Патенты РБ №6420, №5748) для локальной химиотерапии злокачественных опухолей головного мозга и опухолей в области головы и шеи, создание производства дженерических фармацевтических субстанций темозоломида, проспидия хлорида для получения противоопухолевых препаратов и оригинальных фармацевтических субстанций темодекс (Патенты РБ №16085, №15961, №15136) и проспиделонг (Патенты РБ №14762, №15136, Патенты России №2455007, №2442586) и готовых лекарственных форм в соответствии с международными требованиями надлежащей производственной практики – GMP.

Социальный эффект от реализации проекта: обеспечение независимости от импортных поставок субстанций эффективных противоопухолевых и кардиотропных препаратов, обеспечение фармацевтической промышленности Республики Беларусь высококачественными субстанциями темозоломида, темодекса, проспиделонга и нитаргала для производства их готовых лекарственных форм.

Данная фармацевтическая продукция разработана и разрабатывается в НИИ ФХП БГУ в рамках Государственной научно-технической программы «Новые лекарственные средства» (2006-2010 годы) и «Фармацевтические субстанции и лекарственные средства» (2011-2015 годы).

Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева, Н.А. Дмитричева, Е.В. Санарова, З.С. Шпрах

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ СЕКОИЗОЛАРИЦИРЕЗИНОЛА

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

Актуальность. Секоизоларицирезинол – отечественный препарат, предлагаемый для лечения эстрогено-зависимых опухолей. В ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН разработана лекарственная форма (ЛФ) секоизоларицирезинола, представляющая собой желатиновые капсулы, содержащие гранулят из смеси основного действующего вещества и вспомогательных веществ.

Цель исследования. Стандартизация лекарственной формы секоизоларицирезинола.

Материалы и методы. Исследования проводились на 5 сериях препарата по критериям: описание, подлинность, средняя масса капсулы, средняя масса и однородность по массе содержимого капсулы, распадаемость, растворение, посторонние примеси, потеря в массе при высушивании, количественное определение.

Результаты. Подлинность препарата подтверждали электронным спектром поглощения, где в области от 200 до 400 нм должны присутствовать максимумы поглощения при длинах волн 209 ± 2 нм, 228 ± 2 нм и 282 ± 2 нм. Отклонение массы каждой капсулы не превышало ± 10 % от средней массы. Средняя масса содержимого капсулы находилась в пределах от 115 мг до 140 мг. Образцы препарата при температуре 37 ± 2 °С. полностью распадались в течение 10 мин. При проведении теста «Растворение» в качестве среды растворения использовали 0,2% раствор твин-80 в 0,1 М кислоте хлористоводородной. Количество действующего вещества, перешедшее в среду растворения, определяли спектрофотометрически. При температуре 37 ± 2 °С в течение 2 часов в среду растворения переходило более 75 % действующего вещества. Определение посторонних примесей проводили методом ВЭЖХ. Содержание суммы посторонних примесей не превышало 1,5 %. Для определения потери в массе при высушивании содержимое капсулы высушивали при температуре 105 °С до постоянной массы. Потеря в массе не превышала 6,0 %. Для количественного определения секоизоларицирезинола использовали метод прямой спектрофотометрии. Содержание действующего вещества одной капсуле находилось в пределах от 92,5 г до 107,5 мг.

Выводы. Выбраны критерии качества и разработаны методики их определения для стандартизации лекарственной формы «Секоизоларицирезинол, капсулы 100 мг».

Авторы выражают благодарность ООО «Медресурс» (г. Москва) за финансовую поддержку исследований.

Е.В. Игнатьева, Н.А. Дмитричева, И.В. Ярцева, М.А. Барышникова

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ OR-2011

В МОДЕЛЯХ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

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

Актуальность. С целью создания стабильного в хранении и эффективного лекарственного средства на основе OR-2011 – нового отечественного производного из класса нитрозоалкилмочевин – в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН предложено несколько моделей его лиофилизированной лекарственной формы (ЛЛФ).

Цель исследования. Разработка наиболее точной и чувствительной методики количественного определения содержания OR-2011 в технологическом концентрате и полученных моделях ЛЛФ.

Материалы и методы. Для разработки методики количественного определения содержания OR-2011 был использован метод спектрофотометрии в видимой области.

Результаты. Содержание OR-2011 в ЛЛФ определяли в интенсивном максимуме поглощения при длине волны 228 ± 2 нм. Было установлено, что интенсивность поглощения водных растворов ЛЛФ препарата в данном максимуме подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера в необходимом диапазоне концентраций от 0,01 мг/мл до 0,04 мг/мл в пересчете на OR-2011. Рабочей концентрацией раствора OR-2011 выбрана концентрация 0,02–0,03 мг/мл, т.к. при этом величина оптической плотности укладывается в интервал, рекомендуемый ГФ XI, а максимумы поглощения в растворах субстанции и лекарственной формы совпадают. При разработке методики необходимо учитывать влияние вспомогательных веществ, входящих в состав ЛФ на спектральные характеристики действующего вещества. На разных этапах разработки лекарственной формы в состав моделей были включены такие вспомогательные вещества как лимонная кислота, лактоза, маннит, коллидон. Растворы лактозы и маннита не поглощают в области 240 нм – 200 нм. В то же время растворы лимонной кислоты и коллидона в этой области имеют незначительное собственное поглощение. Это обстоятельство следует учитывать при анализе, используя в качестве раствора сравнения растворы вспомогательных веществ с соответствующей концентрацией. Разработанная методика обладает достаточной точностью и воспроизводимостью. Относительная ошибка определения не превышает 2,0 %.

Выводы. Разработанная методика может быть использована для количественного определения OR-2011 в технологическом концентрате и моделях ЛЛФ разного состава.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 13411.1008799.13.163 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства класса нитрозомочевин».

Н.А. Кабилдина, В.Б. Сирота, И.М. Омарова, М.Д. Жумакаев

**ПРИМЕНЕНИЕ АРГЛАБИНА
ПРИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ
МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
(ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ)**

Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан

КГП «Областной онкологический диспансер», Караганда, Казахстан

Задачи исследования. Повышение степени доказательности клинической эффективности препарата «арглабин» путем проведения рандомизированного исследования.

Материалы и методы. В исследование включено 48 больных с местнораспространенным раком молочной железы (МРРМЖ) ($T_2N_{1-2}M_0$, $T_3N_{0-2}M_0$) с гистологической и иммуногистохимической верификацией в возрасте от 28 до 75 лет. Из них 25 женщин имели II и 23 – III стадии рака. Все больные разделены на 3 группы – 2 исследуемые, одна – контрольная. В контрольной группе больным проводили 4 курса неоадьювантной ХТ по схеме АС каждые 21 день, радикальную мастэктомию, 4 курса адьювантной ХТ (АС), лучевую терапию и гормонотерапию по показаниям. Исследуемая группа 1 получала лечение по аналогичной схеме, только режим ХТ (АС) сочетался с арглабином (арглабин 370 мг/м² № 7 дней). Исследуемая группа 2 получала лечение по аналогичной схеме, но в неоадьювантном и адьювантном режиме применяли монотерапию арглабином. Эффективность комбинированного лечения оценивали по стандартным критериям ВОЗ (1978).

Результаты. Частичный ответ опухоли: в группе больных, получавших ПХТ по схеме АС – у 63,6±14,5 %, в группе больных, получавших АС с арглабином – у 80,0±17,9 % пациентов, в группе с монотерапией арглабином – у 25,0±21,7 % ($p \geq 0,05$). Частичный ответ подмышечных лимфатических узлов: в группе больных, получавших ПХТ по схеме АС – у 30,0±14,5 %, в группе больных, получавших АС с арглабином – у 60,0±21,9 % пациентов, в группе с монотерапией арглабином – у 50,0±25,0 % ($p \geq 0,05$). Степень регрессии опухоли составила после ХТ по схеме АС 81,7 %, после АС+арглабин – 57,4 %, после монотерапии арглабином – 21,4 %. Степень регрессии подмышечных лимфатических узлов у больных после неоадьювантной терапии по схеме АС составила 14,3 %, после АС+арглабин – 97,5 %, после монотерапии арглабином – 61,7 %. В контрольной группе третья часть больных имела лекарственный патоморфоз опухоли 3 и 4 степени, после неоадьювантной ХТ АС+арглабин – 50 %.

Выводы. Наблюдается общая положительная динамика регрессии опухоли и лимфатических узлов после неоадьювантной ПХТ АС при ее комбинации с арглабином у больных МРРМЖ.

Е.Н. Калинин

**АНАЛОГИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДОВ –
СОВРЕМЕННЫЕ АНТИНЕОПЛАСТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА**

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск

Основываясь на химических и химико-энзиматических методах синтеза, разработаны инновационные технологии получения большого ряда новых соединений, а также известных, но ранее малодоступных модифицированных нуклеозидов. Среди них препараты для лечения онкогематологических заболеваний: цитарабин, кладрибин, флударабин, клофарабин и ряд других.

Осуществлен синтез 5-азацитидина, децитабина и новых аналогов, содержащих атом фтора при C-2'/C-3'-положениях углеводного фрагмента; изучена их стабильность в водных растворах при различных значениях pH. Показано, что 2'-F-ара-5-азацитидин гидролизуетсЯ значительно медленнее, чем изомерный 3'-фтордезоксисаналог. Представлены результаты по изучению антилейкемической активности фтордезоксисаналогов 5-азацитидина на культурах четырех линий миелобластной лейкемии и трех линий клеток солидных опухолей человека. Установлено, что 2'-F-ара-5-азацитидин проявляет более высокий цитотоксический эффект в культуре клеток острой моноцитарной лейкемии THP-1, острой промиелоцитарной лейкемии HL-60 и острой миелогенной лейкемии KG-1 по сравнению с 5-азацитидином.

Высокоэффективная технология получения фармсустанции и лекарственного средства пеметрексед, являющегося структурным аналогом фолиевой кислоты, разработана в рамках программы «Импортзамещающая фармсустанция».

Наиболее успешным примером применения таргетных препаратов и одной из самых значимых медицинских инноваций последнего десятилетия считают использование иматиниб мезилата (Гливек) для лечения ряда онкологических и онкогематологических заболеваний. Разработаны оригинальные химические методы синтеза иматиниб мезилата и бортезомиба. Бортезомиб является первым представителем нового класса препаратов, которые уничтожают раковые клетки, ингибируя активность протеасомы 26S.

В Институте биоорганической химии НАН Беларуси создан научно-производственный центр «Хим-ФармСинтез», который обладает уникальными производственными мощностями, позволяющими осуществлять полную технологическую цепочку: от лабораторных разработок молекул до производства и коммерциализации готовых препаратов взамен дорогостоящих импортных аналогов.

*А.В. Калугин¹, С.В. Шумилова¹, Е.Ю. Конторщикова²,
Д.В. Новиков¹, А.А. Щербинина¹, М.А. Шаров¹, В.В. Новиков¹*

СРАВНЕНИЕ ЧАСТОТ ОБНАРУЖЕНИЯ МРНК РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ И ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫХ АНТИГЕНОВ В ОПУХОЛЕВЫХ ОЧАГАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ТЕЛА МАТКИ

¹Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

²Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко, Нижний Новгород

Актуальность. Способность к неограниченному росту и миграции – это признаки злокачественной клетки. IL2Ra (CD25) и ICAM-1 (CD54) являются важными посредниками в пролиферации и адгезии клеток. Известно, что в реализации этих процессов могут участвовать раково-тестикулярные (СТ) гены.

Задача исследования. Сравнить частоты встречаемости мРНК СТ генов (MAGEA(1-6), SSX1,2,4, XAGE1, GAGE1-8, MAGEC1, PAGE1, NY-ESO1), мРНК CD54 и мРНК CD25 в опухолевых очагах рака тела матки.

Материалы и методы. С помощью ОТ-ПЦР исследовали 15 образцов опухолевых очагов рака тела матки на присутствие мРНК раково-тестикулярных и дифференцировочных антигенов.

Результаты. Матричная РНК mCD54 была обнаружена в 4 образцах, мРНК sCD54 – в 2 образцах, мРНК fullCD25 – в 14 образцах, мРНК CD25Exo4Del – в 12 образцах, а мРНК CD25Exo4,5Del – в 8 образцах. Суммарная частота обнаружения мРНК MAGEA(1-6), MAGEC1, GAGE1-8, XAGE1, PAGE1, NY-ESO1 и SSX1,2,4 составила 73,3% (11 из 15 образцов). Матричная РНК MAGEA(1-6) детектировалась в 9 образцах опухолевых очагов, мРНК SSX1,2,4 – в 3 образцах, мРНК XAGE1 – в 2 образцах, мРНК MAGEC1 и GAGE1-8 – в 1 образце. Матричные РНК NY-ESO1 и PAGE1 обнаружены не были. Следует отметить, что один из двух sCD54-позитивных опухолевых очагов не содержал мРНК СТ генов, а второй опухолевый очаг – содержал только мРНК MAGEA(1-6).

Выводы. Таким образом, в опухолевых очагах больных раком тела матки продемонстрирована гетерогенность экспрессии мРНК раково-тестикулярных и дифференцировочных антигенов.

Работа выполнена в рамках базовой части государственного задания №2014/134 Минобрнауки России (проект 2575).

*О.Л. Канделинская¹, Е.Р. Грищенко¹, Н.А. Шуканова²,
М.М. Молчан³, Т.В. Шман³, Е.П. Вашкевич³, Н.А. Козловская⁴, Е.В. Шаповал⁴, В.И. Разлуцкий⁵*

ВОДНЫЕ РАСТЕНИЯ: ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ОНКОЛОГИИ

¹Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск

²Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск

³Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск

⁴РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова, Минск

⁵НПЦ НАН Беларуси по биоресурсам, Минск

Актуальность. Водные растения являются ценным источником физиологически активных веществ – эфирных масел, антоцианов, флавоноидов и др., среди которых лектины изучены менее других.

Задачи исследования. Идентификация в составе водных растений Беларуси фитолектинов (ФЛ), оказывающих иммуномодулирующее действие и регулирующих пролиферацию злокачественно трансформированных клеток.

Материалы и методы. Объектами исследования служили вегетативные органы водных растений 15 семейств. Выделение и идентификацию ФЛ проводили по общепринятым методам. Углеводную специфичность ФЛ определяли по ингибированию гаптенами реакции агглютинации эритроцитов кролика. Антипролиферативное действие ФЛ оценивали по их влиянию на активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) клеток рака молочной железы человека (РМЖ) в первичной культуре. Иммуномодулирующее действие ФЛ оценивали по индуцированной ими активации ЕК- и Т-клеток человека с использованием метода проточной цитофлуориметрии по экспрессии маркера CD69 на поверхности этих клеток.

Результаты. На примере маннозоспецифичного лектина из корневищ аира обыкновенного – *Asogus salamus* L. (АСА-*Asogus salamus agglutinin*) показано, что АСА оказывал ингибирующее действие разной степени на активность АХЭ в клетках РМЖ в зависимости от их молекулярно-генетического подтипа: в клетках люминального Б подтипа – на 80 %, Нег+ подтипа – на 31 %, базальноподобного подтипа – на 64 %. Наблюдаемый эффект был сопоставим с действием применяемых в клинике цитостатиков. В отличие от последних, АСА вызывал умеренную активацию ЕК-клеток, и, в меньшей степени, Т-клеток человека.

Выводы. Обсуждается возможность использования ФЛ водных растений в качестве регуляторов клеточной пролиферации злокачественно трансформированных клеток и для идентификации особенностей строения их рецепторного аппарата.

В.Н. Капинус, М.А. Каплан, Е.В. Ярославцева-Исаева, И.С. Спиченкова, Е.В. Горанская

ИНТЕРСТИЦИАЛЬНАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ГОЛОВЫ И ШЕИ

ФГБУ Медицинский радиологический научный центр МЗ РФ, Обнинск

Актуальность. При использовании традиционных методов лечения опухолей кожи лица и шеи высок риск развития анатомо-функциональных нарушений в данной области, поэтому расширение возможностей малоинвазивных методов с дополнительным внутритканевым воздействием позволит улучшить результаты лечения и реабилитации больных, особенно при наличии экзофитного компонента новообразования и при более выраженной опухолевой инфильтрации подлежащих тканей.

Цель исследования. Разработка методики и оценка эффективности интерстициальной фотодинамической терапии (ФДТ) с фотосенсибилизатором «Фотолон» у больных базальноклеточным раком кожи (БКРК) головы и шеи.

Материалы и методы. Лечение было проведено 55 больным БКРК в возрасте от 55 до 88 лет, имеющих так называемую «неудобную» локализацию рака кожи лицевой области (угол глаза, параорбитальная область, крыло носа, носогубные складки, ушная раковина), что представляет трудности не только для хирургического и/или лучевого лечения, но и для проведения ФДТ (формирование полей облучения, равномерное распределение лазерного излучения). Экзофитный тип роста отмечался у 25 (45,6 %) пациента, а инфильтрация подлежащих тканей – у 30 (54,6 %) больных. У 23 (41,8 %) пациентов был впервые диагностирован рак кожи, у 32 (58,2 %) пациентов имели место рецидивы заболевания. Для проведения ФДТ использовался ФС «Фотолон» в дозе 1,0–2,0 мг/кг, лазерный аппарат «Латус-2» (662 нм). На 1 этапе всем больным была проведена интерстициальная ФДТ с использованием световодов с гибким цилиндрическим диффузором длиной 1,0 и 2,0 см (ООО «Полироник», Москва) с диаметром световода 600 мкм, диаметр диффузора 900 мкм. Количество позиций диффузоров – 1–2, выходная мощность 200–400 мВт, время воздействия составляло от 15 до 25 минут. На 2 этапе проводилась ФДТ с дистанционным подведением лазерного света в дозах 50–300 Дж/см² при плотности мощности 300–400 мВт/см² по полипозиционной методике.

Результаты. Полная регрессия опухолевых очагов была зарегистрирована у 41 из 55 больных (74,5 %), частичная регрессия – у 14 (25,5 %) пациентов. На сроках наблюдения от 6 месяцев до 3 лет у 14 (25,5 %) из 55 пациентов были диагностированы рецидивы заболевания.

Выводы. Методика последовательного внутритканевого и дистанционного видов воздействия расширяет возможности оказания консервативного органосохраняющего лечения БКРК, локализованного на коже областей со сложным анатомическим рельефом и наличием жизненно важных органов. После интерстициальной ФДТ новообразований параорбитальной области у пациентов не пострадала функция зрения (не изменились цветоощущение и острота зрения), сохранились веки, ресницы, размеры глазной щели и функции этих органов, после ФДТ рака носа, ушных раковин в некоторых случаях развивалась минимальная деформация хрящевых структур.

М.А. Каплан, В.Н. Капинус, Н.П. Ткаченко, И.А. Замулаева, С. А. Макаренко

СИСТЕМНАЯ ВНУТРИВЕННАЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ «ФОТОДИТАЗИН» У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ III–IV СТАДИИ

ФГБУ Медицинский радиологический научный центр МЗ РФ, Обнинск

Актуальность. Одним из возможных механизмов системной ФДТ является уменьшение количества циркулирующих в крови опухолевых клеток, что важно для предотвращения отдаленного метастазирования и улучшения прогноза заболевания.

Цель исследования. Разработка и изучение эффективности методики внутривенной системной ФДТ с ФС «Фотодитазин».

Материалы и методы. Клиническое исследование с использованием ФС «Фотодитазин» было проведено у 12 пациентов. В число больных вошли 3 (25,0 %) мужчин и 9 (75,0 %) женщин в возрасте от 37 до 72 лет. У 6 пациентов была диагностирована меланома кожи, у 2 пациенток рак молочной железы, у 3 – рак яичников и у 1 больной рак шейки матки. ФС «Фотодитазин» применяли в дозе 1,0–1,9 мг/кг, рассчитанную дозу растворяли в 200 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Сеанс внутривенной системной ФДТ выполняли следующим образом: в кубитальную вену пациента при помощи инфузии вводили раствор препарата «Фотодитазин». Одновременно с введением фотосенсибилизатора проводили лазерное облучение крови при помощи световода, вводимого в кубитальную вену другой руки. Сеанс ФДТ выполняли на аппарате «Латус 0,4» (662 нм), параметры облучения: мощность излучения – 20 мВт, время облучения 60–90 минут. Количество сеансов ФДТ составляло 1–3 с интервалом 3–5 дней. Информативным показателем эффективности различных методов противоопухолевой терапии является количество циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК). Идентификацию ЦОК проводили с помощью проточной цитометрии по иммунофенотипу $\text{Er-CAM}(\text{CD326})^+\text{CD45}^+$. Апоптотическую гибель ЦОК выявляли по критерию целостности плазматической мембраны и транслокации фосфатидилсерина на внешнюю поверхность мембраны.

Результаты. Частота ЦОК определялась у всех пациентов до лечения и после сеанса ФДТ в динамике: через 6 часов, 1, 3, 7 суток. У 2/3 группы наблюдаемых пациентов в течение первых 3 суток после ФДТ отмечалось постепенное уменьшение частоты ЦОК в среднем на 30 % от исходной величины и сохранение этого показателя на стабильном уровне в течение всего периода наблюдения (7 суток).

Выводы. Полученные результаты позволяют сделать вывод о реализации эффектов системной ФДТ за счет уменьшения ЦОК. Применение внутривенной ФДТ позволит улучшить результаты лечения и качество жизни больных злокачественными новообразованиями, в том числе III–IV стадии.

Т.А. Карпенко, А.И. Бураковский, А.А. Ястребова, М.Н. Тишкевич

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск

Актуальность. На сегодняшний день эпидермальный фактор роста (ЭФР) признан одним из перспективных прогностических и диагностических маркеров онкозаболеваний, ассоциированных с гиперэкспрессией ЭФР и его рецепторов. Ранняя диагностика и знание механизмов развития онкозаболеваний являются основополагающими факторами своевременной организации лечебно-профилактических мероприятий.

Цель исследования. Создание новых высокочувствительных и информативных методов количественной оценки уровня ЭФР.

Материалы и методы. Для этих целей нами был выбран формат непрямого твердофазного иммуноферментного анализа («сэндвич»-вариант), сочетающий в себе высокую чувствительность, специфичность, а так же доступность и простоту исполнения. Разработанный новый метод иммуноферментного анализа ЭФР обладает высоким уровнем чувствительности (7,7 пг/мл); широким диапазоном определяемых концентраций (0–500 пг/мл); время проведения анализа составляет 4,5 ч.

Результаты и выводы. Апробация разработанного лабораторного варианта иммуноферментного анализа ЭФР была проведена на модельных образцах (с известной концентрацией ЭФР) и на клиническом материале при онкопатологии различного генеза, что доказало возможность использования данного метода для выявления различных концентраций ЭФР в биологическом материале (сыворотке крови). Таким образом, в перспективе разработанный метод может использоваться для ранней диагностики онкологических заболеваний, ассоциированных с гиперэкспрессией ЭФР и его рецепторов, контроля эффективности проводимой терапии, динамического слежения за развитием патологического процесса и прогнозирования течения заболевания. Созданный метод иммуноферментного анализа определения ЭФР может служить основой для разработки аналогичных технологий по выявлению других опухолеассоциированных маркеров, биологически активных соединений, патологических субстанций и т.д.

А.В. Киселев, Г.А. Гордина, И.Ю. Кубасова, О.И. Тарасова, М.В. Гудкова, А.Е. Пастушенко

ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ СОБСТВЕННОСТЬ

РОССИЙСКОГО ОНКОЛОГИЧЕСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА В 2013 ГОДУ

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

В 2013 году в РОНЦ поддерживались 64 патента на изобретения: 10 патентов касались соединений и композиций, обладающих противоопухолевой активностью; 17 – клеточных линий меланомы человека, которые могут быть использованы для создания противоопухолевых вакцин; 14 – способов лечения злокачественных опухолей; 11 – способов ранней диагностики злокачественных опухолей; 4 – способов получения трахеобронхиального биоимпланта и биоинженерной конструкции для замещения костных дефектов.

Из числа поддерживаемых патентов восемь изобретений были признаны перспективными и награждены дипломами Роспатента в номинации «100 лучших изобретений России».

Целесообразность поддержания патентов на изобретения определялась их тематикой и возможным использованием в коммерческих целях в перспективе. Научными сотрудниками патентно-лицензионного отделения совместно с авторами изобретений регулярно проводился анализ патентов для решения вопроса о целесообразности их поддержания.

В 2013 г. было подготовлено и подано в Роспатент девять заявок на объекты интеллектуальной собственности. Из их числа шесть заявок – на изобретения, одна – на полезную модель, одна – на базу данных противоопухолевых отечественных веществ, изученных в РОНЦ, одна – на программу для ЭВМ по прогнозированию клинического течения в раннем послеоперационном периоде у онкологических больных. За этот период получено семь патентов на изобретения и одно свидетельство на базу данных.

Из 144 научных тем признаны охраноспособными 49 (34 %). Из 47 тем диссертаций, запланированных в 2013 году, охраноспособные темы составили 36 %.

В целях стимулирования изобретательской деятельности администрация РОНЦ поощряла авторов изобретений выплатами вознаграждений.

М.В. Князев^{1,2}, В.А. Дуванский^{1,3}

ЭНДОСКОПИЧЕСКАЯ АУТОФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА КОЛОРЕКТАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ

¹Российский университет дружбы народов, Москва

²Поликлиника № 2 Минэкономразвития РФ, Москва

³ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины ФМБА России», Москва

Задачи исследования. Оценить эффективность эндоскопической аутофлуоресценции в диагностике колоректальных неоплазий в зависимости от гистоморфологического строения.

Материалы и методы. Проанализированы результаты аутофлуоресцентного исследования 269 неоплазий, выявленных при колоноскопии в тримодальном режиме у пациентов обоих полов, в возрасте 57±13,6 лет. Использовали эндоскопическую видеосистему Olympus Lucera CV-260, видеоэндоскопы с функциями высокого разрешения HD и оптического увеличения до 115 раз ZOOM, режимами узко спектрального анализа NBI и аутофлуоресценции AFI. Проводили биопсию для гистоморфологического исследования выявленных образований. Эпителиальные неоплазии были разделены на 4 группы, 1 группа – негативные по диспластическим изменениям, 2 группа неопределенная по дисплазии и включала аденоматозно-гиперпластические неоплазии, 3 группа неинвазивные, все типы аденом с дисплазией 1–3 степени, 4 группа включала инвазивные и неинвазивные карциномы. В каждой группе подсчитывались неоплазии окрашенные в пурпурный или зеленый цвет при аутофлуоресценции.

Результаты. В 1 группе (n=50), пурпурная окраска наблюдалась в 19 случаях (относительная частота (ОЧС) 38 %, доверительный интервал (ДИ) 24–52% с вероятностью 95%); во 2 группе (n=39), ОЧС 59 %, ДИ 43–74 %; в 3 группе (n=135), ОЧС 89 %, ДИ 84–91 %; в 4 группе (n=26), ОЧС 89 %, ДИ 76–97 %. Оценена частота выявления пурпурного окрашивания неоплазий с помощью χ^2 критерия Пирсона между каждой группой. Статистически значимые различия наблюдали между 1–2 группами $p<0,05$; между группами 1–3 и 2–3 $p<0,001$; между группами 1–4 и 2–4 $p<0,01$. Различия между группами 3–4 статистически не значимы. Соотношение пурпурного и зеленого свечения в каждой группе составили: в 1 группе – 0,61; во 2 – 1,43; в 3 – 8,43, в 4 – 8,66.

Выводы. Эндоскопическая аутофлуоресцентная диагностика эффективна в выявлении колоректальных неоплазий, и позволяет с вероятностью 95 % можно утверждать, что частота пурпурного аутофлуоресцентного окрашивания неоплазии зависит от гистоморфологической структуры и почти в 8,5 раз чаще наблюдается при неинвазивных аденомах и инвазивных и неинвазивных карциномах толстой кишки.

Ю.В. Коваленко, А.С. Толстокоров, Л.Ф. Жандарова

СОЧЕТАНИЕ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ЗОБОМ ХОШИМОТО

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов

Актуальность. Особые диагностические трудности возникают при сочетании рака щитовидной железы (РЩЖ) с зобом Хошимото, наблюдающимся по данным литературы в 1–38 % случаев.

Цель исследования. Определить диагностический потенциал полипозиционной тонкоигольной пункционно-аспирационной биопсии (ТПАБ) в выявлении РЩЖ в сочетании с зобом Хошимото.

Задачи исследования. Изучить частоту сочетания высокодифференцированного РЩЖ и зоба Хошимото. Определить диагностическую точность цитоморфологической диагностики данной патологии по данным ТПАБ.

Материалы и методы. С 2009 по 2013 гг. по данным заключений ТПАБ были оперированы 332 (21,2 %) пациента. У 94 (6,0 %) пациентов выявлен РЩЖ в сочетании с зобом Хошимото и другой тиреоидной патологией.

Результаты. При гистологическом исследовании дифференцированный РЩЖ выявлен у 94 (28,3 %) больных, где в 92 (97,9 %) случаях – папиллярная форма рака и в 2 (2,1%) – фолликулярная форма рака. Больные были разделены на 2 группы. У 27 больных первой группы результаты ТПАБ: подозрение на папиллярный РЩЖ на фоне тиреоидита – 11 (40,7 %); папиллярный РЩЖ – 2 (7,4 %); папиллярный РЩЖ с очаговой лимфоидной инфильтрацией – 1 (3,7 %); очаг лимфоцитарного тиреоидита – 1 (3,7 %); узловой зоб на фоне тиреоидита – 1 (3,7 %). Полное соответствие результатов ТПАБ и окончательного гистологического диагноза, подтвердилось в 21 (77,8 %) случае. У 65 больных второй группы: папиллярный РЩЖ – 23 (35,4 %); подозрение на папиллярный РЩЖ – 21 (32,3 %); рак щитовидной железы – 11 (16,9 %); подозрение на папиллярный РЩЖ на фоне тиреоидита – 3 (4,6 %); папиллярный РЩЖ на фоне тиреоидита – 2 (3,1 %); узловой аденоматозный зоб – 2 (3,1 %); трудно дифференцировать между аденомой и РЩЖ – 1 (1,5 %); подозрение на Гюртле клеточную неоплазию на фоне тиреоидита – 1 (1,5 %); узловой зоб – 1 (1,5 %). Диагностическая точность ТПАБ составила 92,6 % случаев.

Выводы. Среди выявленного высокодифференцированного РЩЖ его сочетание с зобом Хошимото составило 21,2 % с преимущественным преобладанием папиллярной формы. Определена высокая диагностическая точность ТПАБ в отношении папиллярного рака как в сочетании с зобом Хошимото 92,6 % случаев. Соответствие цитологического и гистологического диагнозов при выявлении папиллярного рака щитовидной железы в сочетании с зобом Хошимото определено лишь в 77,8 % случаев.

С.В. Козлов, О.И. Каганов, М.В. Ткачев, Д.С. Швеи, А.М. Козлов

РАДИОЧАСТОТНАЯ ТЕРМОАБЛАЦИЯ ПРИ ЦИТОРЕДУКТИВНОМ ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ IV СТАДИЕЙ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет», Самара

ГБУЗ «Самарский областной клинический онкологический диспансер», Самара

Цель исследования. Оценка результатов применения РЧА метастазов КРР печени при циторедуктивных операциях (ЦО).

Материалы и методы. С целью проведения анализа результатов РЧА колоректальных метастазов печени при паллиативных операциях нами проведено исследование двух групп больных: 54 пациента с РЧА метастатических очагов составили основную группу, в контрольную группу вошел 61 больной с атипичной резекцией. Средний возраст в основной и контрольной группах составил 55.47 ± 6.71 и 57.39 ± 4.99 лет ($t=1.71$, $p=0.089$) соответственно. Общее число метастазов, удаленных при атипичной резекции составило – 177. РЧА – 194. Количество метастатических новообразований в основной группе было от 2 до 6, среднее их число составило – 3.09 ± 0.76 , в контрольной – от 1 до 4, среднее число – 2.88 ± 0.89 ($p=0.24$).

Результаты. Проведенный анализ годовых отчетов хирургических отделений ГБУЗ СОКОД с 2001 года по 2008 годы показал, что общее число ЦО при КРР 4 стадии в данный период значимо не менялось и составило 54.37 ± 7.71 операции в год. В основной группе послеоперационные осложнения наблюдались у 7 (13 %), в контрольной – у 18 (29.5 %) пациентов ($p=0.04$). Осложнения, связанные с операцией на печени после РЧА были диагностированы – у 2 (28.6 %), а после атипичной резекции – у 10 (55.5 %) пациентов. Пятилетняя бессобытийная выживаемость в основной группе была выше, чем в контрольной, их значения составили 13.1 % и 6.0 % соответственно, медианы бессобытийной выживаемости составили 24 и 15 месяцев соответственно ($p=0.04$). Показатели пятилетняя общей выживаемости в основной и контрольной группах составили 26,4 % и 12,7 % соответственно ($p=0.07$).

Выводы. Таким образом, применение РЧА в лечении единичных билобарных метастазов в печени позволило значимо увеличить число ЦО R0, выполняемых при лечении КРР 4 стадии, снизить объем интраоперационной кровопотери и риск развития послеоперационных осложнений.

С.В. Козлов, О.И. Каганов, М.В. Ткачев, Д.С. Швеи, А.М. Козлов

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ГНОЙНЫХ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет», Самара

ГБУЗ «Самарский областной клинический онкологический диспансер», Самара

Цель исследования. Выявить значимые прогностические критерии развития гнойных послеоперационных осложнений (ГПО) у больных колоректальным раком (КРР).

Материалы и методы. В исследование были включены 278 больных КРР, которым были выполнены радикальные или циторедуктивные хирургические вмешательства. К первой группе были отнесены: пол, возраст, наличие тяжелой сопутствующей патологии, индекс массы тела, локализация опухоли, стадия основного заболевания, длительность догоспитального периода, характер ранее перенесенного специального лечения, наличие осложненного рака толстой кишки, наличие анемии, степень анестезиологического риска по ASA. Ко второй группе предикторов ГПО были отнесены: характер оперативного вмешательства, вариант восстановления кишечной непрерывности, стаж работы хирурга (<5 лет, >5 лет), длительность операции (<3 часов, >3 часов), объем кровопотери (<1 литра, >1 литра), интраоперационная контаминация брюшной полости. В нашем исследовании мы предлагаем интегральный прогностический критерий, учитывающий субъективную интегральную оценку оперирующим хирургом предоперационных факторов риска (общее состояние больного, запущенность основного заболевания, тяжесть сопутствующей патологии, объем планируемой операции: 1 балл – хороший, 2 балла – удовлетворительный, 3 балла – плохой прогноз), а также таких интраоперационных критериев, как продолжительность операции (более 3 часов $\pm$ 1 балл) и интраоперационная контаминация раны $+1$ балл.

Результаты. ГПО осложнения были диагностированы у 48 пациентов (17,2 %). Частота ГПО при локализации опухоли в прямой кишке составила 22,2 %, в правой половине ободочной кишки – 3 %, в левой половине – 11,1 % ($p<0,05$). Частота ГПО у пациентов с 3–4 (34 %) стадией КРР 24,2 %, аналогичный показатель у пациентов с 1–2 стадией заболевания составил 13,6 % ($p<0,05$). В случае, когда интегральный прогностический критерий (ИПК) составлял 1–2 балла, частота развития ГПО составила не более 10 %. В тех случаях, когда ИПК составлял 4–5 баллов, частота развития ГПО достигала 28–50 %.

Выводы. Локализация опухоли в прямой кишке, стадия заболевания являются значимыми прогностическими критериями развития ГПО. Предлагаемый интегральный прогностический критерий может быть использован для определения риска развития гнойных послеоперационных осложнений у больных КРР.

С.В. Козлов, О.И. Каганов, М.В. Ткачев, Д.С. Швеи, А.М. Козлов

ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫЙ ПЕРИОД ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ РАДИОЧАСТОТНОЙ ТЕРМОАБЛАЦИИ

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет», Самара

ГБУЗ «Самарский областной клинический онкологический диспансер», Самара

Цель исследования. Оценить результаты применения озонотерапии в послеоперационном периоде с целью профилактики и лечения «постабляционного» синдрома у больных с метастазами колоректального рака (КРР) в печени.

Материалы и методы. В 2005-2008 гг. на базе ГБУЗ Самарского областного клинического онкологического диспансера 98 больным было выполнено чрескожная радиочастотная термоабляция (РЧА) метастазов КРР в печени под контролем УЗИ. В послеоперационном периоде 58 пациентам, которые вошли в основную группу исследования, с целью профилактики и лечения «постабляционного» синдрома был применен метод озонотерапии. Пациентам контрольной группы (n=40) в послеоперационном периоде проводилась инфузионная, антибактериальная, обезболивающая терапия. Пациентам основной группы с первых суток после операции проводился метод озонотерапии крови в количестве 5 сеансов.

Результаты. «Постабляционный» синдром в основной группе возник у 8 (15 %), в контрольной – у 29 (73 %) больных (p=0.000). Было выявлено, что применение метода озонотерапии позволяет снизить абсолютный риск возникновения «постабляционного» синдрома на 57.4 % при отношении шансов 0.067. У пациентов контрольной группы в послеоперационном периоде на 2 сутки отмечалось повышение температуры до 37.96 ± 0.52 °C, продолжающееся в течение 4–5 суток, в основной группе температура повышалась лишь до субфебрильных цифр 37.30 ± 0.25 °C в течение двух первых дней после операции. Оценку интенсивности болевого синдрома проводили с помощью визуально-аналоговой шкалы (ВАШ). В контрольной группе максимальные болевые ощущения были на 1 сутки и достигли 7.20 ± 1.13 баллов, данный синдром сохранялся на уровне 6 баллов со 2 по 4 сутки. В основной группе максимальные значения ВАШ отмечались также на 1 сутки и составили 7.37 ± 1.07 балла с прогрессивным снижением показателей в течение 5 дней. Сравнительный дисперсионный анализ с повторными измерениями в основной и контрольной группах показал значимую разницу значений ВАШ в контрольные сроки исследования (F=9.79 p=0.000).

Выводы. Таким образом, применение метода озонотерапии в послеоперационном периоде у больных с РЧА метастазов в печени позволило провести не только профилактику возникновения «постабляционного» синдрома, но и нормализовать у больных клиническую картину в более ранние сроки.

С.В. Козлов, О.И. Каганов, М.В. Ткачев, Д.С. Швеи, А.М. Козлов

РЕЗУЛЬТАТЫ ПАЛЛИАТИВНЫХ ОПЕРАЦИЙ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет», Самара

ГБУЗ «Самарский областной клинический онкологический диспансер», Самара

Актуальность. За последние десятилетия произошли качественные изменения в подходе к лечению больных колоректальным раком. Это стало возможным благодаря достижениям современной медицины – улучшению качества диагностики и внедрению современных методов лечения. Широкие возможности применения методов лучевой терапии, химиотерапии, а в последние годы появления лекарственных препаратов для таргетной терапии, обуславливают стремления онкологов к максимальному удалению опухолевой массы путем выполнения паллиативных операций.

Цель исследования. Изучение непосредственных результатов паллиативных операций у больных при колоректальном раке.

Материалы и методы. С 2009 по 2012 гг. в отделении абдоминальной онкологии Самарского областного клинического онкологического диспансера выполнены 741 операции по поводу колоректального рака. Из них 43 носили паллиативный характер: гемиколэктомия справа – 20, гемиколэктомия слева – 17, резекция сигмовидной кишки – 4, передняя резекция прямой кишки – 2. У 2 больных дополнительно проводилась радиочастотная абляция метастазов печени, 2 больным выполнялись симультанные операции, дополненные с резекциями печени. Также имеется группа больных, которым резекции печени по поводу метастазов выполнялись отсрочено. Таким образом, за последние годы удельный вес паллиативных операций вырос с 1,6 % до 2,3 %.

Результаты. В послеоперационном периоде осложнения возникли у 5 больных (11,6 %): гнойные осложнения – 1, несостоятельность анастомоза – 1, тромбоз легочной артерии – 1, острое нарушение мозгового кровообращения – 1, перфорация язвы желудка – 1. Умерло 3 больных, причина смерти: тромбоз легочной артерии – 1, перфорация хронической язвы желудка – 1, острое нарушение мозгового кровообращения – 1. послеоперационная летальность составила 4,6 %.

Выводы. Таким образом, низкий уровень послеоперационных осложнений и летальности после паллиативных операций свидетельствует о возможности и целесообразности их выполнения у больных с метастатическим колоректальным раком.

С.В. Козлов, О.И. Каганов, М.В. Ткачев, Д.С. Швеи, А.М. Козлов

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РИСКА РАЗВИТИЯ ПРОГРЕССИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОСЛЕ ВЫПОЛНЕНИЯ РАДИОЧАСТОТНОЙ ТЕРМОАБЛАЦИИ МЕТАСТАЗОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет», Самара

ГБУЗ «Самарский областной клинический онкологический диспансер», Самара

Цель исследования. Внедрение в клиническую практику метода прогнозирования на дооперационном этапе риска развития прогрессии заболевания после выполнения радиочастотной термоабляции (РЧА) метастазов колоректального рака (КРР) в печени.

Материалы и методы. Проведено исследование результатов комбинированного лечения с применением чрескожной РЧА у 93 больных с единичными и множественными биллобарными метастазами КРР в печени, выявленными в различные сроки диспансерного наблюдения после удаления первичной опухоли. Проводился многофакторный анализ, изучающий влияние различных предикторов на риск развития рецидива и появления новых метастазов после проведения РЧА.

Результаты. На основании проведенного исследования была создана математическая модель $P=1/1+2,71^z$, где p – вероятность того, что произойдет интересующее событие; 2,71 – основание натуральных логарифмов; z – формула множественной линейной регрессии: $Z=4,68 \cdot X_1+0,02 \cdot X_2+0,03 \cdot X_3-4,68 \cdot X_4-12,03$. В настоящем исследовании математическую модель строили в модуле логистической регрессии по алгоритму Вальда, с пошаговым исключением в программе SPSS. При использовании этого метода первоначально брались в расчет все 11 предикторов, после чего они ранжировались и пошагово исключались в соответствии с их вкладом в модель. В результате была получена модель, включающая в себя 4 наиболее значимых предиктора (X_1 – X_4): X_1 – число выявленных метастазов; X_2 – значение СЕА до операции в нг/мл; X_3 – значение СА19-9 до операции в Ед/мл; X_4 – число метастазов размером от 2 до 3 см. Далее приведена классификационная таблица, рассчитанная на основании вышеуказанной модели. Проведено сравнение результатов у 93 больных, полученных при выполнении КТ брюшной полости с целью выявления рецидива и прогрессии метастатического процесса (наблюдаемые результаты) и предсказанных результатов, полученных при помощи математической модели. Была просчитана чувствительность 95,5 %, специфичность 100 % и точность 96,8 % данной математической модели.

Выводы. Применение математической модели позволяет выбрать наиболее эффективный алгоритм обследования больных после выполнения малоинвазивного лечения, что позволяет своевременно выявлять дальнейшую прогрессию заболевания.

С.В. Козлов, О.И. Каганов, М.В. Ткачев, Д.С. Швеи, А.М. Козлов

ПРИМЕНЕНИЕ РАДИОЧАСТОТНОЙ ТЕРМОАБЛАЦИИ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ЛЕЧЕНИИ БИЛОБАРНЫХ МЕТАСТАЗОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА В ПЕЧЕНИ

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет», Самара

ГБУЗ «Самарский областной клинический онкологический диспансер», Самара

Цель исследования. Изучить результаты и обосновать применение радиочастотной термоабляции (РЧА) в комбинированном лечении больных с метастазами колоректального рака (КРР) в печени.

Материалы и методы. В программу исследования вошли 178 больных с биллобарными единичными и множественными метастазами КРР в печени, выявленными после радикального хирургического лечения опухоли толстой кишки. В основную группу ($n=93$) вошли больные, которые получали комбинированное лечение: химиотерапия и РЧА. Больным контрольной группы ($n=85$) проводилась только химиотерапия без хирургического воздействия на метастатические очаги. Сравнительный анализ результатов лечения проводился: в основной ($n=39$) и контрольной ($n=33$) группах с единичными метастазами, а также в основной ($n=54$) и контрольных ($n=52$) группах с множественными метастазами.

Результаты. У больных в основной группе с единичными метастазами КРР в печени была достигнута трехлетняя безрецидивная выживаемость, которая составила 3,5 %, медиана безрецидивной выживаемости достигла 15 месяцев. В контрольной группе с единичными метастазами были получены только двухлетние показатели – 6,9 %, медиана выживаемости составила 9 месяцев. Общая пятилетняя выживаемость в основной группе с единичными метастазами – 4,3 %, медиана общей выживаемости достигла 28 месяцев, тогда как в контрольной группе была получена лишь трехлетняя выживаемость – 9,9 % с медианой выживаемости 15 месяцев. В основной группе больных с множественными биллобарными метастазами КРР в печени проведение РЧА позволило достичь двухлетней безрецидивной выживаемости – 3,4 % с медианой безрецидивной выживаемости 9 месяцев, в то время как в контрольной группе с множественными метастазами аналогичный показатель равнялся нулю, медиана выживаемости достигла 6 месяцев. Применение РЧА в основной группе с множественными метастазами позволило достичь показателя общей четырехлетней выживаемости – 1,8 %, медиана выживаемости – 18 месяцев, тогда как в контрольной группе была получена лишь трехлетняя выживаемость – 2,1 %, медиана выживаемости – 11 месяцев.

Вывод. Применение метода РЧА в комбинации с химиотерапией при лечении единичных и множественных биллобарных метастазов КРР, позволяет значительно улучшить показатели безрецидивной и общей выживаемости.

Н.В. Комлева, М.А. Лапина, Г.В. Костюк, А.В. Иванов, И.И. Пархоменко, В.Д. Сень, А.А. Терентьев

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО НАКОПЛЕНИЯ АМИНОНИТРОКСИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ПЛАТИНЫ (IV)

Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Московская область

Актуальность. Использование комплексов платины в химиотерапии ограничено серьезными побочными эффектами, высокой токсичностью и быстрым развитием резистентности опухолей к препаратам. В связи с этим продолжается поиск новых комплексов платины с повышенной терапевтической эффективностью. Нами синтезирован и исследован ряд аминонитроксильных комплексов платины (IV) общей структуры $Pt(IV)(NH_3)(R\cdot NH_2)Cl_2X_2$, где $R\cdot NH_2$ – нитроксильный радикал, а X – аксиальные лиганды (остатки алифатических карбоновых кислот – уксусной, масляной, валериановой, капроновой и каприловой). В качестве препаратов сравнения исследовались цисплатин и сатраплатин.

Цель исследования. Изучить взаимосвязь физико-химических (липофильность, внутриклеточное накопление) и биологических (цитотоксичность) свойств комплексов платины (IV).

Материалы и методы. Эксперименты проводились на клеточной культуре HeLa. Определение цитотоксичности комплексов платины и зависимости их цитотоксичности от времени экспозиции проводилось с помощью МТТ-теста. Липофильность соединений ($\log P_{ow}$) определяли по распределению в системе 1-октанол-вода. Эффективность внутриклеточного накопления платины определяли атомно-абсорбционным анализом.

Результаты и выводы. Обнаружено, что цитотоксичность комплексов платины (IV) снижается при внесении в их структуру нитроксильного радикала. Удлинение аксиальных лигандов приводит к значительному усилению цитотоксических свойств аминонитроксильных комплексов платины (IV). В ряду аминонитроксильных комплексов платины (IV) наблюдается корреляция между цитотоксичностью, липофильностью и эффективностью внутриклеточного накопления. При временной экспозиции скорость развития цитотоксичности для цисплатина выше, чем для комплексов платины (IV). Медленное развитие цитотоксичности комплексов платины (IV) определяется, вероятно, относительно медленной биотрансформацией до соответствующих комплексов платины (II) и, возможно, диффузией низкоактивных комплексов платины (IV) из клетки.

О.М. Конопацкова¹, И.Н. Павлова²

РЕЗУЛЬТАТЫ ИММУНОКОРРЕКЦИИ БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

¹ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского МЗ России, Саратов

²НУЗ ДКБ на ст. Саратов II ОАО РЖД, Саратов

Задачи исследования. Изучить действие Галавита на иммунокомпетентные клетки различной функциональной активности в периферической крови больных меланомой. У всех больных до и после лечения контролировали состояние естественной защиты.

Материалы и методы. Всего пролечен 41 пациент в возрасте от 32 до 56 лет. У всех диагноз верифицирован морфологически. Меланома чаще располагалась на туловище (51 %). К началу лечения метастатическая стадия констатирована у 8 % пациентов. Галавит вводили по 0,1 в/м № 10. Три инъекции ежедневно, через 72 часа остальные 7 введений.

Результаты. При исследовании иммунологического статуса у 68 % больных было констатировано снижение $CD3^+$ -, $CD4^+$ -клеток. Какой-либо закономерности изменения показателей иммунитета, в зависимости от стадии и степени инвазии, не установлено. Стабильного повышения естественной защиты при введении Галавита не отмечено. Констатировано увеличение количества Т-лимфоцитов и снижение супрессорной активности клеток к концу первого года лечения (по сравнению с исходными данными). Через год лечения у 64% больных наблюдалось улучшение показателей естественной защиты. Изучение отдаленных результатов показало, что живые в течение пяти лет, без признаков прогрессирования 67 % больных. У них показатели $CD3^+$ -клеток были снижены на 15–20 % от нормы, с повышением $CD8^+$ -клеток и незначительной депрессией $CD20^+$ -клеток. К концу первого года лечения у всех больных констатирована тенденция к нормализации показателей. В различные сроки после операции метастазы в регионарные лимфоузлы выявлены у 24 % пациентов. В этой группе исходные показатели иммунитета были значительно снижены, затем улучшились на фоне иммуномодуляции, однако за 2–4 месяца до клинических проявлений значительно повысилось содержание $CD8^+$ -клеток и изменилось содержание $CD20^+$ -клеток в сторону их увеличения. В срок от одного до трех лет умерли 9 % больных. У всех наблюдались нестабильные, разнонаправленные показатели.

Выводы. Можно отметить, что выраженный иммуномодулирующий эффект от применения Галавита способствует длительному безрецидивному течению заболевания, а положительная динамика показателей клеточной защиты (повышение $CD3^+$ -, $CD4^+$ -клеток, и снижение $CD8^+$ -клеток) благоприятно влияет на исход лечения. Галавит целесообразно применять в качестве адъювантной терапии при лечении меланомы кожи.

О.М. Конопацкова¹, Ю.П. Дугин², Ю.И. Орлова², А.Ю. Дугин²

РЕЗУЛЬТАТЫ ВНУТРИПУЗЫРНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

¹ГБОУ ВПО Саратовский медицинский университет им. В.И. Разумовского МЗ РФ, Саратов

²НУЗ Дорожная клиническая больница на станции Саратов П ОАО РЖД, Саратов

Актуальность. Заболеваемость раком мочевого пузыря (РМП) в Саратовской области составила в 2012 г. 13,4 на 100000 населения (по РФ – 9,7). Чаще рак встречается у мужчин (80,3 %) в возрасте 70–74 года. При обследовании установлено преобладание I–II стадий заболевания – 79,1 %. Лечение РМП в этих стадиях, при наличии неинвазивного рака, заключается в трансуретральной резекции пузыря (ТУР РМП) и проведении внутрипузырной химиотерапии (ВПХТ).

Задача исследования. Оценка результатов лечения неинвазивного РМП с применением внутрипузырной химиотерапии после трансуретральной резекции мочевого пузыря.

Материалы и методы. За период 2008–2010 гг. по поводу РМП получили лечение 46 больных. Преобладали мужчины (76 %). Чаще рак встречался в возрасте 65–75 лет (69 %). Для установления диагноза использовали цистоскопию, УЗИ МП и паховых лимфоузлов, МРТ органов малого таза. Гистологически у всех больных был переходноклеточный рак. Степень дифференцировки: G1 у 31 %, G2 – 69 %. Распределение по стадиям: PT1N0M0 – 24 %, PT2aN0M0 – 76 % пациентов. В мочевом пузыре чаще процесс локализовался в нижней демисфере – 87 %. Всем пациентам выполнена ТУР РМП. ВПХТ проводили адриамицином в дозе 50 мг. Интервал – 1 раз в месяц. Общее число введений – 12.

Результаты. Непосредственно в процессе введения все пациенты отмечали резь, болезненность; в течение 2–3 суток – макрогематурию. Все эти симптомы купировались после соответствующей терапии в течение недели. В дальнейшем больных обследовали каждые 3 месяца. Изучена трехлетняя выживаемость. Использованы стандартные методы обследования и иммуномониторинг. В результате наблюдения установлено, что местный рецидив возник у 26 % пациентов. С целью сравнения результатов лечения проведен анализ аналогичной группы пациентов, но без ВПХТ. У них рецидив констатирован в 58 %. Факт рецидива подтвержден гистологически. При анализе иммунограмм пациентов обследуемой группы у всех констатировано умеренное снижение показателей клеточного звена (особенно были снижены параметры CD3⁺ и CD4⁺) иммунитета. Поэтому между курсами проводилась коррекция свечами Галавита (0,1 мг).

Выводы. Применение ВПХТ при неинвазивном РМП позволяет улучшить результаты лечения и, тем самым, достичь оптимальных результатов.

О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова,

Т.В. Абрамова, В.А. Дерябина, А.А. Сергеев, К.А. Сережин, В.М. Бухман

ПРЕДКЛИНИЧЕСКОЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЦИФЕТРЕЛИНА

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

Актуальность. Цифетрелин (ЦФ) – аналог гипоталамического гормона соматостатина, показал высокую противоопухолевую активность в эксперименте при рекомендованной эффективной терапевтической разовой дозе (ЭТД) для мышей – 10 мг/кг пятикратно (суммарная доза 50 мг/кг).

Цель исследования. Предклиническое токсикологическое изучение ЦФ на мелких и крупных лабораторных животных.

Результаты. В результате изучения «острой» токсичности на мышах и крысах ЦФ при введении в максимально возможной концентрации и максимальных объемах каких-либо проявлений токсичности не вызывал. Установлено, что превышение предполагаемой ЭТД препарата у мышей в 12 раз и у крыс в 10 раз не вызвало гибели животных. При изучении «острой» (отсутствие гибели) и «субхронической» токсичности при 15-кратном пероральном ежедневном введении крысам и собакам (отсутствие гибели животных при введении препарата в суммарных дозах – на крысах максимально введенная суммарная доза превышала суммарную эффективную дозу для мышей в 6 раз, для собак в 12 раз соответственно) установлено отсутствие кумулятивных свойств ЦФ. При ежедневном пероральном применении ЦФ крысам и собакам в течение 15 дней во всех исследованных дозах четкой дозовой зависимости не выявлено. Отмечено небольшое снижение количества лейкоцитов, колебания биомаркеров печени (белок, альбумин и АЛТ); очаговые дистрофические и деструктивные изменения в сердце, несильно выраженные очаговые дистрофические изменения в печени, очаговые дистрофические деструктивные и воспалительные изменения в почках, более выраженные у самок. С учетом функциональных и морфологических изменений во внутренних органах как крыс, так и собак изученные дозы ЦФ охарактеризованы как дозы, вызывающие слабые незначительные изменения – низкие токсические дозы (НТД). Лимитирующий вид токсичности не установлен, так как препарат вызывает незначительные морфофункциональные изменения различной степени обратимости практически во всех органах и системах организма крыс и собак. На основании полученных на экспериментальных животных данных о функциональных и морфологических изменениях в органах и тканях показано, что самки более чувствительны к препарату чем самцы.

Выводы. На основании данных по предклиническому токсикологическому изучению ЦФ препарат может быть рекомендован для клинического изучения.

О.И. Коняева, Н. Ю. Кульбачевская, Н.П. Ермакова, В.А. Дерябина, А.А. Сергеев, К.А. Серезин, В.М. Бухман
**ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА
 НА ОСНОВЕ СЕКОИЗОЛАРИЦЕРИЗИНОЛА
 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КЛИМАКТЕРИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ
 И ЭСТРОГЕНЗАВИСИМЫХ ОПУХОЛЕЙ НА МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**
 ФГБУ «РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА» РАМН, МОСКВА

Цель исследования. Изучение «острой» и «субхронической» токсичности лекарственного средства на основе секоизоларицеризинола (кнотолан) в модели лекарственной формы на мелких лабораторных животных с учетом установленной в эксперименте рекомендованной эффективной терапевтической разовой дозы (ЭТД) для мышей – 500 мг/кг десятикратно (суммарная доза 5000 мг/кг).

Материалы и методы. Работа проведена на 145 здоровых мышах гибридах (CBA × C₅₇Bl/6j)F₁ самцах и самках и 317 здоровых неинбредных беспородных крысах самцах и самках. Препарат вводили однократно *per os* в дозах – мышам от 500 до 7500 мг/кг, крысам – от 1250 до 3750 мг/кг. В «субхронической» токсичности препарат вводили 30-кратно *per os* ежедневно в двух дозах в пересчете на крыс: разовая доза (суммарная ЭТД) – 2500 мг/кг (суммарная 75 000 мг/кг) и разовая доза (1/2 суммарной ЭТД) – 1250 мг/кг (суммарная 37 500 мг/кг). Срок наблюдения за животными после введения – 30 суток.

Результаты. На основании анализа данных, полученных в опытах по «острой» (отсутствие гибели животных при максимально возможных концентрациях и максимально возможных объемах (превышение разовой оптимальной эффективной дозы для мышей – 250 мг/кг в 30 раз)) и «субхронической» токсичности при 30-кратном пероральном ежедневном введении кнотолана в модели лекарственной формы крысам (отсутствие гибели животных при введении препарата в суммарных дозах – на крысах максимально введенная суммарная доза превышала суммарную эффективную дозу для мышей (2500 мг/кг) в 30 раз) установлено отсутствие кумулятивных свойств кнотолана. При ежедневном пероральном применении кнотолана в модели лекарственной формы крысам в течение 30 дней установлена дозовая зависимость морфофункциональных изменений в органах и тканях животных. На основании данных по изучению «субхронической» токсичности лекарственного средства на основе секоизоларицеризинола (кнотолан) в модели лекарственной формы на крысах определены органы-мишени: сердечно-сосудистая система, почки и печень. Тем не менее, степень морфофункциональных изменений в указанных органах и системах не являлась дозозимитирующей токсичностью при 30-кратном ежедневном пероральном применении кнотолана в модели лекарственной формы.

Выводы. На основании результатов токсикологического изучения кнотолан рекомендуется для дальнейшего изучения.

Л.И. Короленкова

АНАЛИЗ ПРИЧИН ГИПОДИАГНОСТИКИ ПРЕДРАКА И РАННИХ ФОРМ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ
 ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва

Актуальность. Главной целью цитологического скрининга является не рак шейки матки, а тяжелые цервикальные интраэпителиальные неоплазии – CIN 2–3, включающие и рак *in situ*, когда возможно несложное недорогое органосохраняющее лечение. Однако часто заболевание обнаруживают не только на уровне инвазии, но и запущенным, несмотря на регулярные обследования в анамнезе.

Цель исследования. Раскрытие причин гиподиагностики при CIN 2–3 и микроинвазивном раке.

Материалы и методы. Проведен анализ несовпадений результатов кольпоскопии, цитологических и гистологических исследований 880 больных CIN и микроинвазивным раком шейки матки (МРШМ) и 187 больных с аномальными мазками, на основе базы данных кольпоскопических в системе Leisecap, результатов тестирования на ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) методами ПЦР и гибридного захвата (HC2 тест, Digene/Qiagen) с определением вирусной нагрузки.

Результаты. Практически все случаи CIN2 и все – CIN3/CIS и МРШМ были ассоциированы с ВПЧ ВКР и имели положительный HC2 тест. При сопоставлении данных видеокольпоскопии и морфологии показало, что: 1) часто степень повреждений в мазках ниже степени неоплазии в гистологическом материале; 2) более трети пациенток с тяжелыми CIN, преинвазивным и МРШМ, имеющие HSIL и более в мазках, взятых щетками из эндоцервикса, не имели аномалий в мазках с эктоцервикса, взятых шпателем Эйра; 3) в зависимости от типа зоны трансформации (ЗТ) от 12 до 42 % биопсий, взятых в эктоцервикса, недооценивают тяжесть эпителиальных повреждений и микроинвазию, обнаруженных затем в материале конизации. Выявлены три причины гиподиагностики степени неоплазии и снижения информативности мазков и ограниченных биопсий 1) тип и положение ЗТ: II и III типы с неполной ее видимостью и смещение ЗТ в цервикальный канал с сокрытием там части более «свежих и тяжелых» повреждений; 2) полиморфность неоплазий, отражающая появление в шейке новых, более агрессивных эпителиальных клонов; 3) присутствие неоплазий в эндоцервикальных криптах, иногда без повреждений эктоцервикса.

Выводы. Отрицательный HC2 тест (Digene/Qiagen) предсказывает отсутствие тяжелых CIN и МРШМ. Риск гиподиагностики по ограниченной биопсии возрастает в 1,92 раза при II типе ЗТ, в 5,34 раза при III типе по сравнению с I, достигая 42 %. С увеличением возраста и времени персистенции ВПЧ ВКР тяжесть неоплазий и вовлеченность крипт увеличиваются, а видимая в при кольпоскопии площадь их, также как и информативность мазков и биопсий, взятых с эктоцервикса, уменьшаются.

Л.И. Короленкова

РОЛЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ В ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ (CIN)

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

Актуальность. Персистенция ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) является условием развития цервикальных интраэпителиальных неоплазий (CIN), но возникает лишь у 10 % инфицированных, причем CIN 1 часто регрессирует. Лишь у единиц возникает CIN3, прогрессирующая в 12–50 % случаев до инвазивного рака. Прогрессия CIN всегда поддерживается ВПЧ ВКР со значимой вирусной нагрузкой (ВН). Элиминация, регрессия и торможение прогрессии до CIN следующей степени зависят от состояния местного иммунитета и сопровождаются снижением ВН в зоне трансформации шейки матки (ЗТ), являющейся основной мишенью для ВПЧ ВКР. В то же время при CIN3, неспособной к регрессии, вирусная нагрузка не снижается или прогрессивно растет. Мнения в отношении целесообразности применения иммуномодулирующей терапии у больных CIN расходятся, многие считают ее неоправданной. Иммуномодулятор в комбинированном лечении CIN в дополнение к эксцизии целесообразно применять для уменьшения количества реплицирующегося вируса лишь в случае, если при использовании препарата было зарегистрировано достоверное снижение вирусной нагрузки у большинства больных, которым не свойственно спонтанное снижение ВН.

Цель исследования. Оценка эффективности предэксцизионного иммуномодулирующего лечения аллофероном (аллокином-альфа) по изменению вирусной нагрузки в ЗТ у больных тяжелыми CIN2–3/CIS.

Материалы и методы. В исследование вошли 79 больных CIN2–3/CIS с положительным HC2-тестом (Digene/Qiagen) и ВН более 20 RLU. Из них 51 получала перед эксцизией ЗТ (конизацией) аллокин-альфа (по 1 мг в 1 мл воды для инъекций п/к 1 раз в 48 часов – 6 инъекций), а 28 больных контрольной группы не получали лечения. Через 40–60 дней всем больным перед эксцизией ЗТ повторно определяли ВН.

Результаты. После лечения аллокином-альфа отмечено снижение ВН у большинства больных (40 из 51 – 78,4 % больных), отрицательным тест стал у 9,8 % больных, медиана значений HC2-теста снизилась в 5,2 раза ($p=0,035$). В группе без лечения ВН не снизилась ни у одной больной, у 26 из 28 отмечен ее рост ($p<0,0001$).

Выводы. Лечение аллокином-альфа перед эксцизией приводит к снижению вирусной нагрузки у большинства больных CIN 2–3/CIS и может быть эффективно при CIN 1 и персистенции ВПЧ ВКР в отношении продуктивной ВПЧ-инфекции, поддерживающей прогрессию CIN. Динамика ВН может служить критерием эффективности лечения.

*К.С. Корчагина¹, С.В. Гамаюнов^{1,2}, В.А. Каров², Р.Р. Калугина²,
Е.В. Гребенкина², Н.М. Шахова³, В.М. Терехов²*

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

¹ГБОУ ВПО «НижеГМА Минздрава России», Н.Новгород, gamajnovs@mail.ru

²ГБУЗ Нижегородский областной онкологический диспансер, Н.Новгород

³Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

Задача исследования. Оценить влияние параметров флуоресценции на эффективность фотодинамической терапии.

Материалы и методы. На базе Нижегородского областного онкологического диспансера при проведении фотодинамической терапии рака кожи проведено изучение накопления и выгорания фотосенсибилизатора в опухолевой ткани у 226 пациентов. Параметры флуоресценции оценивались с помощью флуоресцентной визуализирующей системы производства ООО «Аткус».

Результаты. При анализе полученных данных не было получено различий в количестве полных ответов опухоли на лечение в зависимости от накопления препарата и его выгорания после процедуры. В то же время в группе больных с хорошим накоплением фотосенсибилизатора зарегистрировано 4,1 % рецидивов против 9,5 % в группе со слабым и отсутствием накопления препарата ($p=0,044$). Намечилась тенденция к увеличению количества рецидивов при отсутствии выгорания фотосенсибилизатора – 10,4 %, против 4,4 % при полном и частичном выгорании препарата ($p=0,051$). Сочетание хорошего накопления и полного выгорания препарата получено у 62 больных. Количество полных ответов опухоли в этой группе составило 94 %. Отмечено 2 рецидива при сроках наблюдения от 4 до 25 мес.

Выводы. Оценка параметров флуоресценции при проведении фотодинамической терапии позволяет выявить категорию больных, у которых наиболее вероятен рецидив заболевания и которые подлежат интенсивному динамическому наблюдению. Дальнейшие разработки по подбору индивидуальных доз лазерного излучения в зависимости от параметров флуоресценции позволят добиться максимального количества полных ответов и снизить процент рецидивов заболевания.

*В.П. Краснов¹, Д.А. Груздев¹, А.Ю. Вигоров¹, Г.Л. Левит¹,
И.Д. Константинова², Б.З. Елецкая², И.В. Фатеев², В.Н. Чарушин¹*

СИНТЕЗ НОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ КОНЬЮГАТОВ 2-АМИНОПУРИНА С АМИНОКИСЛОТАМИ И ХИРАЛЬНЫМИ АМИНАМИ

¹Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

²Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Актуальность. Гликозилированные производные 2-аминопуринов представляют интерес в качестве потенциальных противовирусных и противоопухолевых соединений. Известно, что трансгликозилирование под действием генно-инженерных пуриинуклеозидфосфорилаз протекает с высокой регио- и стереоселективностью, приводя к β-D-гликозидам.

Задача исследования. Получение новых нуклеозидов рибо-, 2-дезоксирибо- и арабино- рядов на основе производных 2-аминопурина, несущих в положении 6 фрагменты аминокислот или хиральных гетероциклических аминов.

Материалы и методы. Исходя из 2-амино- и 2-ацетиламино- 6-хлорпуринов, синтезирован ряд конъюгатов 2-аминопурина с аминокислотами (глицином, (S)-аланином, (S)-валином, (S)-фенилаланином, (S)-пролином, α-Cbz-(S)-лизином, ε-аминокапроновой кислотой) и оптически чистыми аминами (производными 1,2,3,4-тетрагидрохинолина и 3,4-дигидробензоксазина). Реакции трансгликозилирования полученных конъюгатов проводили под действием пуриинуклеозидфосфорилазы *E. coli* при использовании инозина, тимидина и α-D-арабинозо-1-фосфата в качестве доноров сахаров.

Результаты и выводы. Установлено, что замещенные по положению 6 производные 2-аминопурина являются хорошими акцепторами рибозы, 2-дезоксирибозы и арабинозы в реакции ферментативного трансгликозилирования. Конверсия модифицированных оснований в рибозиды и 2'-дезоксирибозиды составляла 70-100%; арабинозилирование протекало с меньшей конверсией (до 68%). Цитотоксичность синтезированных соединений исследована на линии клеток Jurkat – Т-лимфобластной лейкемии человека.

Впервые проведен химико-ферментативный синтез нуклеозидов на основе производных 2-аминопурина, включающих фрагменты природных аминокислот и хиральных аминов. Исследуется противоопухолевая активность синтезированных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-03-00674), УрО РАН (проект 12-П-3-1030), а также в рамках Государственной программы поддержки ведущих научных школ (грант НШ 3656.2014.3).

В.П. Краснов, Д.А. Груздев, А.Ю. Вигоров, А.А. Меньшикова, Е.Н. Чулаков, Г.Л. Левит, В.Н. Чарушин

СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ 2-АМИНОПУРИНА С ХИРАЛЬНЫМИ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИМИ АМИНАМИ

Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

Актуальность. Модифицированные нуклеозиды пуринового ряда представляют интерес как потенциальные противоопухолевые агенты. Особый интерес представляет получение конъюгатов 2-аминопурина с хиральными аминами. Производные гетероциклических аминов проявляют широкий спектр биологической активности, в том числе противоопухолевую активность.

Задача исследования. Получение конъюгатов 2-аминопурина с хиральными гетероциклическими аминами: 3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2H-[1,4]бензоксазином, 2-метил-6-фтор-1,2,3,4-тетрагидрохинолином, и их нефторированными аналогами.

Материалы и методы. Исходные энантимерно чистые амины были получены из рацематов с помощью разработанного нами метода кинетического разделения с использованием хлорангидридов оптически активных кислот. В качестве исходных пуринов использовали 2-амино- и 2-ацетиламино-6-хлорпурины. Исследовано два подхода к получению конъюгатов 2-аминопурина с гетероциклическими аминами: 1) «прямое» введение фрагментов хиральных гетероциклических аминов в молекулу 2-аминопурина; 2) использование линкерного фрагмента для получения конъюгатов. «Прямое» введение фрагментов гетероциклических аминов в положение 6 2-аминопурина удалось осуществить с низкими выходами при кипячении в трифторэтаноле в присутствии трифторуксусной кислотой в качестве катализатора.

Подход, основанный на использовании остатка 6-аминокапроновой кислоты в качестве линкера, привел к конъюгатам 2-аминопурина с более высокими выходами.

Во всех случаях синтез пурин-6-ил-замещенных производных хиральных гетероциклических аминов не сопровождался рацемизацией хирального центра в остатке амина. Оптическая чистота целевых конъюгатов подтверждена методом ВЭЖХ.

Результаты и выводы. Впервые получены энантимерно чистые производные гетероциклических аминов, соединенные с остатком 2-аминопурина, – перспективные субстраты для получения на их основе нуклеозидов, потенциальных противоопухолевых и противовирусных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-03-00674), УрО РАН (проект 12-П-3-1030), а также в рамках Государственной программы поддержки ведущих научных школ (грант НШ 3656.2014.3).

Д.С. Кузнецова¹, М.В. Ширманова¹, В.А. Каменский², П.В. Субочев², С.А. Лукьянов^{1,3}, Е.В. Загайнова¹
3D-СФЕРОИДЫ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ПОДБОРА РЕЖИМОВ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫМИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

²Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

³Институт биоорганической химии РАН, Москва

Актуальность. В исследовании противоопухолевых эффектов новых препаратов или методов терапии монослойная клеточная культура не может достаточно полно отражать свойства опухоли, а работа с опухолевыми моделями животных является более дорогостоящей и требует специальных профессиональных навыков. Сфероиды представляют собой клеточные агрегаты, имитирующие солидные опухоли до начала ангиогенеза.

Цель исследования. Подбор режимов фотодинамической терапии (ФДТ) с генетически кодируемым фотосенсибилизатором KillerRed на опухолевых сфероидов при воздействии облучения непрерывного и импульсного лазера.

Материалы и методы. Сфероиды получали из культуры клеток рака шейки матки человека HeLa Kvoto, трансфицированных геном флуоресцентного фототоксичного белка KillerRed. Для формирования сфероидов клетки высаживали в планшеты на матригель. На 5 день культивирования одна группа сфероидов подвергалась воздействию непрерывного, другая - импульсного лазера различной мощности и экспозиции. В процессе облучения флуоресценция клеток регистрировалась на микроскопе LSM Meta 510 или Leica DMIL для оценки выгорания белка KillerRed. Для анализа клеточной гибели сфероиды окрашивали аннексином V - FITC и пропидиум йодид через 24 ч после облучения.

Результаты и выводы. Получены зависимости степени выгорания белка KillerRed от световой дозы при использовании плотности мощности 110, 140, 160 мВт/см². Показано, что степень выгорания не зависит от режима воздействия (импульсный или непрерывный). Наибольшее снижение уровня флуоресценции (90 %) достигалось при воздействии плотностью мощностью 160 мВт/см² в течение 20 мин. Впервые на модели сфероидов исследована возможность индукции фототоксических повреждений с помощью белка KillerRed. В сфероидов, подвергавшихся лазерному облучению, выявлена активация апоптоза. Полученные данные позволяют сделать вывод, что 3D-сфероиды являются перспективной моделью для подбора режимов в ФДТ перед исследованиями *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта правительства РФ № 11.G34.31.0017.

Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова,
Т.В. Абрамова, А.А. Сергеев, К.А. Серезин, В.А. Дерябина, В.М. Бухман
**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
 ОТЕЧЕСТВЕННОГО ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ОКСАЛИПЛАТИНА
 И ОКСАЛИПЛАТИНА ФИРМЫ ТЕВА**

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

Цель исследования. Сравнительное изучение «острой» и «субхронической» токсичности нового воспроизведенного в лаборатории лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН противоопухолевого препарата оксалиплатин (ОП-В) и оксалиплатина-Тева (ОП-Тева) (Фармацевтическое предприятие Лтд., Израиль).

Материалы и методы. Исследования проведены на 70 мышах-самцах гибридах B₆D₂F₁ и 250 неинбредных крысах-самцах, полученных из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. ОП-В приготовлен в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН – раствор для внутривенного введения с концентрацией оксалиплатина 5 мг/мл, во флаконе по 10 мл, серии 010412. ОП-Тева – раствор для внутривенного введения 5 мг/мл, во флаконе по 10 мл, серии 10N11KM. В опытах по «острой» токсичности препараты вводили мышам однократно внутривенно в дозах от 10 до 30 мг/кг, крысам от 5 до 30 мг/кг. В опытах по «субхронической» токсичности препараты вводили внутривенно ежедневно 3-кратно в трёх суммарных дозах, рассчитанных, исходя из МПД, определённой в опытах по «острой» токсичности на крысах: 8 мг/кг (0,5МПД), 16 мг/кг (МПД), 24 мг/кг (1,5МПД).

Результаты. На основании результатов, полученных при сравнительном изучении «острой» токсичности на мышах и крысах установлены расчетные токсические дозы ОП-В для мышей: ЛД₁₀=17,2 мг/кг; ЛД₅₀=18,5 (17,9÷19,1) мг/кг; для крыс: ЛД₁₀=16,1 мг/кг; ЛД₅₀=19,7 (18,2÷21,2) мг/кг и ОП-Тева для мышей: ЛД₁₀=15,8 мг/кг; ЛД₅₀=20,1 (19,0÷21,2) мг/кг; для крыс: ЛД₁₀=16,3 мг/кг; ЛД₅₀=19,0 (17,9÷20,2) мг/кг, которые практически не отличаются друг от друга. По результатам изучения «субхронической» токсичности установлено, что ОП-В и ОП-Тева проявляют практически одинаковую количественную и качественную токсичность. Так, ОП-Тева, введенный в суммарной дозе 24 мг/кг (2 МПД), вызвал гибель 5 из 5 крыс (100 %), а введенный в эквивалентной дозе ОП-В – 4 из 5 крыс (80 %). ОП-В и ОП-Тева по показателям количественной токсичности (летальность, биомаркеры токсичности, морфометрия органов) и патоморфологического изучения практически не отличаются друг от друга.

Выводы. На основании результатов, полученных при сравнительном изучении «острой» и «субхронической» токсичности установлено, что ОП-В и ОП-Тева проявляют практически равную токсичность.

*Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова,
Т.В. Абрамова, А.А. Сергеев, К.А. Серезжин, В.А. Дерябина, В.М. Бухман*

ТОКСИЧНОСТЬ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО АКАДЕЗИНА - АКАВИДОНА

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

Цель исследования. Изучение «субхронической» токсичности Акавидона на крысах, изучение аллергизирующего действия на морских свинках, исследование пирогенных свойств и местнораздражающего действия на кроликах.

Материалы и методы. «Субхроническая» токсичность проведена на 40 здоровых неинбредных беспородных крысах самцах, полученных из разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН. Препарат вводили внутрибрюшинно ежедневно 15-кратно в трех дозах: 2300 мг/кг суммарная доза, равная 2 МПД при внутрибрюшинном введении крысам (разовая доза – 153 мг/кг); 1150 мг/кг суммарная доза, равная 1 МПД (разовая доза – 77 мг/кг); 750 мг/кг суммарная доза, равная 1/2 МПД (разовая доза – 50 мг/кг). Аллергизирующее действие – на 60 морских свинок-самках, массой 230–250 г, полученных из питомника ГУНЦ Биомедицинских технологий «Филиал Андреевка» РАМН. Исследование пирогенности и местнораздражающего действия – на 48 кроликах породы «Шиншилла», массой 2,5–3,0 кг, полученных из питомника лабораторных животных РАМН «Манихино».

Результаты. Установлено, что Акавидон после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного применения в трех исследованных дозах не вызывал гибели животных, не оказывал влияния на общее состояние животных, не вызывал внешних проявлений токсичности. На все сроки наблюдения не изменял поведенческие реакции животных, не вызывал изменений показателей периферической крови, морфо-функциональных изменений в печени и поджелудочной железе, морфо-функциональных изменений в состоянии сердечно-сосудистой системы животных. Акавидон не вызывал отклонений суточного диуреза и не влиял на содержание мочевины и креатинина в сыворотке крови крыс по сравнению с данными контрольных животных. Однако морфологически отмечены не дозозависимые необратимые несильно выраженные очаговые деструктивные воспалительные и дистрофические изменения в почках части крыс, получавших препарат в суммарной дозе 1150 мг/кг (МПД) как на ранние (1сутки), так и на поздние (30 суток) сроки наблюдения. На основании анализа данных, полученных в опытах по «острой» (расчетные токсические дозы) и «субхронической» токсичности (отсутствие гибели животных при введении препарата в суммарных дозах 1/2 МПД, 1 МПД и 2 МПД установлено отсутствие кумулятивных свойств Акавидона. Препарат обладает дозозависимыми слабыми аллергизирующими свойствами. Акавидон в 2,5 %, 5 % и 10 % концентрациях вызывает слабое дозозависимое местнораздражающее действие (несильно выраженные признаки воспаления сохраняются до 14 суток наблюдения). Установлена тест-доза Акавидона по пирогенности для проведения биологического контроля качества и стандартности препарата, равная 50 мг/кг (1,0 мл/кг 5% раствора).

Выводы. Полученные результаты по изучению токсичности Акавидона позволяют рекомендовать его для дальнейшего изучения.

Г.Д. Кутлиева, Д.К. Огай, Ш.М. Миралимова, Н.А. Элова, С.Н. Наврузов, Х.Д. Исламов

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ КОРРЕКЦИИ МИКРОФЛОРЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Институт микробиологии АН РУз, Республиканский Онкологический Научный Центр МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан

Актуальность. Любое противоопухолевое лечение снижает и без того низкий уровень иммунной защиты. Поэтому у ослабленных больных, особенно с нарушениями иммунитета, у онкологических больных самовосстановления микрофлоры кишечника не происходит, и часто у них появляются клинические симптомы дисбактериоза. Распространенность и неуклонный рост онкозаболеваемости колоректальным раком, наличие отягочающего влияния массивной химио- и лучевой терапии на состояние микрофлоры толстой кишки послужили основанием для проведения исследований у больных с данной патологией.

Задачи исследования. Изучение микрофлоры кишечника больных колоректальным раком, проведение диагностики дисбиоза с последующей коррекцией отечественными пробиотическими препаратами.

Материалы и методы. Исследования проводятся на базе РОНЦ МЗ РУз в отделении онкоколопроктологии. Объектом исследования послужили 20 больных с колоректальным раком в возрасте 40–75 лет.

Результаты. У всех обследованных был выявлен дисбиоз кишечника 3–4 степени. Из микрофлоры толстой кишки были выделены условно-патогенные микроорганизмы: *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Candida spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*. У 6 больных из 20 наблюдается увеличение лактозанегативных кишечных палочек от 2 до 10 раз. У всех больных отмечено отсутствие лактобактерий (100 %), в норме которые должны быть не менее 10^7 – 10^8 КОЕ/г. Бифидобактерии отсутствовали или представляли очень низкий титр клеток 10^1 – 10^2 КОЕ/г (в норме до 10^9 КОЕ/г). Коррекцию проводили индивидуально отечественными препаратами «Лактобактерин», «Бифидумбактерин», «Колибактерин» и «Бификол». Установлено, что у 80 % леченных больных наблюдается изменение микрофлоры в положительную сторону, связанное с восстановлением нормофлоры толстой кишки (титр клеток лакто-и бифидобактерий был восстановлен до 10^7 – 10^8 КОЕ/г). Количество условно-патогенных бактерий обнаружено в пределах допустимой нормы.

Выводы. Таким образом, результаты клинических испытаний показали эффективность отечественных пробиотических препаратов для коррекции дисбиотического состояния больных. Коррекция микрофлоры кишечника больных колоректальным раком способствует повышению эффективности лечения больных, профилактике осложнений после операций, а так же улучшению состояния больных.

*А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова,
И.Д. Гулякин, Т.Д. Миникер, Л.В. Эктова, Н.А. Оборотова*

РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛОКАРБАЗОЛА ЛХС-1208

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

Актуальность. Отличительной особенностью механизма действия производных индолокарбазолов, обладающих противоопухолевой активностью, является их способность взаимодействовать с несколькими мишенями (топоизомеразы, ДНК и киназы) и, следовательно, индуцировать различные пути гибели опухолевых клеток. Объектом настоящего исследования является оригинальная отечественная субстанция производного индолокарбазолов – ЛХС-1208 и его лекарственная форма (ЛФ), предназначенная для применения в терапии опухолей.

Задача исследования. Разработка стабильной лекарственной формы ЛХС-1208 для лечения онкологических больных.

Материалы и методы. Субстанция ЛХС-1208, синтезированная в лаборатории химического синтеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН. Солюбилизаторы: Cremophor ELP, Kolliphor HS15, Kollidon 17 PF, Kollisolv-PEG 400 и Lutrol E-400 (BASF, Германия); растворитель – диметилсульфоксид, чда (Химмед, Россия.) Количественное определение ЛХС-1208 в лекарственной форме проводили на спектрофотометре Cary 100 (Varian, Inc., Австралия) при длине волны 320 нм.

Результаты и выводы. В ходе исследования физико-химических свойств субстанции ЛХС-1208 оказалось, что данное соединение обладает гидрофобной природой и растворимо только в органических растворителях (ДМСО, ацетон и др.). В связи с этим в модельные составы при разработке ЛФ вводили различные солюбилизаторы (Cremophor ELP, Kolliphor HS15, Kollidon 17 PF, Kollisolv-PEG 400), однако это не повысило растворимость ЛХС-1208. Для увеличения растворимости разработана технология получения ЛФ, при которой растворение субстанции ЛХС-1208 проводят в минимально возможном количестве ДМСО, а затем добавляют водный раствор солюбилизатора Kollidon 17 PF. Полученная таким образом ЛФ оказалась стабильной по изученным параметрам (внешний вид, pH, концентрация действующего вещества) и передана на химико-фармацевтические и биологические исследования.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта 13411.1008799.13.120 от 24 июня 2013 г. «Доклинические исследования инновационного лекарственного средства на основе производного индолокарбазола для лечения онкологических заболеваний».

Г.Б. Лана¹, М.А. Барышникова¹, А.А. Вартанян¹, Д.В. Сергеев², Е.А. Чигорина³

СИНТЕЗ НОВЫХ 3-АМИНОИЗОХИНОЛИНОВ И ИХ ПЕРВИЧНЫЙ СКРИНИНГ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ, ИНГИБИРОВАНИЕ МИГРАЦИИ КЛЕТОК И ВАСКУЛОГЕННОЙ МИМИКРИИ

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

²ООО «Асинекс», Москва

³ООО «Институт химического разнообразия», Химки, Московская область

Цель исследования. Создание новых эффективных химиотерапевтических средств и исследование их противоопухолевой активности.

Материалы и методы. На основе виртуального скрининга, с использованием PASS-online, было установлено, что ранее синтезированные производные 3-амино-изохинолинов могли бы обладать противоопухолевой активностью с вероятностью от 0.34 до 0.47, антиангиогенезной активностью с вероятностью от 0.30 до 0.54, а так же активностью ингибиторов протеинкиназ с вероятностью от 0.36 до 0.59. Была сгенерирована комбинаторная библиотека с использованием сервиса molinspiration-online, при этом 15 наиболее химически доступных соединений с индексами ингибиторов протеинкиназ от 0.1 до 0.18 были предложены для синтеза. Цитотоксичность синтезированных соединений исследовали с помощью МТТ-теста на клеточных линиях HCT-116 и A549. Ингибирование миграции клеток изучали на клеточной линии диссеминированной меланомы человека Mel Cher с помощью метода «заживление раны». Для исследования влияния соединений на образование сосудисто-подобных структур использовали метод формирования сосудисто-подобных структур на матрикеле.

Результаты и выводы. Были синтезированы 12 соединений, и первичный скрининг показал, что производные N-(3-изохинолинил)-4-хлоро-бензоиламида (LGB-032) и N-(3-изохинолинил)-4-(N-метил-пиперазинил-метил)-бензоиламида (LGB-017) обладают умеренной цитотоксической активностью на клеточных линиях HCT-116, A549, в концентрациях 50 мкМ выживаемость клеток составила 45, 36 и 16, 29 % соответственно. Было найдено, что соединение LBG-017 способно на 25–30 % ингибировать миграцию клеток меланомы линии Mel Cher. При исследовании влияния соединений на образование сосудисто-подобных структур было обнаружено, что и LGB-017 является эффективным блокатором формирования васкулярных каналов клетками меланомы линии Mel Cher.

В.А. Лапина, Т.А. Павич, А.В. Воробей

**РАЗРАБОТКА И СИНТЕЗ НАНОПЛАТФОРМЫ
НА ОСНОВЕ АЛМАЗНЫХ НАНОЧАСТИЦ
ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ДОСТАВКИ ФОТОДИНАМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ
В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ**

Институт физики НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Актуальность. Поиск новых фотодинамически активных лекарственных противоопухолевых препаратов является актуальной задачей сегодняшнего дня. Объединение принципов двух современных высокотехнологичных направлений в биомедицине – нанотехнологий и фотодинамической терапии открыло широкие возможности для разработки лекарственных средств нового поколения, позволяющих резко повысить эффективность терапии онкологических заболеваний.

Задача исследования. Разработать и синтезировать таргетируемую наноплатформу для селективной доставки лекарственных препаратов в положительные по фолатному рецептору клетки.

Материалы и методы. В качестве основы наноплатформы использовали функционализированные алмазные наночастицы (ФАН) детонационного синтеза. Благодаря особенностям химии поверхности ФАН (наличие функциональных групп различного рода: аминные, карбоксильные, карбонильные, гидроксильные, лактонные и др.) они могут быть нагружены разными типами химиотерапевтических препаратов. В наших исследованиях в качестве такого препарата использовали фотосенсибилизатор хлорин е6 (Хл), в качестве таргетирующего вектора – фолиевую кислоту (ФК).

Результаты и выводы. Синтезирована новая селективная наноплатформа НА-Хл-ФК. Установлено ее взаимодействие с экспрессирующими фолатный рецептор клетками HeLa. Полученная наноплатформа фотостабильна и проявляет в физиологических условиях выраженную фотодинамическую активность, что приводит к гибели связавших ее клеток при освещении. Изучены спектрально-люминесцентные свойства наноплатформы и показано, что они позволяют проводить визуализацию опухолевых клеток. В целом, синтезированная на основе алмазных наночастиц наноплатформа может быть использована для разработки новых эффективных методов терапии онкологических заболеваний.

Н.А. Лесная¹, В.И. Романенко¹, М.С. Калишьян¹, Е.М. Трещалина¹, А.Е. Щекотихин², М.Н. Преображенская²

**ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ
АНТРАФУРАНДИОНА ЛХТА-2034 НА МОДЕЛИ ЛИМФОЛЕЙКОЗА P388/DOX
С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ**

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

²ФГБУ «НИИНА им. Г.Ф. Гаузе» РАМН, Москва

Актуальность. Нами разрабатывается новый оригинальный отечественный ингибитор топоизомераз антрафурандиона ЛХТА-2034 с выраженной противолейкозной активностью. Одной из задач его доклинического изучения является оценка эффективности на опухолевой модели с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), чему и посвящено настоящее исследование.

Цель исследования. Оценка эффективности антрафурандиона ЛХТА-2034 на лимфолейкозе, устойчивом к доксорубину.

Материалы и методы. Исследование проведено на лимфолейкозе P388/DOX, в/б трансплантированном мышам-самкам линии DBA2. Для опытов использован прототип лекарственной формы антрафурандиона ЛХТА-2034 для парентерального применения с солюбилизатором циклодекстрином. Препарат вводили мышам (n=6-7) на 2-6 сутки после трансплантации лейкоза ежедневно в/б в эффективных разовых дозах 30 и 40 мг/кг, суммарно 150 и 200 мг/кг, соответственно. Контроль устойчивости штамма проведен в группе мышей (n=7), которым в/б вводили доксорубин (DOX) в однократной дозе 7,5 мг/кг. Эффективность оценена с помощью стандартного критерия УПЖ %, рассчитанного по средней продолжительности жизни (СПЖ) мышей по сравнению с группой контроля без специфического лечения (n=7). Контроль накопления лейкозного асцита и развития узлов в брюшной полости проведен по результатам аутопсии павших мышей. О переносимости судили по поведению, состоянию, а также по средней массе тела и относительной массе селезенки мышей в сравниваемых группах. Достоверными считали различия при p<0,05.

Результаты. Показано, что на фоне развития P388/DOX без специфического лечения (СПЖ = 9,7 дн.), применение DOX было неэффективным (СПЖ = 9,8 дн.). Препарат ЛХТА-2034 в обеих суммарных дозах 150 и 200 мг/кг вызвал пограничный достоверный дозозависимый противоопухолевый эффект на уровне СПЖ = 12,1 и 13,2 дн., УПЖ = 25 и 36%, соответственно (p<0,05). При аутопсии брюшной полости мышей, леченных ЛХТА-2034, выявлено дозозависимое уменьшение накопления асцита вплоть до полного отсутствия с параллельным уменьшением числа лейкозных узлов. Переносимость лечения ЛХТА-2034 была удовлетворительной и зависела от величины примененной дозы. Под контролем отрицательной динамики массовых коэффициентов показано, что суммарная доза 200 мг/кг на этой модели близка к максимально переносимой.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о достоверном, значимом и дозозависимом пролонгировании жизни мышей с внутрибрюшинно трансплантированным лимфолейкозом с множественной лекарственной устойчивостью P388/DOX под действием 5-дневного внутрибрюшинного введения антрафурандиона ЛХТА-2034 в суммарных дозах 150 и 200 мг/кг при удовлетворительной переносимости.

Работа выполнена в рамках гос. контракта Министерства промышленности и торговли РФ № 12411.1008799.13.007, шифр «2.1 Топоизомеразы 2012».

А.А. Липенгольц^{1,2,3}, А.А. Черепанов^{1,2,3}, И.Н. Шейно¹,
В.Н. Кулаков¹, В.Ф. Хохлов¹, В.А. Климанов³, Е.Ю. Григорьева²

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ГАДОПЕНТЕТАТА В ДИСТАНЦИОННОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

¹Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

³Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

Задачи исследования. Исследование противоопухолевой эффективности дистанционного рентгеновского облучения с предварительным системным введением гадопентетата. Полученные результаты могут быть положены в основу разработки нового метода лучевой терапии и повышения эффективности существующей близкофокусной рентгенотерапии.

Материалы и методы. Исследование проводилось на мышах линии C57Bl/6 весом 20–22 г с трансплантированной аденокарциномой Ca755. Животные были поделены на три группы: группа №1 – животные с трансплантированными опухолями, с которыми не подвергались никакому воздействию (необлученный контроль), группа №2 – животные с опухолью, которые были локально облучены рентгеновским излучением в дозе 10 Гр (облученный контроль) и группа №3 (опытная группа) – животные с опухолями, которым перед облучением рентгеновским излучением в той же дозе, что и группы №2, системно вводилось 0,3 мл водного раствора натриевой соли гадопентетата, содержащей 23 мг гадолиния. Облучение проводилось на рентгеновской установке с напряжением на трубке 200 кВ. Мощность дозы в позиции облучения составляла 1,3 Гр/мин.

Оценка противоопухолевого эффекта оценивалась по динамике роста опухоли и по продолжительности жизни.

Результаты и выводы. В результате проведенных исследований было выявлено, что введение раствора гадопентетата перед облучением приводит к существенной задержке роста опухоли по сравнению с обеими контрольными группами (12 дней и 0 дней соответственно). Медиана продолжительности жизни для групп №1, №2 и №3 составили 22, 36 и 43 дня соответственно. У 25 % животных опытной группы наблюдалось полное излечение опухоли, тогда как в обеих контрольных группах рецидив наблюдался у 100% животных.

Е.В. Лихачева¹, Г.В. Пономарев², М.В. Муравьев³
**ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ РИНОСИНУСОПАТИЙ,
СОЧЕТАННЫХ С БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ**

¹Б1 ГКБ, Москва

²ФГБУ «ИБМХ» РАМН, Москва

³ООО "Панков-Медикл", Москва

Актуальность. Метод ФДТ более 12 лет входит в состав комплексного лечения неопухолевых ЛОР-патологий. В настоящее время появилась возможность широкого использования в диагностике КТ и МРТ, поэтому выявляются случаи хронических и затяжных синуситов и риносинусопатий, являющихся причиной острых и хронических бронхолегочных заболеваний. Часто патологии пазух носа бессимптомны или с минимальной симптоматикой (синдром постназального затекания), но требует лечения в связи с основным заболеванием (бронхиты, пневмонии и т.д.). В данной ситуации одним из вариантов лечения может быть проведение ФДТ.

Задача исследования. Оптимизация амбулаторного комплексного консервативного лечения синуситов и риносинусопатий при помощи ФДТ.

Материалы и методы. Проведено лечение методом ФДТ 17 пациентам, из них – 7 мужчин (41,1 %), 10 женщин (58,9 %), в возрасте от 15 до 70 лет, из них – 14 страдающих затяжным или хроническим этмоидитом, 3 – сфеноидитом, впервые выявленными. Все пациенты перенесли острый бронхит или пневмонию (5), обострение ХОБЛ или бронхиальной астмы (12). В работе использовали фотосенсибилизатор «Гелеофор» хлоринового ряда в виде геля, наносимого аппликационно на слизистую оболочку нижних и средних носовых раковин, а так же в нижний и средний носовой ход. В качестве источника излучения использовали аппарат светодиодный матричный терапевтический «АСТ» (рег. № ФСР2008/02720) «Гармония-Спектр» с излучением в диапазоне 400–410 нм и 660 нм с мощностью излучения 400–500 мВт на выходе. Облучали в сканирующем режиме слизистую оболочку, расчеты дозы проводили по формуле. Сеансы проводили 1–2 раза в 7–10 дней, всего на курс лечения 2–5 процедур.

Результаты. По данным КТ, лабораторным и общеклиническим: у 7 пациентов (41,1 %) – полная ремиссия после лечения, у 8 (47,1 %) – значительное улучшение (санация по результатам посева отделяемого, уменьшение кашля), у 2 (11,8 %) без эффекта (у данных пациентов выражено искривление носовой перегородки и гипертрофия задних отделов нижних носовых раковин, требующее оперативного лечения).

Выводы. ФДТ как современный метод лечения может использоваться в терапии пациентов с сочетанной ЛОР+бронхолегочной патологией. Возможности ФДТ могут расширяться, учитывая эффективность, неинвазивность и доступность в применении.

А.И. Лобаков¹, Е.Ф. Странадко², В.А. Морохотов¹,
В.Б. Румянцев¹, Ю.И. Захаров¹, Г.Л. Сачелашвили¹, Ю.К. Богомазов¹

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА ВНЕПЕЧЁНОЧНЫХ ЖЕЛЧНЫХ ПРОТОКОВ И БДС

¹ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва

²ФБГУ «ГНЦ Лазерной медицины ФМБА Российской Федерации», Москва

Актуальность. К моменту установления диагноза подавляющее число пациентов опухолью внепечёночных желчных протоков (ВЖП) являются неоперабельными. Специфическое противоопухолевое лечение малоэффективно, что вынуждает искать альтернативные способы борьбы со злокачественными опухолями ВЖП.

Задачи исследования. Оценить эффективность применения фотодинамической терапии (ФДТ) опухолей внепечёночных желчных протоков в зависимости от, используемого фотосенсибилизатора (ФС) и кратности выполнения сеансов ФДТ.

Материалы и методы. В исследование включены 28 пациентов: мужчин было 8 (32,1 %), женщин 19 (67,9 %). Средний возраст пациентов составил 68,5 лет. Во всех случаях выявлена аденокарцинома различной степени дифференцировки. Рак БДС наблюдался у 20 (71,4 %) больных, рак холедоха у 3 (10,7 %), рак ворот печени у 1 (3,6 %) и рак желчного пузыря у 4 (14,3 %) пациентов. В качестве ФС использовались препараты двух групп: производные хлорина Е6 (фотодитазин и радахлорин) 17 (60,7 %) и фотосенс 11 (39,3 %). Для оценки эффективности ФДТ в зависимости от кратности выполнения сеансов больные были распределены на 2 группы: первую группу составили пациенты, которым выполнялся один сеанс ФДТ в течение года, таких пациентов было 14 (48,1 %), вторую группу составили пациенты, которым выполнялось 2 и более сеансов ФДТ в течение года 13 (59,1 %). Результаты лечения оценивались путём определения медианы дожития по методу Каплан-Мейера.

Результаты. Медиана времени дожития при использовании производных хлорина Е6 составила 17 мес. (ДИ-95 %: 12; 21); в случае использования фотосенса – 18 мес. (ДИ-95 %: 16; 19). Летальных исходов не отмечено. Статистически значимых различий при анализе осложнений в двух группах больных не было, однако наиболее тяжёлые осложнения в виде развития фибринозно-язвенного дуоденита и стеноза ДПК отмечались при использовании препарата фотосенс. В группе пациентов, которым выполнялся один сеанс ФДТ в течение года, медиана дожития составила 12,5 мес. (95 %ДИ: 10; 15), в группе больных которым, выполнялось 2 и более сеансов, медиана дожития составила 23 мес. (95 %ДИ: 18; 28).

Выводы. Производные хлорина Е6 сопоставимы по эффективности с фотосенсом, однако с учётом анализа развившихся осложнений, более предпочтительно использовать препараты производные хлорина Е6. Увеличение кратности выполнения сеансов ФДТ позволяет увеличить продолжительность жизни пациентов с неоперабельными опухолями ВЖП.

М.В. Лощенко, А.В. Бородин, Д.А. Гольбин, П.В. Зеленков, А.М. Паршунина, К.Г. Линьков, А.А. Потапов

КОМБИНИРОВАННАЯ ВИДЕО-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ В ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ НЕРВНЫХ ТКАНЯХ

Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Москва Институт нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко, Москва

Задачи исследования. В настоящей работе исследовалось накопление фотосенсибилизатора в опухолях нервных тканей человека и возможность проведения интраоперационной навигации с применением новых видеодиагностических инструментов.

Материалы и методы. В исследовании применялся препарат Аласенс. Аппаратура включает себя флуоресцентную видеосистему для эндоскопов, флуоресцентную видеосистему для операционных микроскопов и волоконно-оптический спектрометр. Флуоресцентные видеосистемы построены на основе двух источников света и двух чувствительных видеокамер. В качестве источников света использовались лазер 635 нм и светодиодный источник белого света. Лазер служит для возбуждения флуоресценции АЛА-индуцированного протопорфирина 9, в то время как светодиодный источник служит для осуществления навигации в привычном белом свете. Видеосистема снабжена интегрирующей точкой в середине экрана, которая указывает интенсивность флуоресценции, а при должной нормировке, и концентрацию фотосенсибилизатора.

Результаты и выводы. Аппаратура и метод были апробированы на пациентах с менингиомой, проросшей в полость носа, и атипичной невриномой, исходящей из спинномозговых корешков на двух уровнях шейного отдела спинного мозга. В обоих случаях флуоресцентная видеосистема продемонстрировала высокую чувствительность, а показания интегрирующей точки в рамках погрешности совпадали с показаниями, снимаемыми с волоконно-оптического спектрометра. В силу того, что флуоресцентная видеосистема возбуждает флуоресценцию протопорфирина 9, используя длину волны 635 нм, что близко к окну прозрачности биологической ткани, система позволила зондировать ткань с некоторым заглублением и работать в условиях умеренного кровотока, что затруднительно при использовании стандартной видеофлуоресцентной аппаратуры, возбуждающей флуоресценцию в синем диапазоне длин волн.

М.Е. Мамаева¹, А.В. Алясова¹, В.В. Новиков²

СЫВОРОТОЧНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМЫХ МОЛЕКУЛ HLA-I КЛАССА И HLA-DR У БОЛЬНЫХ МИОМАМИ

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

²Нижегородский государственный университет, Нижний Новгород

Цель исследования. Проанализировать содержание растворимых молекул HLA-I класса (sHLA-I) и HLA-DR в сыворотке крови больных миомами.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 53 больных миомами в возрасте 31–79 лет. Контрольная группа была представлена 45 женщинами, не страдающими гинекологической патологией, сопоставимыми по возрасту с обследованными больными. Диагноз заболевания во всех случаях был подтвержден гистологически путем патологоанатомического исследования послеоперационного материала. Определение уровня растворимых дифференцировочных молекул в сыворотке крови проводили двухсайтовым иммуоферментным методом. Для обработки результатов исследования использовался пакет статистических программ STATISTICA 6.0.

Результаты. Концентрация растворимых молекул HLA-I класса в сыворотке крови здоровых женщин составила 1012 ± 214 U/ml, молекул HLA-DR – $99,5 \pm 18,4$ U/ml. У больных миомами матки содержание sHLA-I молекул в $1,7$ ($1751,6 \pm 148,3$ U/ml) и sHLA-DR в $2,0$ раза ($196,0 \pm 14,4$ U/ml) статистически значимо превышало уровень этих белков в контрольной группе. В случаях появления 1 миоматозного узла наблюдалось возрастание ($p < 0,05$) концентрации данных белков в $2,2$ и $3,1$ раза по сравнению с контролем. У больных с наличием 2–3 узлов содержание молекул sHLA-I в $1,7$ раза было выше, чем у здоровых женщин ($p < 0,05$), а содержание sHLA-DR молекул в сыворотке крови не отличалось от показателя в контрольной группе. У больных с преимущественно субсерозной локализацией новообразований наблюдался наиболее низкий уровень в сыворотке крови и молекул sHLA-I класса, и молекул sHLA-DR по сравнению с соответствующими показателями у пациентов с иной локализацией миоматозных узлов.

Таким образом, развитие миомы сопровождается достоверным увеличением сывороточных концентраций растворимых молекул HLA-I класса и HLA-DR. Изменения уровней этих белков взаимосвязаны с количеством миоматозных узлов и их локализацией. По-видимому, выявленные отклонения уровня белков являются одним из факторов, определяющих своеобразие клинического течения того или иного варианта заболевания, поскольку они выступают в роли эндогенных иммуномодуляторов, принимая непосредственное участие в реализации иммунного ответа, отличающегося у больных с различным числом и локализацией миоматозных узлов.

М.Е. Мамаева¹, А.В. Алясова¹, В.В. Новиков²

СОДЕРЖАНИЕ РАСТВОРИМОГО CD95 АНТИГЕНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ТЕЛА МАТКИ

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

²Нижегородский государственный университет, Нижний Новгород

Цель исследования. Проанализировать содержание растворимого CD95 (sCD95) антигена в сыворотке крови больных раком тела матки.

Материалы и методы. Под наблюдением находилось 65 больных раком тела матки в возрасте 31–79 лет. Контрольная группа была представлена 45 женщинами, не страдающими гинекологической патологией, сопоставимыми по возрасту с обследованными больными. Диагноз заболевания во всех случаях был подтвержден гистологически путем патологоанатомического исследования послеоперационного материала. Определение уровня растворимых дифференцировочных молекул в сыворотке крови проводили двухсайтовым иммуоферментным методом. Для обработки результатов исследования использовался пакет статистических программ STATISTICA 6.0.

Результаты. В контроле содержание sCD95 антигена равнялось $374,3 \pm 23,8$ U/ml. У больных злокачественными опухолями тела матки сывороточный уровень белка составил $395,39 \pm 53,74$ U/ml и достоверно не отличался от нормы. У больных аденокарциномами значение суммарной фракции sCD95 антигена в $1,5$ раза превышало норму ($p < 0,05$). У больных саркомами матки содержание sCD95 антигена не отличалось статистически значимо от нормы, но было меньше ($p < 0,05$) в $1,9$ раза, чем в предыдущей группе. При железисто-плоскоклеточных опухолях уровень белка не отличался от уровня в контроле и у больных аденокарциномами, но достоверно превышал значения данного показателя у больных саркомами матки в $1,3$ раза. В случаях высокодифференцированных аденокарцином (ВДА), имеющих более благоприятное течение, уровень sCD95 антигена достоверно превышал норму в $1,9$ раза, у больных умереннодифференцированными аденокарциномами (УА) – достоверно не отличался от нормы, но в $1,8$ раза был ниже ($p < 0,05$), чем в предыдущей группе. В случаях аденокарцином низкой степени дифференцировки, имеющих плохой прогноз, содержание данного белка не отличалось от нормы и значений этого показателя в группе больных УДА, но было значимо ниже, в $2,4$ раза, чем у больных ВДА.

Выводы. Таким образом, развитие рака тела матки не сопровождается значимыми изменениями уровня растворимого CD95 в сыворотке крови, что может свидетельствовать о глубокой дисфункции иммунной системы у этой группы больных. Однако изменения концентрации данного белка взаимосвязаны с особенностями гистологического строения опухоли и степенью дифференцировки аденокарциномы.

Ю.В. Маризина, Г.С. Неприна, Д.В. Кудрявцев, Н.В. Селиванова, Е.В. Абакушина

ФЕНОТИП ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ МЕЛАНОМОЙ ПОСЛЕ ИММУНОТЕРАПИИ

ФГБУ Медицинский Радиологический Научный Центр Минздрава России, Обнинск

Задача исследования. Оценить субпопуляционный состав лимфоцитов и экспрессию маркеров активации у больных меланомой после иммунотерапии лимфокин активированными клетками (ЛАК-терапии).

Материалы и методы. Оценен фенотип лимфоцитов периферической крови и маркеры активации (HLA-DR, CD38, CD69, CD314, CD25) у 13 больных меланомой до проведения иммунотерапии и у 9 пациентов через 2–4 недели после. Лимфоциты выделяли из периферической крови по стандартной методике на градиенте плотности и культивировали в течение 7 дней в CO₂ инкубаторе в среде с 250 МЕ/мл ИЛ-2. Фенотипирование окрашенных лимфоцитов проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACScan (Becton Dickinson, США).

Результаты. Было обследовано 13 человек, пятерым проведено по 2 курса ЛАК-терапии, остальным – по 1 курсу. Все больные меланомой хорошо переносили биотерапию. У данной группы больных выявлено повышение содержания регуляторных Т-лимфоцитов (среднее 7,24 %) и CD25⁺ клеток (среднее 9,37 %). Относительное содержание активированных лимфоцитов HLA-DRall⁺ в среднем составило 18,64 %, CD314⁺ – 39,9 %, CD38⁺ – 34 %, CD69⁺ – 11,63 %. Через 2–4 недели после биотерапии у всех больных достоверно снизился уровень В-лимфоцитов ($p < 0,05$) и стал ниже границы нормы. Сохранилось повышенное содержание Treg и CD25⁺ клеток. Количество CD38⁺ и CD38⁺CD3⁺ клеток достоверно уменьшилось в среднем на 13 % и 11 % соответственно ($p < 0,05$). Наблюдалась тенденция к увеличению числа активированных лимфоцитов экспрессирующих HLA-DR до 22,58 %, что превышает верхнюю границу нормы и CD69⁺ лимфоцитов с 11,63 % до 16,39 %. Также незначительное увеличение численности субпопуляций активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺) с 10,64 до 13,75 % и NK-клеток (CD69⁺CD16⁺) с 3,86 % до 5,16 %. Экспрессия маркера апоптоза Fas (CD95⁺) на всех клетках и на Т-лимфоцитах (CD95⁺3⁺) имеет тенденцию к снижению после иммунотерапии.

Выводы. Показано, что у пациентов с меланомой повышено содержание регуляторных Т-клеток и CD25⁺ лимфоцитов. Через 2–4 недели после иммунотерапии данные показатели не изменились, но достоверно снизилось содержание В-лимфоцитов и активированных Т-лимфоцитов CD38⁺CD3⁺, возможно за счет незначительного увеличения NK-клеток.

Д.В. Маринич¹, Н.В. Гончарова¹, Т.Н. Глинская¹, Т.В. Шевчук², О.В. Дьяченко², Я.И. Бурьянов²

МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА YB-1 ПРИ ЛЕЙКОЗАХ

¹ГУ Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

²Филиал института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Пуццано.

Задача исследования. Изучение функциональной взаимосвязи метилирования регуляторно-промоторной области гена множественной лекарственной устойчивости (MDR1), иммунофенотипической экспрессии белка ppg-170 в сопоставлении с экспрессией YB-1-гена у больных с разными видами лейкоemий.

Материалы и методы. Использовались методы краткосрочных культур клеток, иммунофенотипирования, метилзависимая полимеразных цепей реакция (МЗ-ПЦР), обратнотранскриптная полимеразных цепей реакция (ОТ-ПЦР), электрофорез ДНК в агарозе с последующим сканированием геля. В качестве исходного материала для выделения ДНК были использованы лейкоциты периферической крови и ядродержащие клетки костного мозга больных острым миелобластным лейкозом (ОМЛ), острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ), хроническим миелолейкозом и хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). В качестве контроля использовались образцы ДНК периферической крови 10 здоровых доноров. Во всех случаях диагноз подтверждался морфологическими, цитохимическими методами и методом иммунофенотипирования.

Результаты исследований свидетельствуют о наличии корреляции между экспрессией YB-1 гена и статусом метилирования MDR-1 гена у больных, находящихся в стадии прогрессирования заболевания; высокие показатели транскрипционной активности YB-1-гена в большинстве случаев соответствуют низкому уровню метилирования регуляторно-промоторной области гена MDR1.

Выводы. В исследовании проанализирован характер корреляции метилирования 5'-промоторной области гена MDR-1 в норме и при лейкозах и экспрессией нового маркера – гена YB-1. Как известно, ген MDR-1 во многом определяет эффективность химиотерапии онкогематологических заболеваний, а деметилирование ДНК в его регуляторно-промоторной области, как правило, коррелирует с экспрессией гена. Фактором, потенцирующим транскрипционную активность MDR1 в ядре клетки, является Y-бокс белок. Если такая связь действительно является устойчивой, то феномен YB-1/MDR1-ассоциации станет еще одним шагом на пути создания эпигенетической панели маркеров прогрессирования течения лейкоемической болезни, детекции минимальной остаточной болезни и рационализации терапии онкогематологических заболеваний.

О.В. Матвеева¹, Л.Ф. Жандарова², С.П. Бажанов¹, В.В. Островский¹

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ СПИННОГО МОЗГА

¹ФГБУ «СарНИИТО травматологии и ортопедии» МЗ РФ, Саратов

²ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» МЗ РФ, Саратов

Актуальность. Опухоли спинного мозга и позвоночника встречаются в 8–10 раз реже опухолей головного мозга. Они составляют 12–15 % всех новообразований центральной нервной системы. Частота встречаемости опухолей спинного мозга – 1–2 случая на 100 000 человек в год. У пациентов данной категории значительно страдает качество жизни из-за болевого синдрома, нестабильности в позвоночно-двигательных сегментах и возникающего неврологического дефицита.

Цель исследования. Оценить возможности цитологического и гистологического методов исследований в диагностике опухолей спинного мозга.

Материалы и методы. В отделении лабораторной диагностики «СарНИИТО» за период 2009–2013 гг. были изучены препараты у 38 (81 %) больных с первичными опухолями и 9 (19 %) пациентов с вторичными опухолями спинного мозга в возрасте от 25 до 79 лет. Среди больных преобладали женщины (83 %).

Результаты. По локализации новообразования больные распределились следующим образом: на шейном уровне их выявлено – 24 %, на грудном – 45 % и пояснично-крестцовом – 31 %. Экстремедулярные опухоли спинного мозга локализовались на шейном уровне чаще на уровне С4, на грудном уровне – Th6–11 и пояснично-крестцовом отделе чаще на уровне L2–5. Метастазы выявлены на пояснично-крестцовом уровне – 56 % пациентов, на грудном – 33 %, на шейном – 11 %. При гистологическом исследовании первичных опухолей спинного мозга неврилеммома верифицирована у 18 (47 %) больных, преобладал вариант с наличием телец Верокаи; менингиома диагностирована у 15 (39 %) пациентов, преобладал псаммоматозный вариант; нейрофиброма у 3 (8 %), эпендимы – у 2 (5 %) человек. Среди больных с вторичными опухолями спинного мозга у женщин чаще диагностировали метастазы рака из молочной железы, у мужчин – метастазы рака из легкого. Во всех случаях применен интраоперационный цитологический метод исследования операционного материала. Расхождений между цитологическим и гистологическим исследованиями не выявлено.

Выводы. Таким образом, морфологическое исследование является эффективным методом в диагностике опухолей спинного мозга и позвоночника. Проведенный анализ позволил установить особенности локализации и распространения опухолей спинного мозга и позвоночника соответственно.

И.Г. Меерович, Н.И. Казачкина, А.П. Савицкий

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЯВЛЕНИЙ ФОТОИММУННОГО ОТКЛИКА ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

ФГБУН Институт биохимии им.А.Н. Баха РАН, Москва

Задачи исследования. Изучение влияния ФДТ на рост первичных и вторичных очагов мышечных опухолей и изучение экспрессии белка теплового шока HSP70 в результате ФДТ для оценки его влияния на развитие иммунного ответа.

Материалы и методы. ФДТ проводили с использованием метилового эфира О-этилоксим-N-этоксикарбонилпурпуринимида в мицеллярной форме (МИТХТ им. М.В. Ломоносова) (внутривенное введение в дозе 1 мг/кг веса тела, облучение – 15 минут, плотность мощности 150 мВт/см²), и индоцианинового зеленого (ICG, «Cardiogreen», Sigma), (облучение – 15 минут, плотность мощности 500 мВт/см²). Для облучения использовался лазер MRL-III-800nm («Микрохоло», Россия). В качестве иммуноадаьювантов использовались полный адьювант Фрейнда (ИАФ) и растворимое производное полимера на основе хитозана (Marine Polymer Technologies, США). В экспериментах использовались мыши линии C57BL/6 (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН).

Результаты и выводы. На модельных опухолях Льюиса показано, что при внутриопухолевом введении ICG в сочетании с производным хитозана (0,1 мл 0,5% раствора) с последующим через 75 мин облучением опухоли торможение роста опухоли (ТРО) для этой группы составило около 80 % на 6 день и 98–100 % с 9 по 20 день после ФДТ. В группе, где производное хитозана не вводили, ТРО после облучения увеличивалось до 9 дня и составило 71 %, а затем уменьшалось до 27 % к 20 дню после ФДТ. При внутривенном введении ICG (5 мг/кг веса тела), с последующим через 60 мин облучением, ТРО в обеих группах к 15 дню после облучения составляло 53 %, затем увеличивалось в группе, подвергавшейся сочетанному воздействию, и уменьшалось в группе, подвергавшейся только ФДТ. При локальном введении ICG после ФДТ содержание HSP70 достигало максимума через 4 часа после облучения, затем снижалось; содержание же HSP70 в печени возрастало к 24 часам после облучения. Сочетанное действие ФДТ с производным пурпуринимида и ИАФ более эффективно влияло на рост легочных метастазов мышечной меланомы В16, чем только ФДТ: количество легочных метастазов составляло соответственно 42 % и 64,5 % по сравнению с группой, не подвергавшейся никакому воздействию.

Работа проводилась при поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» и частично гранта РФФИ № 14-02-0934.

*И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, Н.Ю. Кульбачевская,
О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, А.С. Кузнецова, В.М. Бухман*
**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ КРЫС
ПРИ 3-КРАТНОМ ВНУТРИВЕННОМ ПРИМЕНЕНИИ
ОТЕЧЕСТВЕННОГО ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ОКСАЛИПЛАТИНА
И ОКСАЛИПЛАТИНА ФИРМЫ ТЕВА**

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

Цель исследования. Сравнительная патоморфологическая оценка внутренних органов крыс на 1 и 30 сутки после 3-кратного ежедневного внутривенного применения оксалиплатина воспроизведенного (ОП-В) и оксалиплатина фирмы Тева (ОП-Тева) на этапе доклинического изучения.

Материалы и методы. Использовано 70 неинбредных крыс-самцов, по 10 крыс в группе. ОП-В и ОП-Тева крысам вводили в разовых дозах 2,7; 5,4; 8,0 мг/кг, и, соответственно, в суммарных дозах – 8,0; 16,0 и 24,0 мг/кг. Крыс умерщвляли диэтиловым эфиром на 1 и 30 сутки после прекращения введений. На вскрытии были взяты участки внутренних органов, которые подвергали общепринятой гистологической обработке с окраской гематоксилином и эозином. Микропрепараты анализировали в световом микроскопе при увеличениях 100, 400, 1000.

Результаты и выводы. На 1 сутки после окончания внутривенного введения ОП-В и ОП-Тева отмечена четкая дозозависимая гипоплазия гемопоэтических клеток в костном мозге, гипоплазия лимфоцитов в тимусе, лимфатических узлах у большинства крыс, и в селезенке у отдельных крыс, причем обратимость гипоплазии к 30 суткам в этих органах была также дозозависимой. ОП-В и ОП-Тева в суммарных дозах 8, 16 и 24 мг/кг вызывали идентичные дозозависимые несильно выраженные деструктивные и дистрофические изменения в почках и семенниках крыс, деструктивно-воспалительные изменения в тонком кишечнике животных. Хотя оба изучаемых препарата показали сходный характер морфологических изменений и их обратимость во внутренних органах, имелись некоторые отличия в действии Оп-В и ОП-Тева на внутренние органы крыс. Так, на 1 сутки после применения ОП-Тева в дозе 24 мг/кг в отличие от ОП-В, у части крыс отмечены дистрофические изменения в печени, а на 30 сутки после применения ОП-В в почках некоторых крыс сохранялись несильно выраженные дистрофические и деструктивные изменения. На 30 сутки после применения ОП-В в суммарной дозе 16 мг/кг в отличие от ОП-Тева у животных были обнаружены дистрофические изменения в сердце (миокард) и сохранялись признаки гипоплазии в костном мозге у большинства крыс. Так несильно выраженные деструктивные и дистрофические изменения в почках к 30 суткам после применения ОП-Тева в дозе 8 мг/кг полностью исчезали, а у отдельных крыс после применения ОП-В в той же дозе еще сохранялись.

*И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова,
Н.Ю. Кульбачевская, А.С. Кузнецова, В.М. Бухман*
**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ КНОТОЛАНА
В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ НА ВНУТРЕННИЕ ОРГАНЫ КРЫС
В ОПЫТЕ ПО ИЗУЧЕНИЮ «ХРОНИЧЕСКОЙ» ТОКСИЧНОСТИ**

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

Цель исследования. Патоморфологическая оценка внутренних органов крыс на 3 и 30 сутки после 30-кратного перорального применения препарата кнотолан в лекарственной форме на этапе доклинического изучения безопасности его применения.

Задачи исследования. Макроскопическая и гистологическая оценка внутренних органов крыс на 3 и 30 сутки после 30-кратного ежедневного перорального применения кнотолана в лекарственной форме в суммарных дозах 37500 мг/кг и 75000 мг/кг.

Материалы и методы исследования. Для патоморфологического исследования использовано 30 неинбредных крыс-самцов, разделенных на 3 группы по 10 крыс в каждой. Крысы 1-й и 2-й групп в течение 30 дней ежедневно перорально получали кнотолан в лекарственной форме в виде 15% раствора в 1% крахмальном клейстере в разовых дозах 1250 и 2500 мг/кг и, соответственно, в суммарных дозах 37500 и 75000 мг/кг. В 3-й группе крысы получали 1% крахмальный клейстер тем же способом и в том же режиме по максимальному объему (контроль). Крыс (по 5 из группы) умерщвляли методом усыпления диэтиловым эфиром на 3 и 30 после окончания применения кнотолана. На вскрытии были взяты участки внутренних органов, которые подвергали общепринятой гистологической обработке с окраской гематоксилином и эозином. Микропрепараты анализировали в световом микроскопе при увеличениях 100, 400, 1000.

Результаты. Кнотолан в лекарственной форме при ежедневном пероральном применении в течение 30 дней в суммарной дозе 37500 мг/кг не вызывал макроскопические и гистологические изменения во внутренних органах крыс как на 3 так и на 30 сутки после окончания его применения. Кнотолан в суммарной дозе 75000 мг/кг вызывал воспалительные и дистрофические (ишемия) изменения в сердце (в миокарде) некоторых крыс как на 3, так и на 30 сутки после окончания его применения. Кнотолан в суммарной дозе 75000 мг/кг вызывал несильно выраженные очаговые дистрофические изменения в печени, почках и семенниках у отдельных крыс на 3 сутки после окончания его применения, которые были обратимы к 30 суткам. При применении кнотолана в лекарственной форме выявлена дозовая зависимость морфологических изменений.

Выводы. Кнотолан в лекарственной форме в суммарной дозе 75000 при 30-дневном пероральном применении может вызывать у некоторых крыс несильно выраженные обратимые изменения в печени, почках и семенниках, а у отдельных крыс может вызывать не полностью обратимые к 30 суткам изменения в сердце. Кнотолан в суммарной дозе 37500 мг/кг в том же режиме не влияет на внутренние органы крыс.

*В.О. Миرونчик¹, Т.Л. Юркитович¹, Н.К. Юркитович¹,
В.А. Алиновская¹, Д.П. Веевник², А.С. Федулов³, П.М. Бычковский¹, Д.А. Адамчик¹*

ПОЛУЧЕНИЕ НОВОЙ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ФОРМЫ ТЕМОЗОЛОМИДА

¹Научно-исследовательский институт физико-химических проблем, Минск; Беларусь

²Городская клиническая больница скорой медицинской помощи, Минск, Беларусь

³Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Цель исследования. Разработка пролонгированной формы противоопухолевого вещества темозоломида, предназначенной комбинированного лечения первично-мозговых и метастатических опухолей головного мозга.

Материалы и методы. Темозоломид – один из наиболее эффективных препаратов при лечении злокачественных новообразований головного мозга. Для создания системы адресной доставки цитостатика вместо локализации опухоли или ее остатков синтезирован препарат, представляющий собой темозоломид, иммобилизованный на биodeградируемые гелеобразующие фосфаты декстрана (ФД), которые биосовместимы с организмом, способны создавать эффект «перегрузки» лекарственным веществом и обладают собственной противоопухолевой активностью. Исследована сорбционная способность синтезированных путем этерификации декстрана со среднемассовой молекулярной массой 60 кДа в системе $\text{Bu}_3\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-P}_2\text{O}_5$ гидрогелей ФД с разной степенью сшивки по отношению к темозоломиду в зависимости от концентрации цитостатика в водных растворах, pH и времени сорбционного процесса. Проведено клиническое испытание на пациентах с первично-мозговыми опухолями головного мозга.

Результаты. Послеоперационный период, при однократном введении препарата Темодекс интраоперационно после завершения основного этапа нейрохирургической операции, у всех включенных в испытание пациентов протекал удовлетворительно. На 10-й день после хирургической операции и имплантации Темодекса на МРТ головного мозга видно присутствие препарата в головном мозге. При этом никаких побочных эффектов или нежелательных проявлений в этот период не наблюдалось. Через 3 месяца после хирургической операции на МРТ головного мозга пациентов препарат не обнаруживается, что свидетельствует о его полном рассасывании.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют об удовлетворительной переносимости и безопасности применения препарата Темодекс в качестве средства локальной химиотерапии злокачественных опухолей головного мозга. Более того не выявлено прогрессирования злокачественного процесса у основной части пациентов.

*В.А. Мисюрин¹, А.Е. Лукина², А.В. Мисюрин^{1,3}, Л.А. Кесаева^{1,3}, Е.Н. Мисюрина³,
Ю.П. Финашутина^{1,3}, И.Н. Солдатова^{1,3}, А.А. Крутов^{1,3}, В.В. Тихонова^{1,3}, А.Ю. Барышников¹*

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА PRAME – НОВЫЙ ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ ФАКТОР ОСТРОГО ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва

²ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ, Москва

³Медицинский центр ООО «ГеноТехнология», Москва

Актуальность. Для острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ) во многих случаях характерна экспрессия раково-тестикулярного гена (РТГ) PRAME в дебюте заболевания. Известно, что при многих онкологических заболеваниях, экспрессия этого гена указывает на неблагоприятный прогноз, однако в случае ОПЛ эти данные неполны.

Задачи исследования. Оценить влияние ко-экспрессии РТГ PRAME и транскриптов гена PML/RARα bcr1 и bcr3 в дебюте ОПЛ на время развития рецидива.

Материалы и методы. Был определен уровень экспрессии РТГ PRAME и типов bcr1 и bcr3 гена PML/RARα в клетках костного мозга 32 первичных больных ОПЛ в дебюте заболевания. Для определения уровня экспрессии использовался метод RQ-PCR. У каждого больного уровень экспрессии генов PRAME и PML/RARα рассчитывался относительно гена Abl. Уровень экспрессии РТГ PRAME относительно PML/RARα считался низким, если при делении показателя уровня экспрессии гена PRAME на показатель уровня экспрессии PML/RARα результат был меньше 0,05, и высоким, если этот результат превышал 0,05. Лечение всех больных производилось по протоколу AIDA. В течение 18 месяцев с момента постановки диагноза фиксировалось время развития рецидива.

Результаты. У 53 % (17/32) больных наблюдался тип bcr1 гена PML/RARα. Из этой группы у 4 больных наблюдался относительно низкий уровень экспрессии гена PRAME. У 13 больных, имеющих тип транскрипта bcr1 PML/RARα, соотношение уровней экспрессии РТГ PRAME было высоким. Экспрессия гена PML/RARα (типа транскрипта bcr3) наблюдалась у 47% (15/32) больных в дебюте ОПЛ. Из них у 5 больных уровень экспрессии гена PRAME относительно PML/RARα был высоким, а у 8 больных - низким. За 18 месяцев наблюдения у 1 из 13 больных, экспрессирующих тип bcr1 и у 4 из 8 больных, экспрессирующих тип bcr3 гена PML/RARα развился гематологический рецидив ОПЛ. У всех больных с рецидивом (16% от общего числа) в дебюте ОПЛ наблюдался низкий уровень экспрессии гена PRAME. У всех остальных больных (84%) не отмечено ни гематологического, ни молекулярного рецидива заболевания.

Выводы. Низкий уровень экспрессии гена PRAME при типе bcr3 гена PML/RARα в дебюте ОПЛ является неблагоприятным прогностическим фактором.

Д.Ф. Морозова¹, Н.М. Сураева¹, А.В. Самойлов², О.С. Бузова¹,
В.А. Голубева¹, И.Н. Михайлова¹, А.Ю. Барышников¹

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЛАНОМНОЙ СУБЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА MEL 1BR

КАК МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

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

²ВНИИ консервной и овощесушильной промышленности Россельхозакадемии, Москва

Актуальность. Создание клеточных моделей для изучения резистентности опухолевых клеток, устойчивых к лекарственной терапии, имеет важное практическое значение. Было показано, что эмбриональные факторы могут индуцировать изменения эпигенетических, пролиферативных, фенотипических и туморогенных характеристик определенных популяций опухолевых клеток в культуре клеточных линий.

Задача исследования. Изучение морфологических и иммунологических характеристик субпопуляций клеток меланомной линии человека Mel 1br, выделенных при воздействии куриного эмбрионального экстракта (ЭЭ).

Материалы и методы. Метод образования колоний был использован для выделения популяций меланомных клеток человека после добавления куриного ЭЭ. Затем проведен отбор клонов меланомных клеток человека, их культивирование в среде RPMI-1640 с добавками в течение не менее 30 пассажей с последующим замораживанием. Оценка характеристик популяций клеток проводили с помощью морфологических и иммунохимических методов исследования.

Результаты. Меланомная культура Mel 1br представлена монослоем, состоящим преимущественно из клеток эпителиоподобного вида с небольшим количеством от 0,5 до 1 % веретеновидных клеток. Было показано, что в результате воздействия ЭЭ, наблюдалась почти 100 % гибель клеток эпителиоподобного вида и определялся только один тип колоний, состоящих из веретеновидных клеток. Выделенный субклон из веретеновидных клеток заметно отличался от исходной культуры Mel 1b интенсивностью роста и способностью к образованию сфероидов. В культуре веретеновидных клеток на 10-12 пассажах культивирования наблюдалось резкое уменьшение HLA-DR-положительных клеток, уменьшение процента CD-54-положительных клеток с молекулами адгезии и значительное увеличение CD-63-положительных клеток с меланоцитарным антигеном по сравнению с исходной линией.

Выводы. Субпопуляция клеток, образующая сфероиды, отличалась от исходной культуры Mel 1br по морфологическим и иммунологическим параметрам. Полученная субпопуляция может быть использована в качестве модели для изучения воздействия экзогенных факторов на опухолевые клетки в сравнении с исходной линией Mel 1br.

Н.Б. Морозова¹, Т.Н. Андреева¹, Т.А. Кармакова¹, Н.А. Рубцова¹,

Р.И. Якубовская¹, М.В. Гуляев², Н.В. Анисимов², Ю.А. Пирогов², Е.А. Лукьянец³, Е.А. Макарова³

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

С ТОЗИЛЬНЫМ ПРОИЗВОДНЫМ БАКТЕРИОХЛОРИНА

ТРАДИЦИОННЫМИ МЕТОДАМИ

И МЕТОДОМ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ (МРТ) В СИСТЕМЕ *IN VIVO*

¹ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава РФ, Москва

²МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва

³ФГУП ГНЦ «НИОПИК» Москва

Задача исследования. Оценка противоопухолевой и антиметастатической активности ФДТ с тозилльным производным бактериохлорина – (3-ПуМеОТс)₄ВС ($\lambda_{\max}$ =760 нм) у мышей с саркомой S37 традиционными методами и методом МРТ.

Материалы и методы. В работе использовали мышей гибридов BDF1 с привитой саркомой S37 в 100% метастазирующей в лимфатические узлы (ЛУ). (3-ПуМеОТс)₄ВС вводили внутривенно в дозе 5,0 мг/кг на 7-ой день роста опухоли. Облучение проводили через 30 минут после введения светодиодным источником красного света с максимумом 759±18 нм (Ps=100 мВт/см², Ws=150 Дж/см²). МРТ-исследования проводили на биоспектротомографе BioSpec 70/30 USR фирмы Bruker (Германия) с постоянным магнитным полем 7 Тл. Состояние первичной опухоли, паховых, подмышечных и внутрибрюшинных ЛУ оценивали на 5, 12, 19 и 26 сутки роста опухоли. T1-взвешенные изображения получали с использованием импульсной последовательности MSME (Multi Spin Multi Echo). Наличие или отсутствие метастатического поражения лимфоузлов подтверждали морфологически. Эффективность ФДТ оценивали, используя общепринятые в экспериментальной онкологии критерии и метод МРТ.

Результаты. Показано, что (3-ПуМеОТс)₄ВС обладает высокой фотоиндуцированной противоопухолевой и антиметастатической активностью при оценке традиционными методами: ТРО – 90–100 %, УПЖ – 189%, КИ – 67%, ЧМ – 34%, ИТМ – 95%. Метод МРТ с морфологическим подтверждением поражения ЛУ дает полную картину развития опухолевого процесса у мышей с саркомой S37 после лечения методом ФДТ в динамике прижизненно. Анализ результатов позволяет зафиксировать для ФДТ с (3-ПуМеОТс)₄ВС выраженную эффективность: первичная опухоль подвергается полной резорбции; регионарный ЛУ, в котором на 5 сутки выявлялись опухолевые клетки, постепенно уменьшается в размерах и на 26 сутки метастазы в нем уже не регистрируются. Остальные ЛУ остаются интактными. У контрольных животных развивается картина распространенного опухолевого процесса, включающая рост первичной опухоли, увеличение в размерах всех групп лимфоузлов и их поражение метастазами.

Выводы. Производное бактериохлорина (3-ПуМеОТс)₄ВС обладает высокой фотоиндуцированной противоопухолевой и антиметастатической активностью. Метод МРТ позволяет наглядно прижизненно оценить динамику роста первичной опухоли и развитие метастатического поражения лимфоузлов в динамике и на минимальном количестве животных получить объективную картину проведенного лечения.

И.И. Мусин, Т.Д. Ерошкина, Р.С. Муджаева, Э.А. Хачатурова

ВЛИЯНИЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

ФГБУ «ГНЦ Колопроктологии» Минздрава России, Москва

Задачи исследования. Изучить изменения углеводного обмена у больных раком прямой кишки после неоадьювантной химиолучевой терапии до, и после операции для отработки методов коррекции.

Материалы и методы. Обследованы две группы больных, оперированных по поводу рака прямой кишки: 1 группа (27 чел.) после неоадьювантной химиолучевой терапии (НХЛТ) и 2 группа (23 чел), которые не были подвержены влиянию НХЛТ, так называемая контрольная группа. Определялись показатели глюкозы, панкреатической и альфы амилаз, гликозилированного гемоглобина, а так же уровень лактата в сыворотке крови до операции и в раннем послеоперационном периоде.

Результаты. До операции в обеих обследованных нами группах больных было выявлено увеличение лактата выше физиологической нормы (соответственно в 1-й группе $4,5 \pm 0,4$ ммоль/л, $p < 0,01$, а во 2-й гр. – $3,1 \pm 0,2$ ммоль/л, $p < 0,05$ при норме до 2,2 ммоль/л). Гликозилированный гемоглобин превышал физиологическую норму до операции в группе с НХЛТ ($7,0 \pm 0,6$ %, $p < 0,05$; норма до 6,0 %). Остальные изучаемые нами показатели (глюкоза, панкреатическая и альфа амилазы) практически не отличались от физиологической нормы. В раннем после операционном периоде в обеих группах больных в равной мере увеличилась концентрация глюкозы крови (в 2–2,5 раза), альфы амилазы (в 1,5 раза) гликозилированного гемоглобина (на 20 %) и лактата (на 25 %) по сравнению с исходным уровнем.

Выводы. Между группами с НХЛТ и без нее нами выявлены значительные различия изменений уровней лактата и гликозилированного гемоглобина уже до операции. После операции в ответ на операционную травму выявлены еще большие, чем до операции увеличения концентраций глюкозы, лактата и гликозилированного гемоглобина с наиболее выраженным эффектом у больных с неоадьювантной химиолучевой терапией. Выявленный высокий уровень лактата и повышенный уровень гликозилированного гемоглобина у больных с НХЛТ целесообразно учитывать при коррекции предоперационной подготовки онкологических больных после неоадьювантной химиолучевой терапии.

Л.Н. Николаевич¹, И.В. Залуцкий¹, С.М. Адекенов²

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА «АРГЛАБИН» НА ГЛИАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ

¹Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

²Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Казахстан

Актуальность. Проблема онкологических заболеваний продолжает оставаться наиболее трудной областью медицины. Поиск эффективных методов и средств борьбы с онкологическими заболеваниями остается первоочередной задачей медицинской науки. Особенно, это касается опухолей головного мозга, которые составляют 50–55 % всех первичных опухолей. Наиболее эффективными в отношении глиом признаны цитостатики темозоломид, тиотеп, кармустин, гемцитабин. Актуальным является использование препаратов растительного происхождения, в частности, оригинального противоопухолевого препарата «Арглабин», разработанного на основе одноименного сесквитерпенового γ -лактона из эндемичного вида растения - полынь гладкая (*Artemisia glabella* Kar. et Kir.).

Задачи исследования. Оценить эффекты воздействия препарата «Арглабин» на клеточные клоны глиальных опухолей и провести скрининг доз данного препарата на модели гетерогенной популяции опухолевых глиальных клеток *in vitro*.

Материалы и методы. Работа выполнена на перевиваемой линии клеток глиомы крысы С6. Методом клонирования гетерогенная популяция глиальных клеток была разделена на две фракции клеток: клоногенные (образующие колонии, состоящие из дочерних клеток) и неклоногенные (не способные формировать колонии).

Результаты. При введении препарата «Арглабин» в дозах 140 мкг/мл и 300 мкг/мл в популяцию опухолевых клеток С6 достоверно подавляется пролиферация глиальных клеток (на 74 % и 55 % соответственно) по сравнению с контролем. Наблюдается достоверное увеличение доли погибших клеток после воздействия препарата «Арглабин» в дозах 140 мкг/мл (в 12 раз) и 300 мкг/мл (в 7 раз) и снижается число генераций клеток в популяции на 48 % и 96 % соответственно по сравнению с контролем. Подобран спектр доз препарата «Арглабин» (2,5 мкг/мл; 1 мкг/мл; 0,25 мкг/мл; 0,2 мг/мл; 2 мг/мл; 20 мг/мл), ингибирующих пролиферацию клоногенных клеток в клонах. Цитостатический эффект подавления пролиферации клоногенных клеток в клонах при воздействии арглабина в дозе 2,5 мкг/мл сохраняется при реклонировании этих клонов.

Выводы. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что глиальные опухолевые клетки чувствительны к воздействию препарата «Арглабин».

*Д.В. Новиков¹, С.В. Шумилова¹, А.В. Алясова³, Е.Ю. Конторицкова³,
А.В. Калугин¹, А.Ю. Барышников², В.В. Новиков¹*

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫХ МОЛЕКУЛ В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕЙ

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва

³Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

Задачи исследования. Иммунная система играет важную роль в развитии опухолей. Изменения первичной структуры и экспрессии сигнальных генов иммунной системы в опухолевой клетке может содействовать росту опухоли. Задачей настоящей работы явилось исследование нуклеотидной последовательности и особенностей экспрессии генов, опосредующих пролиферацию (IL-2Rα), адгезию (ICAM1), апоптоз (Fas) в клетках опухоли различной локализации.

Материалы и методы. Исследовали образцы опухолей и периферической крови больных раком толстой кишки (РТК), легких (РЛ), молочной железы (РМЖ) и эндометрия (РЭ). Выделение нуклеиновых кислот проводили с использованием смеси фенола с хлороформом. Генотипирование образцов проводили методом ПЦР. Детекцию мРНК – методом ОТ-ПЦР. Первичную структуру фрагментов ПЦР определяли по Сенгеру.

Результаты и выводы. В образцах опухолей толстой кишки и молочной железы регистрировались изменения первичной структуры гена ICAM1, вызванные потерей гетерозиготности. Обнаружены мутации гена Fas в образцах опухолей толстой кишки, приводящие к изменению аминокислотной последовательности белка. Генетические изменения детектировались преимущественно на поздних стадиях заболевания. При исследовании экспрессии генов установлено, что мРНК IL-2Rα детектировалась в 98% (48/49) образцов РТК, 82% (28/34) образцов РЛ, 73% (29/40) образцов РЭ. МРНК ICAM1 была выявлена в 84 % (41/49) образцов РТК, 53% (17/32) образцов РЛ и 86% (35/40) образцов РЭ. Экспрессия гена Fas выявлена в 100%, 73% и 100% образцов опухолей РТК, РЛ и РЭ, соответственно. Отсутствие исследуемых мРНК в части образцов опухолей, вероятно, связано с молчанием генов. В некоторых образцах опухолей легких и эндометрия были обнаружены только альтернативные мРНК Fas или IL-2Rα, без мРНК кодирующих полноценный белок. Альтернативные мРНК ICAM1 и IL-2Rα детектировались в опухолях преимущественно вместе с маркерами благоприятного прогноза, у больных РТК и РЛ. Полученные данные могут быть использованы в мониторинге РТК, РЛ и РЭ.

Работа выполнена в рамках базовой части государственного задания №2014/134 Минобрнауки России (проект 2575).

В.В. Носков, Е.А. Дудко, Р.Ю. Раманускайте, Н.О. Вихлянцев, К.К. Лактионов, Т.А. Богуш

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ MRP2 В ТКАНИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО С ПРИМЕНЕНИЕМ ДВУХ КЛОНОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

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

Актуальность. Гиперэкспрессия транспортного белка MRP2 является одной из причин и маркером резистентности к препаратам платины.

Цель исследования. Определение уровня и частоты экспрессии MRP2 в клетках НМРЛ, используя два различных клон антител, для выбора более информативного варианта анализа.

Материалы и методы. Исследованы суспензии клеток, полученные из хирургического биопсийного материала 47 пациентов, оперированных по поводу немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ). Иммунофлуоресцентный анализ проводили методом проточной цитофлуориметрии с применением программы FlowJo и статистического подхода Колмогорова-Смирнова. Использовали: моноклональные антитела к MRP2 – клон «1» и «2» (M2 II-12, ab24106 и M2 III-6, ab3373); изотипические антитела – IgG2a (Abcam) и вторичные антитела, меченные FITC, к мышиному IgG2a (Sigma).

Результаты. Частота экспрессии MRP2 (количество клеток, экспрессирующих MRP2 в исследуемой опухоли), варьировала у разных больных от 4 до 80 %. Средний показатель составил для клона «1» 19,7±10,2 %, для клона «2» – 30,9±17,2%. Интенсивность экспрессии MRP2 (превышение специфической флуоресценции клеток по сравнению с изотипическим контролем) варьировала в опухолях разных больных от 1,1 до 8,3 раз. Средний показатель превышения составил 1,6±0,4 для клона «1» и 3,3±2,1 для клона «2». При использовании клона «1» и «2» опухоли с низкой частотой экспрессии MRP2 (экспрессия маркера менее чем в 30 % клеток) выявлены в 80,9 и 57,4%, с умеренной (в 30–50 % клеток) – у 19,1 и 31,9 % пациентов соответственно. Высокая частота экспрессии маркера (более чем в 50 % клеток) отмечена в 10,6 % опухолей только при использовании клона «2». Опухоли с низкой интенсивностью экспрессии MRP2 (превышение специфической флуоресценции клеток по сравнению с изотипическим контролем менее чем в 2 раза) выявлены соответственно: в 83,0 и 38,3 %, а с высокой – в 17,0 и 61,7 % случаев.

Выводы. Для оценки экспрессии MRP2 в ткани НМРЛ предпочтительным следует признать использование специфических моноклональных антител M2 III-6, ab3373.

Исследование поддержано грантами РФФИ (№ 13-04-01004-а, 12-04-00028-а, 14-04-31734-мол-а) и стипендией Президента РФ (СП-376.2012.4).

М.В. Нуреев¹, Т.А. Богуш², А.А. Каменский¹, Б.Е. Полоцкий², С.А. Тюляндин², М.И. Давыдов²

ЭКСПРЕССИЯ PGRMC1 (МЕМБРАННЫЙ КОМПОНЕНТ ПРОГЕСТЕРОНОВОГО РЕЦЕПТОРА 1) В ТКАНИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО КУРЯЩИХ ПАЦИЕНТОВ МУЖСКОГО ПОЛА

¹МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва

Задачи исследования. В химиотерапии немелкоклеточного рака лёгкого (НМРЛ) первостепенное значение занимают платиносодержащие препараты, но многие больные оказываются резистентными к терапии. Недавние исследования *in vitro* показали, что одной из причин этого может быть экспрессия PGRMC1. Чтобы оценить роль этого белка в реализации специфической активности препаратов платины при лечении НМРЛ, исследованы параметры экспрессии этого маркера в ткани НМРЛ.

Материалы и методы. Проведён иммунофлуоресцентный анализ с использованием проточной цитофлуориметрии 60 образцов НМРЛ курящих мужчин (40 – аденокарцинома, 20 – плоскоклеточный рак). Первичные антитела к PGRMC1 (ab88381, Abcam), вторичные антитела к кроличьему IgG (FITC, ab6108, Abcam). Уровень экспрессии оценивали с помощью теста Колмогорова-Смирнова (программа FlowJo). Индексы экспрессии: высокий уровень – PGRMC1 отмечен в 20–50 % клеток, низкий – меньше чем в 20 % клеток.

Результаты. Экспрессия PGRMC1 выявлена в 70 % исследованных образцов. Высокий уровень (29,9±8,1 %) отмечен в 36 % опухолей, 67 % из которых составили аденокарциномы. Низкий уровень экспрессии PGRMC1 (14,8±2,4 %) выявлен в 64 % опухолей, 81 % из которых – плоскоклеточный рак. В ткани плоскоклеточного рака средний уровень экспрессии PGRMC1 составил 15 %, в аденокарциноме – в 1,7 раза выше (26 %, $p=0,013$). В ткани плоскоклеточного рака низкий уровень экспрессии PGRMC1 выявлен в 81 % случаев, высокий – только в 19 %. Напротив, в ткани аденокарциномы высокий маркера обнаружено в 67 %, а низкий – только в 33 %.

Вывод. PGRMC1 экспрессирован в ткани НМРЛ большинства курящих пациентов мужского пола, при этом уровень и частота экспрессии маркера выше в ткани аденокарциномы, чем в плоскоклеточном раке легкого.

Исследование поддержано грантами РФФИ (№ 13-04-01004-а, 12-04-00028-а).

Д.К. Огай, Г.Дж. Кутлиева, Ш.М. Миралимова, Н.А. Элова, С.Н. Наврузов, З.М. Еникеева

ИЗУЧЕНИЕ АНТИКАНЦЕРОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА *PROPIONIBACTERIUM AVIDUM 1* НА МЫШАХ *BALB/c*

Институт Микробиологии АНРУз, Республиканский Онкологический Научный Центр МЗ РУз, Ташкент, Узбекистан

Актуальность. В последние годы среди иммуномодулирующих средств особый интерес вызывают препараты микробного происхождения.

Цель исследования. Изучение антиканцерогенной активности местного штамма *Propionibacterium avidum 1* при внутрибрюшинном введении мышам линии *BALB/c* с привитой опухолью аденокарциномы толстой кишки.

Результаты. В опытной группе животных, которым вводили препарат, состоящий из мертвых клеток *Propionibacterium avidum 1* однократно за 6 дней до индукции опухоли в дозе 0,5 мг, на 7-й день после перевивки у всех животных появились опухоли, но с отставанием в размерах (средний объем составил 0,86 см, что по отношению к контролю достигало 54,45 %). На 19 день (время забоя) торможение роста опухоли (ТРО) составило 77,42 % (по массе) и 72,73 % (по объему). Поэтому индекс эффективности (ИЭ) по массе был равен 4,43, а по объему – 3,3, т.е. в среднем опухоли были в 2 раза меньше, чем в контроле. При введении препарата в дозе 1,0 мг однократно за 6 дней до индукции опухоли наблюдалось более заметное торможение опухолеобразования: на 7 день после перевивки только у 2 мышей появились опухоли, объемы которых в среднем составляли 0,104 см, тогда как в контрольной группе, в которой опухолеобразование отмечено у 7 мышей, средний размер опухолей в тот период достигал 1,888 см, что дало ТРО по объему на этот период 94,49 %. С увеличением времени эксперимента в опытной группе появились опухоли у других мышей, однако у 40 % мышей опухоль не перевилась. Таким образом, если рассчитывать эффект препарата по животным с появившейся опухолью, то ТРО равен 82,08 % (по массе) и 67,90 % (по объему). Противоопухолевое действие препарата подтверждается увеличением массы тела и селезенки, ростом экспрессии CD 16 рецепторов на естественных киллерных клетках (NK) более чем в 1,7 раза. Микробиологическое исследование гомогената печени показало обсеменение животных с индуцированной опухолью лактозонегативными кишечными палочками и клебсиеллами, в то время как после введения вакцинного штамма *Propionibacterium avidum 1* наблюдалась элиминация указанных бактерий.

Выводы. Таким образом, наибольшая степень регрессии аденокарциномы толстой кишки наблюдалась при введении 1,0 мг убитых клеток *Propionibacterium avidum 1* на мышь за 6 дней до индукции опухолеобразования.

Н.Д. Олтаржевская, М.А. Коровина

**НОВЫЕ БИОПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ «КОЛЕГЕЛЬ» И «КОЛЕТЕКС»
ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
В ХИМИО- И ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ**

ООО «Колетекс», Москва

Задачи исследования. Создание систем для направленной доставки лекарственных препаратов (ЛП), позволяющих максимально приблизить подводимый ЛП к очагу поражения.

Материалы и методы. Одним из вариантов создания систем для направленной доставки является использование гелевых полимерных композиций с импрегнированными в них ЛП или биологически активными веществами (БАВ). Компания ООО «Колетекс» разработала три разновидности полимерных материалов для пролонгированной направленной доставки ЛП: аппликации Колетекс, представляющие собой специальную объемную текстильную основу с нанесенным на поверхность слоем из гидрогелевого полимерного материала, содержащего ЛП; гидрогелевый материал Колегель (салфетка гидрогелевая Колетекс-гель) и высокоструктурированный гидрогелевый материал в форме диска – Колегель-диск. При их получении используются природные полимеры: соли альгиновой кислоты, хитозана, гиалуроновой кислоты и их смеси. Особенностью является технологическая возможность введения в полимерную композицию принципиально любых ЛП или их сочетаний, в т.ч. малорастворимых, в требуемых по медицинским показателям концентрациях.

Результаты и выводы. Максимально приближая лечебную гидрогелевую композицию к очагу поражения, что достигается путем наложения увлажненной салфетки Колетекс на поврежденное место, введением гидрогеля или диска Колегель в полости орофарингеально, ректально, вагинально (с помощью катетера, шприца, клизмы), удается за счет набухания и биодеградации полимера, из которого ЛП поступает во внешнюю среду, наличия градиента концентраций ЛП на границе полимерный материал – пораженный участок и средства используемого ЛП в т.ч. к опухолевым тканям, достичь высокой концентрации ЛП в поврежденных тканях при минимальном его содержании в здоровых органах, что позволяет снизить токсичность лечения и повысить его результат. Меняя состав и вязкостные характеристики полимерной композиции, степень сшивки полимера, и, соответственно, кинетику высвобождения ЛП, удается создавать материалы с заранее заданными по медицинским показаниям свойствами. Применение этих материалов в онкологии позволяет повысить регрессию опухоли и эффективность лучевого лечения, предотвратить развитие лучевых реакций, снизить степень повреждения здоровых тканей, увеличить подводимую дозу и проводить облучение без перерыва.

И.Н. Павлова¹, О.М. Конопацкова²

НУКЛЕИНАТ НАТРИЯ В ЛЕЧЕНИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

¹НУЗ ДКБ на ст. Саратов П ОАО РЖД, Саратов

²ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского МЗ России, Саратов

Цель исследования. Определить клинко-иммунологический эффект при применении нуклеината натрия в комплексном лечении больных раком молочной железы и меланомой

Материалы и методы. За период с 2008 по 2012 гг. обследовано 198 больных раком молочной железы и 36 пациентов с меланомой. У всех была метастатическая стадия и проведено комплексное лечение (полихимиотерапия, операция и иммунокоррекция). Группу сравнения составили 80 пациенток (54 и 26, соответственно), которым лечение проведено без иммунокоррекции. Преобладали больные старше 50 лет (74 %). Иммунологическое обследование проводилось до начала лечения, после трех курсов химиотерапии, через месяц после окончания лечения. Химиотерапия при раке молочной железы проводилась по схеме АС, при меланоме – CVD. Нуклеинат натрия назначали по 0,5мг 3 раза в день, в дни проведения химиотерапии.

Результаты. У всех больных перед началом лечения имелись изменения в системе гематологических, биохимических и иммунологических показателей ($p < 0,05$). Изменения в показателях иммунитета касались клеточного звена и затрагивали антителообразование. После проведения трех курсов химиотерапии снижение количества $CD3^+$ -клеток у больных, получавших иммунокоррекцию нуклеинатом натрия ($54,1 \pm 9,2$ в мкл), было не таким значительным, как у больных группы сравнения ($50,4 \pm 3,2$ в мкл). У всех было отмечено увеличение ЦИК. Через три месяца после проведенного лечения, во всех группах, где получали нуклеинат натрия, отмечалось достоверное повышение абсолютного числа $CD3^+$ -клеток ($60,6 \pm 9,0$ в мкл), тогда как у пациентов групп сравнения констатировано дальнейшее снижение уровня $CD3^+$ -клеток ($45,2 \pm 2,1$ в мкл). Тоже самое происходило и с относительными показателями уровня $CD3^+$ -клеток. В группе сравнения через три месяца после лечения относительный уровень $CD3^+$ -клеток снизился на 5–6 %, а у больных получивших препарат, он достиг исходного уровня и имел тенденцию роста до $55,1 \pm 2,11$ в мкл. Не отмечено зависимости показателей иммунитета от диагноза. Показатели качества жизни у больных, получавших нуклеинат натрия, не снижались.

Выводы. Назначение нуклеината натрия в комплексном лечении рака молочной железы и меланомы способствует уменьшению иммунодефицита и снижению побочных эффектов полихимиотерапии.

О.Г. Парахневич, Т.М. Ермоленко, Т.В. Трухачева

**ПРЕПАРАТ ДОЦЕТАКСЕЛ, КОНЦЕНТРАТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА
ДЛЯ ИНФУЗИЙ 20 МГ/МЛ, ПРОИЗВОДСТВА РУП «БЕЛМЕДПРЕПАРАТЫ»**

РУП «Белмедпрепараты», Минск, Беларусь

Задача исследования. Оптимизация технологии производства препарата на основе доцетаксела с целью улучшения стабильности готового лекарственного средства.

Материалы и методы. Препарат разработан на основе субстанции доцетаксела безводного, соответствующего по качеству требованиям Фармакопеи США, для контроля препарата использовались методы ВЭЖХ, ГЖХ, ТСХ, УФ-спектрофотометрии.

Результаты. Препараты на основе доцетаксела выпускаются в виде концентрата для инфузий в комплекте с растворителем (13% раствор этанола), который необходим для приготовления промежуточного раствора перед приготовлением перфузионного раствора. РУП «Белмедпрепараты» разработан состав препарата и технология производства, обеспечивающие стабильность лекарственной формы доцетаксела в одном флаконе (20 мг/1 мл, 40 мг/2 мл, 80 мг/4 мл). Использование препарата в такой форме удобно для применения медицинским персоналом в клинической практике, исключается стадия предварительного разведения растворителем концентрата доцетаксела. Разработанная схема получения очень технологична, позволяет получать препарат в постоянном диапазоне pH 3,4 +0,2 при отсутствии стадии доведения pH. Результаты проведенных исследований подтвердили исключительную стабильность разработанного препарата при хранении в температурных режимах 2–8 °С и 25±2 °С на протяжении срока наблюдения 2 года. Оценка качества препарата проводилась по основным показателям: идентификация (УФ-спектрофотометрия, ВЭЖХ, ТСХ), прозрачность, цветность, pH, вода, сопутствующие примеси и количественное определение (ВЭЖХ), стерильность, этанол (ГЖХ). Кроме того, были проведены исследования по изучению стабильности перфузионных растворов на основе разработанного препарата. Перфузионный раствор, приготовленный в 0,9% растворе натрия хлорида с концентрацией доцетаксела 0,74 мг/мл, оставался стабильным (начало образования осадка) в течение 8 час.

Выводы. Оптимизирована технология получения и разработана стабильная форма препарата Доцетаксел, концентрат для инфузий 20 мг/мл. Препарат выпускается в одном флаконе (1,2 и 4 мл) характеризуется улучшенным качеством и удобством применения в клинической практике.

С.Г. Пашкевич¹, Л.Н. Николаевич¹, А.А. Денисов¹, И.В. Залуцкий¹, С.М. Адекенов²

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА «АРГЛАБИН»

НА МЕЖНЕЙРОННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ГИППОКАМPE КРЫС

¹Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

²Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Казахстан

Актуальность. Изменение функционального состояния клеточных популяций гиппокампа отражается на физиологических настройках гиппокамп-гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Известный механизм «программирования» в этой системе дает возможность фитохимически или фармацевтически корректировать различные заболевания [Rot M. et al., 2009]. Установленные противоопухолевые, иммуномодулирующие и радиосенсибилизирующие свойства препарата «Арглабин» позволили предположить возможность расширения спектра его применения для терапии онкологических заболеваний центральной нервной системы.

Задача исследования. Оценить влияние перфузии противоопухолевого препарата «Арглабин» в дозах (0,2–0,002 мг/мл) на амплитудно-временные характеристики популяций нормальных нервных клеток гиппокампа крыс.

Материалы и методы. Применяли электрофизиологический метод регистрации вызванных потенциалов переживающих срезов гиппокампа 3–4 недельных крысят.

Результаты. Перфузия препарата «Арглабин» в концентрации 0,2 мг/мл приводила к синхронной блокаде вызванных ответов нейронов гиппокампа и синхронному их восстановлению в среднем через 40 мин. Снижение концентрации препарата «Арглабин» в перфузируемой жидкости до 0,02 мг/мл вызывало рассогласование амплитуд входящих и исходящих сигналов в популяции клеток гиппокампа, проявляющееся в увеличении амплитуды популяционных спайков при одновременном снижении амплитуды, возбуждающих постсинаптических потенциалов. В дозе 0,002 мг/мл препарат «Арглабин» оказывал преимущественное влияние на постсинаптический уровень формирования электрического сигнала, но не на пресинаптические механизмы.

Выводы. Таким образом, установлено, что противоопухолевый препарат «Арглабин» – может влиять на процессы генерации электрической активности нейронами гиппокампа.

Н.А. Плужникова, А.Ю. Карпенко, М.В. Киселевский

ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОРОДЗАВИСИМОГО КИЛЛИНГА ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ПАЦИЕНТОВ В ПЕРИОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

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

Актуальность. В условиях бактериемии (токсемии) эффекторы врожденного иммунитета обеспечивают естественную резистентность организма. В тоже время их чрезмерная активация приводит к развитию системной воспалительной реакции, лежащей в основе патогенеза сепсиса.

Цель исследования. Оценка функциональной активности фагоцитов крови онкологических больных с и без гнойно-септических осложнений в периоперационном периоде.

Материалы и методы. Исследовали образцы крови больных раком ЖКТ Па–IIIb ст. Забор крови проводили до операции (1 этап), во время операции (вскрытие брюшной полости, рассечение стенок ЖКТ, наложение кожных швов – 2–4 этапы соответственно), а также на 1, 3 и 5 сутки после операции (5–7 этапы соответственно). Выделяли 2 группы больных: с гнойно-септическими осложнениями в послеоперационном периоде и без таковых. Оценка функциональной активности нейтрофилов проводили с помощью **теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ)** в двух вариантах: базальном и стимулированном. Для удобства представления полученных результатов использовали показатель разницы (Δ НСТ)=НСТ (стимулированный) – НСТ (базальный).

Результаты: исследование показателей Δ НСТ-тестов до операции в обеих группах пациентов не позволило выявить достоверных отличий ($p=0,34$). При изучении метаболического звена фагоцитоза нейтрофилов крови у пациентов без осложнений на начальном этапе операции выявлено незначительное увеличение разницы исследуемых параметров. К 5-м суткам после операции у данных пациентов отмечали нормализацию метаболической активности гранулоцитов ($p>0,05$), Δ НСТ-тестов находилась в пределах – 0,34–0,69 у.е. Анализ показателей НСТ-тестов у пациентов с осложнениями показал незначительное повышение данного показателя на всем протяжении хирургического вмешательства. Весь ранний послеоперационный период у данных больных характеризовался тенденцией снижения исследуемого показателя, достигая к 5-м суткам минимальных значений – 0,105 (0,07–0,35) у.е. ($p=0,0047$).

Выводы. У больных с гнойно-септическими осложнениями нейтрофилы изначально имеют повышенный уровень активности кислородзависимых механизмов фагоцитоза. Во время операции и в раннем послеоперационном периоде уровень базальной активности нейтрофилов возрастает, а показатель Δ НСТ снижается, свидетельствуя об истощении запасов ферментативных систем у данной категории пациентов.

П.Б. Попов

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НЕДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

Специализированная клиника лазерной и фотодинамической терапии, Краснодар

Цель исследования. В представленной работе обобщены данные длительного наблюдения за 307 больными недиссеминированной меланомой кожи T1-T4, получившими в качестве единственного лечения ФДТ по оригинальной методике. Все диагнозы были морфологически верифицированы.

Материалы и методы. Оценка результатов лечения проводилась путем сравнения с прогностически однородными группами пациентов получивших стандартное хирургическое или комбинированное лечение. Максимальные сроки наблюдения составили 10 лет, в среднем 5-6 лет.

Результаты. Полной резорбции первичной опухоли удалось добиться у всех пациентов. Заживление дефекта происходило под струпом с образованием мягкого рубца, даже на месте очень протяженных опухолей. Ни в одном случае не отмечено локального рецидива в области рубца, тогда как в группе сравнения локальные рецидивы наблюдались у 8 % пациентов. Пятилетняя выживаемость при толщине опухоли до 4 мм – 91,0 %, в группе сравнения 83,6 %, свыше 4 мм – 57 % и 47,6 % соответственно. Десятилетняя выживаемость при толщине опухоли до 2 мм в группе наблюдения составила 91,6 %, в группе сравнения 88,9 %, от 2 до 4мм – 66,3 % против 59,8 % в группе сравнения, более 4мм – 49,5 % против 37,1 % в группе сравнения.

Выводы. ФДТ при первичной недиссеминированной меланоме кожи является высокоэффективным методом лечения, предупреждающим развитие локальных рецидивов заболевания, даже у пациентов с неблагоприятными морфологическими характеристиками первичной опухоли, что улучшает отдаленные результаты лечения. Более высокая эффективность ФДТ в сравнении с хирургическим лечением, по-видимому, связана с иммунным ответом на антигены в опухолевом лизате. В отличие от широкого иссечения, ФДТ не требует сложных методик пластического закрытия дефектов, позволяет отказаться от ампутаций при акральной локализации меланом. Применение ФДТ при первичной меланоме кожи позволяет проводить лечение в амбулаторном режиме, что положительно сказывается на качестве жизни пациентов и значительно снижает затраты на лечение и реабилитацию.

*И.Р. Просалкова, Ю.М. Букреев, Н.К. Власенкова, А.Б. Капитанов,
С.А. Коростелев, В.В. Решетникова, А.В. Сергеев*

БИОДОСТУПНОСТЬ КАРОТИН-СОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ

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

Актуальность. Каротин-содержащие препараты (КСП) «Бетаск» (БТ), «Каскатол» (КАС), «Каскорутол» (КСР) разработаны нами совместно с фирмой ЗАО «Холдинг – «ЭДАС» и поступили в аптечную сеть. Каротин-токофероловый комплекс (КТК) плодов шиповника и препарат «Томатол» из томатов фирмы ООО «Инвест» получены по оригинальным методикам с помощью органических растворителей.

Цель исследования. Изучение биодоступности разработанных нами препаратов у различных видов лабораторных животных и у человека.

Материалы и методы. БТ содержит бета-каротин (БК) и аскорбиновую кислоту (АК), соответственно 2,5 и 12,5 мг в одном драже, КАС (БК, АК и витамин Е – 2,5, 12,5 и 25 мг), КСР (БК, АК, Е и рутин – 2,5, 25, 75 и 9,0 мг). КТК содержит БК, кантаксантин, ликопин (ЛП) и токоферол, соответственно 160, 27, 76 и 85 мг/%. ТОЛ содержит ЛП и БК – 250 и 40 мг/%. Определение каротиноидов в препаратах и в плазме крови животных и человека проводили, после экстракции гексаном с помощью ВЭЖХ, по ранее описанным методикам на хроматографах «Spectra Physics 8000» и «Perkin Elmer Nelson Mod. 1020».

Результаты. Однократное пероральное введение КТК в дозе 30 мг/кг мышам СВА приводило к повышению уровня БК в плазме крови через 30 и 60 мин до 15–25 мкг/100 мл с постепенным снижением концентрации в течение последующих 3 суток. Синтетический БК в аналогичной дозе не вызывал изменений в содержании провитамина в плазме крови. После введения КТК крысам в дозе 30 мг/кг максимальное содержание БК в плазме определялось через 1,5 ч и равнялось 8–10 мкг/100 мл и сохранялось в отличие от синтетического БК в течение 72 часов. Величины площади под фармакокинетической кривой «концентрация-время», вычисленные для интервала 0–48 ч, оказались одинаковыми для КТК и синтетического БК (27,18 и 27,1 мкг/100мл). Курсовое введение мышам и крысам БТ, КТК, ТОЛ и КАС в различных дозах в течение 2 недель приводило через 4–6 дней к значительному повышению (до 25–55 мкг/100 мл) уровню БК и ЛП в плазме крови и в ткани печени. Курсовое пероральное введение собакам КТК, КАС и ТОЛ в дозе 100 мг/кг приводило к повышению уровня каротиноидов в плазме крови до 25–35 мкг/100 мл через 4–6 дней. Систематический прием БТ и КАС в дозах 30 и 60 мг в течение 10–14 дней пациентами с опухолями толстой кишки в предоперационном периоде приводил к повышению уровня БК в плазме крови. Длительный прием КАС и КСР добровольцами в группах онкологического риска («злостные» курильщики, женщины с мастопатиями и др.) приводил к значительному повышению уровня БК в плазме крови.

Выводы. Биодоступность разработанных нами препаратов БТ, КТК, КАС, КСР и ТОЛ практически не отличается от биодоступности кристаллических БК и ЛП и зависит от дозы и продолжительности приема лекарственных средств.

Р.Б. Пугачева¹, Л.В. Гончаренко², Г.Н. Апрышко¹

ПРИНЦИПЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ СТРУКТУРНЫХ ФОРМУЛ

ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В БАЗЕ ДАННЫХ

ПО ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ВЕЩЕСТВАМ

ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КОМПЬЮТЕРНЫХ АНАЛИТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

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

²ВИНИТИ РАН, Москва

Задачи исследования. Разработать принципы стандартизации представления пространственных структур соединений в Базе данных «Противоопухолевые отечественные вещества, изученные в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН» для их использования в исследованиях связи структура-активность и для компьютерного расчета ряда физико-химических показателей, имеющих значение для «лекарствоподобия».

Материалы и методы. 10 000 структурных формул индивидуальных химических соединений из Базы данных. Программные средства ISISBase, ISISDraw, ACDLab, PASS.

Результаты. Опыт по вводу, редактированию и использованию структурных формул из Базы данных позволил выработать ряд правил их нормализованного представления, максимально адекватного дальнейшей компьютерной обработке. Первая и достаточно простая процедура – удаление из поля химической структуры любых символов, не являющихся обозначениями атомов и химических связей, например, буквенных обозначений химических групп (Me, Et, Bz и т.д.) и пояснительных текстовых вставок (цис-, транс-, син-, анти-, трео-, эритро и т.д.), удаление противоионов и нейтральных компонентов в отдельное поле, нейтрализация зарядов на основных или кислотных группах с помощью возврата протона донорному компоненту. Более сложная задача – единообразное и правильное представление структурных формул координационных соединений металлов, поскольку используемый химический структурный редактор ISIS Draw не позволяет представить донорно-акцепторные (координационные) связи без искажения суммарной брутто-формулы. Испробовав несколько вариантов, мы остановились на способе представления донорно-акцепторной связи как ковалентной с одновременным формальным изменением валентности центрального атома (координационного центра).

Выводы. Выбранный способ нормализации структурных формул отображает все химические связи в молекуле, не приводит к искажению брутто-формулы и позволяет использовать такие структурные формулы для компьютерных расчетов.

В.А. Пурцхванидзе, О.Ю. Сафонова

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ПРЕДРАКОВЫХ И ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ И ВУЛЬВЫ

Медицинский центр высоких технологий «ЛазерВита», Москва

Актуальность. Рак шейки матки и вульвы занимают в структуре онкологической заболеваемости женщин третье и четвертое место после рака молочной железы и рака матки. Рак шейки матки развивается чаще у женщин репродуктивного возраста в результате заражения высокоонкогенным вирусом папилломы человека, и страдающих предраковыми заболеваниями шейки матки. Рак вульвы, как правило, возникает у женщин в постменопаузе. Предраковыми заболеваниями являются крауроз и лейкоплакия вульвы, которые возникают на фоне дистрофических изменений кожи вульвы.

Задача исследования. Оценка эффективности фотодинамической терапии (ФДТ) предраковых и онкологических заболеваний шейки матки и вульвы.

Материалы и методы. Под нашим наблюдением находилось 178 женщин в возрасте от 18 до 85 лет с предраковыми заболеваниями шейки матки и вульвы и начальными стадиями рака шейки матки и вульвы. Всем пациенткам проводилась фотодинамическая терапия с внутривенным введением фотодитазина и радахлорина из расчёта 0,6-0,8 мг/кг. Лекарственно-световой интервал составлял 3 часа. ФДТ проводилась в сочетании с флюоресцентной диагностикой с использованием лазерного оборудования «Биоспек» и «Эломед». При ФДТ шейки матки использовался световод с прямым торцом и с рассеивающим диффузором. Плотность мощности составляла от 150 до 300 Дж/см² в зависимости от характера заболевания. При ФДТ вульвы использовался световод с прямым торцом. Плотность мощности составила от 100 до 300 Дж/см² в зависимости от характера заболевания.

Результаты и выводы. ФДТ предраковых заболеваний и рака шейки матки и вульвы является высокоэффективным и органосохраняющим методом лечения. Характер лечения щадящий, без формирования рубца с сохранением анатомо-функциональной целостности шейки матки, архитектоники цервикального канала, что немаловажно для пациенток репродуктивного возраста.

Ю.А. Рагулин, М.А. Каплан, В.Н. Медведев, В.Н. Капицус, В.В. Петерс

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ ЭНДОБРОНХИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ

ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава РФ, Обнинск

Задачи исследования. Оценить непосредственные и отдаленные клинические, эндоскопические и рентгенологические результаты фотодинамической терапии (ФДТ) у больных со злокачественными эндобронхиальными опухолями.

Материалы и методы. В клинике МРНЦ проведена ФДТ 73 больным со злокачественными опухолями трахеи и бронхов. За 2 часа до процедуры больным внутривенно капельно вводился фотосенсибилизатор хлоринового ряда (Фотолон, Фотодитазин).

Результаты. В качестве оценки проведенного лечения использовали данные бронхоскопии, спирометрии, рентгенологическую картину, а также динамику жалоб больных. При бронхоскопии через 5–7 дней у 18 (24,6 %) больных отмечался поверхностный некроз опухоли, у 52 (71 %) глубокий некроз опухоли, у 3 больных реакции со стороны опухолевой ткани не наблюдалось. При этом же исследовании, выполненном через месяц после ФДТ, у 45 (61,6 %) выявлена полная регрессия экзофитного компонента опухоли, у 25 (34,2 %) отмечалось уменьшение опухолевого очага, у 3 больных уменьшения опухоли не выявлено. Клинически реализация эффекта фотодинамической терапии проявлялась в полном прекращении кровохарканья у 72 % больных, уменьшение кашля отметило 55,3 % больных, уменьшение одышки – 44,7 % больных, имевших данные симптомы. При рентгенографии у 52 больных до ФДТ были выявлены выраженные вентиляционные нарушения в виде ателектаза или гиповентиляции, через 1–1,5 месяца после лечения положительная рентгенологическая динамика в виде разрешения ателектаза и уменьшения вентиляционных нарушений отмечалась у 75,2% пациентов. Медиана выживаемости больных III стадией при использовании ФДТ перед лучевой терапией составила 15,4 месяца, в то время как в группе ЛТ (без ФДТ) – 13,2 месяца. 1, 2 и 3-летняя выживаемость составила 42,3 % и 37 %, 15,4 % и 11,1 %, 7,7 % и 3,7 % соответственно.

Выводы. ФДТ с препаратами хлоринового ряда обладает высокой эффективностью в лечении эндобронхиальных опухолей, позволяя восстанавливать бронхиальную проходимость, уменьшить выраженность вентиляционных нарушений и симптомов заболевания. Использование ФДТ перед лучевой терапией у больных с опухолевым стенозом крупных бронхов позволяет улучшить результаты консервативного лечения, демонстрируя увеличение показателей выживаемости.

Э.Н. Рамазанов, А.С. Толстокозов, С.А. Дергунова, А.С. Волчков

ОРГАНСОХРАНЯЮЩИЕ ОПЕРАЦИИ В ЛЕЧЕНИИ РАКА ЛЕГКОГО

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов

Актуальность. Сложность хирургического лечения рака легкого у больных пожилого и старческого возраста обусловлена не только стадией заболевания, но и сопутствующими заболеваниями.

Задачи исследования. Улучшение непосредственных и отдаленных результатов хирургического лечения рака легкого путем применения новых оперативных методов.

Материалы и методы. Проведен анализ лечения 208 больных раком легкого в возрасте 60 лет и старше. Для оценки распространенности процесса выполняли рентгенологическое и КТ исследование органов груди, бронхоскопию с биопсией материала, УЗИ брюшной полости и забрюшинного пространства, МРТ головного мозга, спирографию, ЭКГ и ЭХО-КТ. Легочную гипертензию оценивали путем измерения давления в легочной артерии.

Результаты. Периферический рак диагностирован у 48 % больных, центральный – у 52 %. Выраженные нарушения вентиляционной функции легких были выявлены у 178 (85,5 %). Снизить объем операций при центральных опухолях возможно путем выполнения бронхопластических операций с сохранением функционально полноценной легочной ткани, при периферических опухолях – типичных сегментарных резекций легкого с тщательной лимфаденэктомией средостения и корня легкого. Эти операции выполняются с соблюдением бронхо-, ангио- и лимфоархитектоники легкого, принципов зональности и футлярности. Бронхопластические операции на главных бронхах и трахеи должны проводиться по строгим показаниям. Максимальная ширина основания клина (наибольшее расстояние между проксимальным и дистальным краями резекции бронха) должна быть не более 3,5–4 см. При большом расстоянии наложение анастомоза нецелесообразно из-за натяжения швов. Бронхопластические операции выполнены у 22 больных с центральным раком. В результате пластики бронхов выполнили лоб- или билобэктомии вместо предполагаемой пневмонэктомии. При периферических опухолях небольших размеров выполнили 48 типичных сегментарных резекций. Послеоперационные осложнения отмечены у 19 % больных, что гораздо ниже, чем после стандартных операций. Летальных исходов не было.

Выводы. У больных с ограниченными функциональными резервами при благоприятных анатомических условиях возможно выполнение сегментарных резекций при периферическом раке и бронхопластических операций – при центральной бронхокарциноме.

Н.Я. Рапопорт

НАПРАВЛЕННЫЙ ТАРГЕТИНГ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ В ПОЛИМЕРНЫХ МИЦЕЛЛАХ И НАНОЭМУЛЬСИЯХ: МИФЫ И РЕАЛЬНОСТЬ

Университет штата Юта, США

Среди наночастиц, используемых для направленной доставки лекарств, липосомы и полимерные мицеллы являются наиболее изученными. Липосомы вошли в клиническую практику, а мицеллы до настоящего времени в клинике не используются, хотя обладают комплексом полезных свойств: позволяют избежать использования токсических растворителей, могут в тысячи раз увеличить растворимость активных соединений, отвергнутых из-за низкой растворимости, теоретически могут обеспечить таргетинг в опухоль. Доклинические испытания некоторых мицеллярных формуляций на животных показали отличные результаты. Однако только две мицеллярных формуляции (одна с адриамицином, другая с паклитакселом) достигли клинических испытаний, которые дали разочаровывающие результаты: время циркуляции и биораспределение мицеллярно-инкапсулированных лекарственных средств мало отличались от таковых при введении лекарства в растворе, то есть таргетинг отсутствовал. Единственным серьезным преимуществом мицеллярной доставки было отсутствие остротоксичных органических растворителей. В настоящем докладе будут обсуждены возможные причины отсутствия эффективного таргетинга при мицеллярной доставке и пути преодоления этой проблемы.

Прижизненный имаджинг с помощью специального флуоресцентного микроскопа был применен для изучения биораспределения флуоресцентно-меченного паклитаксела (Ф-ПКТ) путем визуализации его циркуляции и экстравазации в нормальные ткани и в опухоль поджелудочной железы мышей. Ф-ПКТ был инкапсулирован в мицеллах или приготовленных на их основе наноэмульсиях. Полученные путем имаджинга результаты коррелировали с гематотоксичностью паклитаксела, инкапсулированного в полимерных мицеллах или наноэмульсиях. Мицеллярно-инкапсулированный Ф-ПКТ полностью переходил из сосудов в окружающие ткани (нормальные ткани бедра или опухоль) в течение 20 минут. Ф-ПКТ в нанокляпках оставался в кровотоке длительное время (часы). Его экстравазация в опухоль была ускорена сфокусированным на опухоль ультразвуком.

В.М. Ржезников¹, З.С. Смирнова², В.Н. Толкачев²,
К.А. Широких², Е.В. Одинцова³, Т.А. Федотчева³, Н.Л. Шимановский³

ЦИТОСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

НОВОГО АНТИЭСТРОГЕНЦИТОСТАТИКА ЦИТЕСТРОЛ АЦЕТАТА

¹Эндокринологический научный центр Минздрава России, Москва

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва

³Российский Национальный Исследовательский Медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва

Актуальность. Создание гормональных препаратов, обладающих противоопухолевой активностью, является приоритетной задачей отечественной фармакологии. Одним из препаратов выбора в лечении гормонозависимых опухолей женской половой сферы является Тамоксифен. Однако, ограничениями его эффективности являются отсутствие в 10-40% эстрогеновых рецепторов в опухоли и возникновение резистентности. В результате совместной РОНЦ им. Н.Н.Блохина и ЭНЦ РАМН разработки получен новый таргетный препарат – антиэстрогенцитостатик Цитестрол ацетат (ЦА), в структуре которого антиэстрогенный компонент ассоциирован с бис-β-хлорэтиламиновой группировкой. Присоединение антигормона к алкилирующей группе приводит к увеличению его накопления в опухоли за счет взаимодействия с гормональными рецепторами.

Задачи исследования. Изучить действие ЦА на жизнеспособность опухолевых клеток HeLa, MCF-7/WT и MCF-7/R и его способность усиливать действие других цитостатиков.

Материалы и методы. Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия), по четыре эксперимента на точку. IC₅₀ определяли с помощью программы GraphPrism6. ЦА и Тамоксифен (ТАМ) (Sigma, США) разводили в 96% этаноле и диметилсульфоксиде в пропорции (1:1), Этопозид (ЭТОП) (Тева, Нидерланды) и Доксорубицин (ДОКС) (Тева, Нидерланды) – в среде DMEM.

Результаты. В клетках HeLa, MCF-7/WT и MCF-7/R IC₅₀ для ЦА составили 1,6*10⁻⁴М, 2,6*10⁻⁴М и 10⁻⁷М соответственно, тогда как для ТАМ – 0,5*10⁻⁴М, 2,2*10⁻⁴М и 4*10⁻⁶М. При исследовании совместного действия ЦА и цитостатиков ДОКС и ЭТОП была выявлено увеличение их цитостатического действия в отношении резистентных клеток. Так, в комбинации с ДОКС, ЦА усиливал его действие более чем в 3 раза. В клетках HeLa ЦА также усиливал цитостатическое действие ЭТОП в 2 раза, тогда как препарат сравнения ТАМ не влиял на цитостатический эффект ЭТОП.

Выводы. В резистентных к ДОКС клетках (MCF-7/R), ЦА превосходит по цитостатическому эффекту ТАМ и значительно повышает эффективность ЭТОП и ДОКС.

Т.А. Розен, В.Г. Трибулович, А.В. Гарабаджия

МОДИФИКАЦИЯ СУЩЕСТВУЮЩИХ ИНГИБИТОРОВ MDM2 С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ИХ СПОСОБНОСТИ ПРЕОДОЛЕВАТЬ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

НИЛ «Молекулярная фармакология», Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет)

Актуальность. Частым осложнением при развитии онкологических заболеваний различной локализации является метастазирование в мозг. В настоящее время для борьбы с метастазами наиболее широко применяют сочетание хирургического лечения и облучения. Химиотерапия метастазов обычно не имеет успеха, что связано, в том числе, с наличием гемато-энцефалического барьера, который предотвращает попадание лекарственного препарата в мозг.

Задачи исследования. Химическая модификация класса изоиндолинонов с целью повысить их способность преодолевать гемато-энцефалический барьер. Эти соединения обладают сродством к р53-связывающему участку Е3-лигазы MDM2, за счет чего ингибируют взаимодействие р53-MDM2 и вызывают повышение в клетке уровня проапоптотического белка р53, что, в конечном итоге, приводит к гибели раковой клетки.

Материалы и методы. Нами был проведен виртуальный скрининг ряда производных изоиндолинона схожего строения, в составе которых варьировался только один заместитель – в молекулу вводили группы, предположительно повышающие способность преодолевать гемато-энцефалический барьер. Оценивалась прочность связывания этих соединений с р53-связывающим участком MDM2. Соединения, наилучшим образом ингибировавшие взаимодействие белков, были синтезированы в нашей лаборатории, и подвергнуты высокоэффективному скринингу для подтверждения результатов, полученных in silico, кроме того, их способность преодолевать гемато-энцефалический барьер была оценена при помощи метода РАМРА, основанного на использовании искусственных липидных мембран заданного состава.

Результаты и выводы. По результатам виртуального скрининга для последующей работы были отобраны десять соединений. В ходе высокоэффективного скрининга все эти вещества в той или иной мере способствовали апоптозу клеток по р53-зависимому механизму, кроме того, несколько веществ обладали значительно более высокой способностью преодолевать липидные мембраны, чем исходное вещество.

Т.Г. Руденко¹, А.Б. Шехтер¹, Н.А. Аксенова², Н.Н. Глаголев², А.В. Иванов³, А.Б. Соловьева²

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА ПРИ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С КОМПЛЕКСАМИ ФОТОДИТАЗИН – ПОЛИМЕР

¹Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва,

²ФГБУН «Институт химической физики им. Н.Н. Семенова» РАН, Москва,

³ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, Москва

Актуальность. Развитие технологии ФДТ связывают с созданием новых лекарственных форм фотосенсибилизаторов (ФС), которые могли бы обеспечить их высокую биодоступность и уменьшить неспецифическую токсичность. В частности, для решения этой задачи предлагается применять для ФДТ комплексы ФС с амфифильными полимерами (АП) различной природы, которые хорошо зарекомендовали себя при лечении различной раневой патологии.

Цель исследования. Экспериментально-морфологическое изучение особенностей ранней стадии раневого процесса при ФДТ с использованием ФС «Фотодитазин» и его комплексов с АП различной природы.

Материалы и методы. В эксперименте на белых крысах-самцах воспроизводили стандартную модель полнослойной плоскостной раны кожи, 7 групп по 3 особи. На следующие сутки после создания дефектов кожи в дно ран животных экспериментальных групп инъекционно вводили одну из шести субстанций (изотонический раствор хлорида натрия, водный раствор «Фотодитазина», водные растворы АП – поливинилпирролидона (ПВП) или плуроника F127 (F127), либо комплексы «Фотодитазина» с ПВП или F127); у животных контрольной группы раны оставляли без лечения. Лазерное облучение раны (аппарат «Аткус-4», 661 нм) проводили через 15 минут после инъекции. На 3 сутки после нанесения раны процедуру повторяли. В течение 4 суток после создания ран проводили клинические наблюдения, а на 4 сутки животных усыпляли и направляли иссеченные фрагменты тканей ран на морфологическое исследование, при котором изучали строение раневого ложа и особенности воспалительных и репаративных реакций в разных группах; Гистологические характеристики ран оценивали полуколичественно, а результаты балльной оценки морфологических признаков анализировали статистически с использованием стандартного пакета программ SPSS for Windows 13.0.

Результаты и выводы. Выявленные клинико-морфологические особенности течения ранней стадии раневого процесса позволяют сделать вывод о том, что комплексы «Фотодитазина» с АП способствуют ослаблению воспалительных и усилению репаративных процессов в ранах и могут быть рекомендованы для клинического изучения.

Т.А. Савельева¹, В.Б. Лощенов¹, С.А. Горяйнов², А.А. Потапов²

ОДНОВРЕМЕННЫЙ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТОПОРФИРИНА IX И ГЕМОГЛОБИНА В НЕРВНЫХ ТКАНЯХ С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ТОЧНОСТИ ИНТРАОПЕРАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКИ

¹ФБГУН Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва

²ФБГУ НИИ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко РАМН, Москва

Актуальность. Инфильтративный рост глиальных опухолей обусловил широкий интерес к различным способам интраоперационной демаркации их границ. В связи с этим активно развивается такое направление интраоперационной диагностики, как оптическая биопсия.

Задачи исследования. В данной работе предложен метод спектроскопического анализа биологических тканей с одновременным количественным определением таких маркеров опухолевых изменений, как кровенаполнение, уровень оксигенации гемоглобина, накопление Пп IX и изменение рассеивающих свойств.

Материалы и методы. Метод основан на разделении видимого диапазона спектра на 3 канала – регистрации спектра диффузного отражения широкополосного и лазерного излучения и канал регистрации спектра флуоресценции. В работе приведены результаты верификации алгоритма на оптических фантомах и примеры интраоперационного анализа распределения исследуемых маркеров.

Результаты. Метод показал повышение чувствительности по сравнению с методом видеофлуоресцентной визуализации с использованием микроскопа Zeiss OPMI Pentero с 78 % до 96 %, специфичности – с 60 % до 82 %.

Е.В. Санарова¹, А.В. Ланцова¹, Л.Л. Николаева¹, А.П. Ползкова¹,
О.Л. Орлова¹, Н.А. Оборотова¹, В.В. Мусияк², Г.Л. Левит², В.П. Краснов²

ИЗУЧЕНИЕ РАСТВОРИМОСТИ НОВОГО СОЕДИНЕНИЯ ИЗ КЛАССА НИТРОЗОАЛКИЛМОЧЕВИНЫ С ЦЕЛЮ СОЗДАНИЯ ИНЪЕКЦИОННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ

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

²Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

Актуальность. Характерным свойством противоопухолевых препаратов, производных нитрозоалкилмочевин (НАМ), является гидролитический распад в условиях организма с образованием алкилирующих и карбамоилирующих частиц, а также отсутствие перекрестной резистентности с типичными алкилирующими агентами. В связи с этим поиск новых активных соединений в ряду производных НАМ связан с попытками расширить спектр их противоопухолевого действия, снизить побочные и токсические эффекты, увеличить избирательность противоопухолевого действия. С этой целью в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского (г. Екатеринбург) синтезировано новое соединение из класса НАМ – OR-2011, которое проходит доклинические исследования в НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН.

Задача исследования. Изучить растворимость субстанции OR-2011 в различных соразтворителях, разрешенных для инъекционного применения.

Материалы и методы. Так как субстанция OR-2011 умеренно растворима в воде, для повышения растворимости использовали различные соразтворители, разрешенные для применения в инъекционных лекарственных формах, в следующих концентрациях – 5% раствор маннита (Химмед, Россия), 6% растворы Kollidon 17 PF и Kollidon 12 PF (BASF, Германия), 2% раствор декстрана 70000 (Sigma-Aldrich GmbH, Германия), 10% растворы ПЭГ-1500 (Химмед, Россия) и Kollisol PEG-400 (BASF, Германия). Растворимость субстанции определяли визуально при температуре (20 ± 2 °С) и выражали в процентном соотношении (ГФ XII, ОФС 42-0049-07).

Результаты и выводы. В результате проведенных исследований установили, что повышение растворимости субстанции OR-2011 более чем в 1,5 раза обеспечивает добавление таких высокомолекулярных веществ как маннит, Kollidon 17 PF, декстран 70000. Применение многокомпонентных соразтворителей не обеспечивало значительного увеличения растворимости, так же как и повышение концентрации солюбилизаторов.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 13411.1008799.13.163 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства класса нитрозомочевин».

Н.С. Сапрыкина¹, М.А. Барышников¹, В.А.Краснов²,
Г.Л. Левит², А.В. Ланцова¹, Е.В. Санарова¹, Н.А. Оборотова¹, А.Ю. Барышников¹

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЯ OR-2011 НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ МЕЛАНОМАХ МЫШЕЙ

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

²Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

Задачи исследования. Оценить противоопухолевую активность нового оригинального соединения OR-2011 на перевиваемых опухолях мышей.

Материалы и методы. Исследование выполнено на мышах линии DBA/2 и гибридах BDF1 (C57Bl/6 × DBA/2). Животным подкожно прививались меланома B16, высокометастазирующая меланома B16-F 10 и меланома Клаудмана клон М3. Субстанцию OR-2011, синтезированную в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН вводили животным с меланомой B16 однократно, внутривенно на 10 сутки опыта в дозах 150–225 мг/кг, мышам с меланомой М3 однократно, внутривенно на 2 сутки опыта в дозах 150–175 мг/кг. Лекарственная форма OR-2011 в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций разработана в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН. Лекарственную форму OR-2011 вводили мышам с меланомой B16-F10 однократно, внутривенно на 2 сутки опыта в дозах 100–200 мг/кг. Терапевтический эффект оценивали по торможению роста опухоли (ТРО, %) и увеличению продолжительности жизни животных (УПЖ, %) по отношению к контролю.

Результаты. Прививаемость опухоли мышам для всех меланом была 100%. В контрольной группе у мышей с М3 кинетика роста подкожных опухолевых узлов и продолжительность их жизни соответствовала таковой по данным других исследователей. Животные с М3, леченные OR-2011, были свободны от опухоли. OR-2011 значительно (ТРО 59–96 %) и продолжительно тормозил рост меланомы B16 и значимо увеличивал продолжительность жизни опухоленосителей (УПЖ 31–61 %). Лекарственная форма OR-2011 вызывала у мышей с меланомой B16-F10 значительное удлинение латентного времени развития опухоли и продолжительное торможение роста опухоли (ТРО 55–100 %).

Выводы. Выявлена высокая противоопухолевая активность OR-2011 на перевиваемых меланомах с различной чувствительностью к препаратам. Это позволяет рекомендовать OR-2011 для дальнейших исследований с целью создания нового антимеланомного препарата.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта 13411.1008799.13.163 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства класса нитрозомочевин».

С.А. Сасов, В.В. Решетникова, Н.Н. Тотова, В.Н. Толкачев

МАКРОЦИКЛИЧЕСКИЕ ГИДРОЛИЗУЕМЫЕ ТАННИНЫ

CHAMAENERION ANGUSTIFOLIUM (L.) (ИВАН ЧАЙ): ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

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

Актуальность. Изучению олигомерных макроциклических гидролизуемых таннинов в настоящее время уделяется большое внимание. Противоопухолевые свойства этих соединений исследованы как в культурах клеток, так и в экспериментах на животных. Экспериментально показано, что таннины кипрея узколистного (*Chamaenerion angustifolium* (L.)) обладают противоопухолевым действием на животных с перевиваемыми опухолями. На их основе разработан препарат ханерол, обладающий активностью против ряда солидных опухолей.

Материалы и методы. Димерный макроциклический гидролизуемый таннин хаменерин I (Oenothetin B) и тримерный макроциклический таннин хаменерин II (Oenothetin A) являются главными компонентами противоопухолевого препарата ханерол, выделяемого из цветков иван-чая (*Chamaenerion angustifolium* (L.)). Вышеуказанные гидролизуемые таннины были выделены из растения препаративными методами с использованием экстракции водным раствором диметилформамида, дробного осаждения свинцового комплекса таннинов, его разложения, обессоливания раствора на катионите и лиофилизацией раствора. Выделение индивидуальных соединений проводилось с использованием хроматографии на колонке с Сефадексом LH-20. Строение индивидуальных веществ установлено с помощью ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии, химической деструкции, а также изучения продуктов гидролиза и их производных.

Результаты. В результате кислотного гидролиза ханерола, а также тримерного таннина (Oenothetin A) нами ранее впервые была выделена и охарактеризована новая тетрафенолкарбоновая кислота, названная хаменериевой кислотой. Для расширения сырьевой базы получения димерных и тримерных таннинов, обладающих широким спектром биологического действия, мы разработали препаративные методы выделения этих таннинов из побегов иван чая узколистного. В отличие от цветков, побеги иван чая практически не содержат высших олигомерных гидролизуемых таннинов. Oenothetin B и Oenothetin A были также выделены нами из цветков и листьев *Oenothera biennis* (L.) в сопоставимых количествах.

Выводы. В связи с высокой биологической активностью выделенных соединений, описанных в мировой литературе, а также биологических данных, полученных в ФГБУ

«РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, они являются перспективными для дальнейших биологических исследований для создания противоопухолевого препарата.

В.М. Сафронова, С.А. Кузнецов, Л.Т. Мамедова, И.Ж. Шубина

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ

В ЛИМФОУЗЛАХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЯИЧНИКОВ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина», Москва

Задача исследования. Оценка субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток лимфоузлов (л/у), удаленных во время операции больных распространенным раком яичников (РЯ).

Материалы и методы. Визуально неизмененные л/у, удаленные во время операции у больных РЯ (n=10), дезагрегировали для получения клеточной суспензии, клетки отмывали центрифугированием, выделяли мононуклеарные клетки (МНК) на градиенте фиколла-урографина, полученную суспензию клеток инкубировали в полной культуральной среде RPMI-1640 с 10% телячьей сыворотки при 37 °C, 5% CO₂ в течение 1-5 суток. Субпопуляционный клеточный состав лимфоцитов (МЛ) определяли при окрашивании моноклональными антителами (МКА) CD45, CD3, CD8, CD4, CD25, CD16, CD56, CD11c, CD86 против соответствующих антигенов. Экспрессию маркеров определяли методом проточной цитофлуориметрии. Часть клеточной суспензии подвергали иммуномагнитной сепарации для определения опухолевых клеток, экспрессирующих эпителиальные маркеры – цитокератины (ЦК+) с последующим цитологическим исследованием при окрашивании препаратов гематоксилин-эозином.

Результаты. Культура клеток, полученная из л/у больных РЯ, хорошо пролиферировала. В результате проведения магнитной сепарации с использованием цитокератин-положительных (ЦК+) конъюгатов в клеточной суспензии обнаружены клетки, окруженные магнитными шариками в виде розеток. В 3 случаях при цитологическом анализе ЦК+ клетки были отмечены как опухолевые. Результаты оценки экспрессии поверхностных маркеров на МНК из л/у выявили субпопуляции зрелых лимфоцитов (CD3⁺), цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺/CD8⁺), натуральных киллеров (CD16⁺, CD56⁺), отсутствие Т-регуляторных клеток CD4⁺/CD25⁺, а также экспрессию костимулирующей молекулы CD86⁺ и экспрессию маркера CD11c⁺, характерных для дендритных клеток.

Выводы. Выделенные из л/у, удаленных во время операции МНК могут быть использованы для приготовления экстракорпорально активированных клеток-эффекторов, применяемых в иммунотерапии с целью продления безрецидивного периода жизни у больных раком яичников после комбинированного лечения. Использование метода иммуномагнитной сепарации для определения популяции ЦК+ клеток позволит удалить из культуры иммунокомпетентных клеток опухолевые клетки.

А.В. Сергеев, А.Б. Капитанов, С.А. Коростелев, И.М. Лученко, В.В. Решетникова
ФАРМАКОКИНЕТИКА КАНТАКСАНТИНА, ЛИКОПИНА И БЕТА-КАРОТИНА
ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва

Актуальность. Каротиноиды (КР) кантаксантин (КТ), ликопин (ЛП), бета-каротин (БК) широко распространены в растительном мире и обладают антиканцерогенными, антимутагенными, антиоксидантными и другими свойствами. Изучение фармакокинетики (ФК) КР позволяет лучше понять механизм их антиканцерогенного действия и более рационально использовать в качестве потенциальных средств химиопрофилактики рака.

Цель исследования. Изучение фармакокинетики БК, КТ, и ЛП в эксперименте на различных видах лабораторных животных и у человека.

Материалы и методы. Кристаллический БК, КТ и ЛП получены из НПО «Витамины» и фирмы «Рош», Швейцария. Определение концентрации КР и ретиноидов в плазме крови и ткани печени проводили по ранее описанным методикам с помощью ВЭЖХ на хроматографах «Spectra Physics-8000» и «Perkin Elmer Nelson», Model 1020.

Результаты. Однократное пероральное введение БК мышам СВА в дозах 30 и 100 мг/кг приводило к незначительному увеличению содержания КР в плазме крови через 60–90 мин и только доза 300 мг/кг сопровождалась появлением двух максимумов концентрации (33,6 и 52,2 мкг/100 мл), наблюдавшихся через 20 и 50 мин от начала введения. КТ и ЛП обладали несколько лучшей биодоступностью и дозы 30 и 100 мг/кг приводили к повышению концентрации КР до 35 и 70 мкг/100мл в течение 60 мин. Курсовое введение БК, КТ и ЛП в дозах 0,1-10 мг/кг в течение 2 недель вызывало существенное увеличение их концентрации в плазме крови и в ткани печени, начиная с 4-го дня введения. Кинетика БК в сыворотке крови собак и поросят, содержащихся на витамин А-дефицитной диете, после введения препарата per os в дозе 1 и 10 мг/кг показала незначительное увеличение содержания КР до 6-10 мкг/100 мл в течение первых 60 мин. Однократное пероральное введение ЛП кроликам массой 3–4 кг в дозе 500 мг приводило через 8 часов к пику КР, при этом отмечен значительный индивидуальный разброс в содержании ЛП в плазме крови. Среднее время удерживания ЛП в организме составило $13,5 \pm 0,85$ ч., а время полувыведения $6,2 \pm 0,9$ ч. Однократный пероральный прием БК здоровыми добровольцами в дозе 100, 250 и 650 мг приводил к 1,5–3,5-кратному повышению уровня провитамина в плазме крови и не влиял на содержание ретинола и ретиноевой кислоты. При систематическом приеме БК в дозе 30 и 60 мг в сутки у здоровых людей и у больных раком толстой кишки обнаружено повышение концентрации КР в 1,5–3 раза.

Выводы. БК, КТ, и ЛП обладают неодинаковой биодоступностью у различных видов лабораторных животных. Хорошая биодоступность БК у человека позволяет быстро увеличить его уровень в плазме крови при систематическом применении.

И.Н. Сидоров, Е.И. Попова, Г.М. Евдокимов
МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
У БОЛЬНЫХ С МНОГООЗЛЫМ ЗОБОМ

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского, Саратов

Задачи исследования. Показать возможности цитологического метода в диагностике рака щитовидной железы.

Материалы и методы. Изучены результаты обследования и хирургического лечения 260 больных с многоузловым зобом. Большинство пациентов были в возрасте от 40 до 60 лет. Мужчин было 40, женщин 220. Для диагностики были использованы УЗИ щитовидной железы, тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия с цитологическим исследованием, исследование гормонов щитовидной железы и ТТГ, МРТ, КТ (по показаниям). По длительности наблюдения у эндокринолога больные распределены следующим образом: подавляющее большинство больных 75% не состояли на учете, 6,3% наблюдались от 1 до 3 месяцев, 3,4 % от 3 до 6, 15,3 % более 6 месяцев. Необходимо отметить, что у 51,4 % больных диагностировано два образования в щитовидной железе, у 25 % от двух до трех, а у 23,6 % более трех узлов. В клинике используется трехэтапная морфологическая верификация патологического процесса щитовидной железы. Первый этап – дооперационное морфологическое исследование, второй этап – интраоперационное цитологическое и экстренное гистологическое исследование, третий этап – послеоперационное плановое гистологическое исследование.

Результаты. На первом этапе морфологической диагностики у 148 (57 %) больных диагностированы доброкачественные заболевания щитовидной железы, у 26 (10 %) подозрение и у 86 (33 %) рак щитовидной железы. На основании полученных данных оперировано 260 больных. Во время интраоперационного исследования (цитологического и гистологического) рак диагностирован еще у 7 больных (2,6 %). Окончательное гистологическое заключение позволило у 2 (0,7 %) больных диагностировать рак щитовидной железы. Общий процент злокачественной патологии составил 36,3 %.

Выводы. Таким образом, трехэтапная морфологическая диагностика рака щитовидной железы обладает высокой разрешающей способностью, что позволяет в большинстве случаев поставить правильный диагноз.

В.Б. Сирота, Л.Е. Муравлева, О.А. Пономарева, Н.А. Кабилдина, И.М. Омарова, М.Д. Жумакаев

**БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
И ТЕЗИОГРАФИЧЕСКАЯ КАРТИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ
МЕСТНОРАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ АРГЛАБИНОМ**

Карагандинский государственный медицинский университет, Караганда, Казахстан

КГП «Областной онкологический диспансер», Караганда, Казахстан

Задачи исследования. Изучение биохимических показателей и тезииографической картины плазмы крови больных местнораспространенным раком молочной железы (МРРМЖ) при химиотерапии (ХТ) с арглабином.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась кровь 48 больных с МРРМЖ ($T_2N_{1-2}M_0$, $T_3N_0M_0$) с гистологической и иммуногистохимической верификацией в возрасте от 28 до 75 лет. Из них 25 женщин имели IIб и 23 – III стадии рака. В группу контроля вошли 32 практически здоровых женщин. Все больные разделены на 3 группы – 2 исследуемые, одна – контрольная. В контрольной группе больным проводили 4 курса неоадьювантной ХТ по схеме АС каждые 21 день, радикальную мастэктомию, 4 курса адьювантной ХТ (АС), лучевую терапию и гормонотерапию по показаниям. Исследуемая группа 1 получала лечение по аналогичной схеме, только режим ХТ (АС) сочетался с арглабином (арглабин 370 мг/м² № 7 дней). Исследуемая группа 2 получала лечение по аналогичной схеме, но в неоадьювантном и адьювантном режиме применяли монотерапию арглабином. Всем больным МРРМЖ проведены исследования метаболитов пуринового обмена, внеклеточных нуклеиновых кислот, растворимых фибрин-мономерных комплексов и тезииография плазмы крови.

Результаты. У больных МРРМЖ в плазме крови зафиксированы достоверное снижение уровня мочевой кислоты по сравнению с контролем в 1,94 раза, гипоксантина – на 17,5 %, аденина – на 18,7 %, ксантина – на 12 %, скорости реакции гипоксантин→ксантин – на 9 %, а общая активность ксантиноксидазы снижена на 19%. У больных, получивших курс АС, уровень мочевой кислоты достоверно остается ниже контрольного в 1,84 раза, уровень гуанина сравним с контролем, а скорость 1 реакции превращения гипоксантина в ксантин превосходит контроль на 11%. У больных, получивших АС+арглабин, отмечен рост всех изучаемых показателей пуринового обмена и содержание КРФ повысилось в 10,5 раз, уровень РНК в 1,35 раз, уровень ДНК – в 2,3 раза по сравнению с показателями до лечения.

Выводы. Неоадьювантный режим АС с арглабином у больных МРРМЖ определяет более интенсивный катаболизм пуринового обмена, что отражает интенсивность распада опухолевых клеток и активацию иммунного ответа.

М.А. Сироткина¹, В.В. Елагин¹, П.В. Субочев², В.А. Каменский², Е.В. Загайнова¹

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛАЗМОННО-РЕЗОНАНСНЫХ НАНОЧАСТИЦ
ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО ЛАЗЕРНОГО НАГРЕВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ**

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

²Институт прикладной физики РАН, Нижний Новгород

Цель исследования. Изучение селективности накопления и эффективности лазерного нагрева наночастиц для разработки методики лазерной гипертермии опухолей

Материалы и методы. Исследование выполнено на модели опухоли рак шейки матки мышей РШМ-5. Золотые наностержни (размер 60/15 нм, максимум экстинкции 775 нм) и бипирамиды (200 нм, пик экстинкции 850 нм) вводили внутривенно в дозе 235 мкг/кг. Время максимального накопления наночастиц в опухоли оценивали прижизненно неинвазивно методом оптической когерентной томографии (ОКТ). Лазерную гипертермию проводили локально в непрерывном режиме: опухоль нагревали лазером с длиной волны 810 нм до 44–45 °С в течение 20 мин. Изменение температуры опухоли контролировали на поверхности методом ИК-термографии и внутри новым методом пассивной акустической термографии. Эффективность лечения оценивали по торможению роста опухоли и данным патоморфологического анализа. Верификацию наночастиц в опухоли выполняли методом электронной микроскопии.

Результаты. Методом ОКТ показано, что бипирамиды селективно накапливаются в опухоли РШМ-5 при внутривенном введении. Установлено, что период максимального накопления составляет 4-5 часов, что подтверждено данными электронной микроскопии. Следовательно, это время является оптимальным для проведения лазерной гипертермии. Методом ИК-термографии получено, что наночастицы повышают эффективность гипертермии за счет обеспечения селективности нагрева. Новым методом пассивной акустической термометрии выявлено, что внутренняя температура опухоли с наночастицами на несколько градусов выше, что также указывает на эффективность наночастиц для гипертермии. Наибольший противоопухолевый эффект обнаружен при применении наностержней. Морфологический анализ опухолевой ткани выявил наиболее значимые структурные изменения на 3 сутки после гипертермии.

Выводы. Золотые наностержни повышают эффективность лазерной гипертермии, которая заключается в селективности нагрева и повышении внутренней температуры опухоли на несколько градусов, что приводит к высокому противоопухолевому эффекту.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по договору № 14.B25.31.0015.

А.Ю. Скрыбина¹, Н.С. Рукк¹, Г.Н. Апрышко²

КОМПЛЕКСЫ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ВЕЩЕСТВА

¹ФГБОУ ВПО «МИТХ им. М.В. Ломоносова», Москва

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва

В связи с тем, что с каждым годом выявляется все больше случаев онкологических заболеваний, а смертность от рака стоит на втором месте после заболеваний органов кровообращения, открытие и разработка новых противораковых лекарственных препаратов приобретает жизненно важное значение. В последнее время в программу клинических испытаний включены, помимо проявляющих нейро-, гепато- и нефротоксичность производных платины, значительное количество соединений металлов других групп Периодической системы Д.И. Менделеева, в частности, комплексы редкоземельных элементов (РЗЭ). Соединения РЗЭ могут найти применение в медицине в качестве контрастных веществ (например, соединения гадолиния) при МРТ-исследованиях с контрастом, люминесцентных проб, антиоксидантов, лекарств, проявляющих цитотоксичность по отношению к различным видам раковых клеток, и т.д.

В обзорном докладе рассматриваются комплексные соединения РЗЭ с некоторыми биологически активными лигандами (например, производными кумарина, пиразолона, 5-фтороурацила, 8-оксихинолина и др.), обладающими цитотоксической, антипролиферативной, противоопухолевой и т.п. активностью. Показано, что в большинстве случаев противоопухолевая активность комплексов выше в сравнении с активностью лигандов и исходных солей РЗЭ и часто превышает активность цисплатина и других лекарственных препаратов. Описываются возможные механизмы фармакологического действия комплексов РЗЭ, обусловленные многозарядностью катионов, высокими значениями координационных чисел, вариативностью степеней окисления и координационных полиэдров и т.д. Отмечается важность наличия в молекуле комплексов РЗЭ фрагментов, имеющих плоское строение, для реализации интеркаляционного механизма воздействия на ДНК – основную внутриклеточную мишень для большинства металл-содержащих противоопухолевых лекарств. Немонотонность изменения ряда свойств соединений РЗЭ, в том числе их биологической активности, позволит тонко регулировать концентрационный диапазон их воздействия при проведении клинических испытаний. Имеющиеся данные о биологической активности комплексов РЗЭ позволяют сделать заключение о том, что поиск потенциальных противоопухолевых лекарств в этом химическом классе – перспективное направление экспериментальной химиотерапии опухолей.

З.С. Смирнова, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, Т.Д. Миникер,
Л.В. Эктова, В.А. Еремина, Л.А. Медведева, Н.И. Тихонова,
А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, О.Л. Орлова, А.П. Полозкова, З.С. Шпрых

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛОКАРБАЗОЛА ЛХС-1208

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

Актуальность. В настоящее время за рубежом производные индолокарбазола: бекатекарин и эндотекарин проходят клинические испытания. Установлено, что производные индолокарбазола могут действовать на одну или несколько мишеней, например, протеинкиназу С, топоизомеразы, киназы, ДНК. Поэтому противоопухолевая активность производных индолокарбазола может быть обусловлена их способностью взаимодействовать со многими мишенями и, следовательно, индуцировать разные пути клеточной гибели.

Цель исследования. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного индолокарбазола ЛХС-1208.

Материалы и методы. Противоопухолевую активность ЛХС-1208 изучали на перевиваемых опухолях мышей: лимфолейкозе Р-388 и эпидермоидной карциноме легкого Льюис (LLC). В опытах использовали мышей-гибридов ВДФ₁. Критериями эффективности служили: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) опытных мышей по сравнению с контрольными животными. Лекарственную форму – лиофилизат для приготовления раствора для инъекций растворяли в воде и вводили внутривенно в течение 5 дней или однократно в широком диапазоне доз от 10 до 175 мг/кг.

Результаты. ЛХС-1208 при ежедневном внутривенном введении в течение 5 дней оказывает противоопухолевый эффект на Р-388 равный 26 % УПЖ в дозе 10 мг/кг, в дозе 25 мг/кг – 76 % УПЖ, а в дозе 35 мг/кг – 80 % УПЖ и гибелью мышей в 25 % случаев. При однократном внутривенном введении в дозах от 75 мг/кг до 150 мг/кг терапевтический эффект статистически не различается и составляет 31–34 % УПЖ без гибели мышей от токсичности. На LLC в дозе 25 мг/кг при ежедневном внутривенном введении в течение 5 дней вызывает ТРО, которое составляет 96–75 % в течение 19 дней.

Выводы. Результаты по противоопухолевой активности соединения ЛХС-1208 дают основание продолжить его доклиническое изучение на других моделях опухолей мышей.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта 13411.1008799.13.120 от 24 июня 2013 г. «Доклинические исследования инновационного лекарственного средства на основе производного индолокарбазола для лечения онкологических заболеваний»

З.С. Смирнова¹, Л.М. Борцова¹, М.П. Киселева¹, Н.С. Сапрыкина¹,
В.П.Краснов², Г.Л. Левит², Т.В. Матвеева², А.В. Ланцова²,
Е.В. Санарова¹, О.Л. Орлова¹, А.П. Полозкова¹

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ OR-2011 НА ЛИМФОЛЕЙКОЗАХ МЫШЕЙ

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

²Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

Актуальность. Лекарственные средства из группы производных нитрозомочевины обладают широким спектром противоопухолевого действия, для них характерно отсутствие перекрестной резистентности с типичными алкилирующими агентами, отмечены существенные различия в механизмах действия представителей этой группы препаратов. Кроме того, отличительной особенностью является их способность проходить через ГЭБ, поэтому часто используются при опухолях головного и спинного мозга.

Цель исследования. Изучения противоопухолевой активности нового производного нитрозомочевины OR-2011 в отношении лимфолейкозов мышей.

Материалы и методы. Противоопухолевую активность OR-2011 изучали на перевиваемых лимфолейкозах Р-388 и L-1210. В опытах использовали мышей-гибридов ВДФ₁. Критериями противоопухолевой эффективности служили: увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) опытных мышей по сравнению с контрольными животными и излечение (% случаев). Лекарственную форму – лиофилизат для приготовления раствора для инъекций растворяли в 5% глюкозе и вводили внутривенно в широком диапазоне доз от 50 мг/кг до 175 мг/кг однократно.

Результаты. Выявлена дозовая зависимость противоопухолевого эффекта OR-2011 в отношении лимфолейкозов мышей. OR-2011 оказывает терапевтический эффект на Р-388 равный 90 % УПЖ в дозе 50 мг/кг, в дозе 135 мг/кг УПЖ составляет 181% с излечением мышей в 33,3 % случаев, а в дозе 175 мг/кг УПЖ составляет 206 % с излечением в 22,2 % случаев и токсичностью в 22,2 % случаев. На L-1210 в дозе 50 мг/кг препарат имеет достаточно низкий противоопухолевый эффект – 70 % УПЖ. Наибольшая эффективность OR-2011 выявлена в дозе 125 мг/кг, при введении которой УПЖ составляет 346 % и излечение мышей в 66,7 % случаев. При введении OR-2011 в дозе 175 мг/кг наблюдается излечение мышей в 75 % случаев и гибель животных в 25 % случаев.

Выводы. Результаты по противоопухолевой активности нового производного нитрозомочевины OR-2011 дают основание продолжить изучение его эффективности на других моделях опухолей мышей.

Работа выполнена в рамках Государственного контракта № 13411.1008799.13.163 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства класса нитрозомочевин».

Е.А. Соколова¹, Т.А. Здобнова^{1,2}, О.А. Стрёмовский², И.В. Балалаева¹, С.М. Деев²

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ИММУНОТОКСИНА НА ОСНОВЕ ПСЕВДОМОНАДНОГО ЭКЗОТОКСИНА А *IN VITRO* И *IN VIVO*

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

²Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Задачи исследования. Исследование эффективности нового рекомбинантного анти-HER2/neu иммунотоксина на основе псевдомонадного экзотоксина А: оценка цитотоксичности *in vitro* и противоопухолевого эффекта *in vivo*.

Материалы и методы. Цитотоксичность анти-HER2/neu иммунотоксина оценивали методом МТТ-теста на клеточных культурах карциномы яичника человека SKOV3ip (гиперэкспрессия рецептора HER2/neu) и яичника китайского хомячка CHO (отсутствие HER2/neu). Исследование противоопухолевой эффективности иммунотоксина *in vivo* проводили на бестимусных мышцах-самках линии nude с интраперитонеально привитой карциномой яичника человека, трансфицированной красным флуоресцентным белком Katushka (SKOV3ip-kat). Прижизненный неинвазивный мониторинг опухолевого процесса осуществляли на установке для поверхностного флуоресцентного имиджинга. Рост опухолевых узлов количественно оценивали по показателю интегральной интенсивности флуоресценции в брюшной полости.

Результаты и выводы. В экспериментах *in vitro* показана избирательная цитотоксичность нового рекомбинантного иммунотоксина на основе псевдомонадного экзотоксина А для клеток, гиперэкспрессирующих рецептор HER2/neu. В ходе прижизненного мониторинга роста опухоли с использованием интраперитонеальной флуоресцентной модели карциномы яичника человека выявлен выраженный противоопухолевый эффект исследуемого иммунотоксина: в опытной группе наблюдалось значительное торможение опухолевого роста по сравнению с контролем. Полученные предварительные результаты свидетельствуют о противоопухолевой эффективности данного иммунотоксина и целесообразности дальнейшего исследования его свойств (в частности, фармакокинетики и токсичности), а также подбора оптимальных доз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (договор № 14.Z50.31.0022) и РФФИ (проект № 13-04-40228-Н).

С.О. Соломевич¹, П.М. Бычковский¹, Т.Л. Юркинович¹,
Н.В. Голуб¹, П.Ю. Мирчук¹, В.А. Алиновская¹, Р.И. Костерова¹, А.А. Кладиев²

КИНЕТИКА РЕЛИЗА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ВЕЩЕСТВА ПРОСПИДИНА ИЗ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ ДЕКСТРАНА

¹Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск, Беларусь

²ООО «Биотехнологическая компания ТНК», Москва

Актуальность. Для создания систем адресной доставки лекарственных веществ особый интерес в качестве полимеров-носителей представляют биodeградируемые гидрогели на основе модифицированных полисахаридов, которые биосовместимы, не имеют выраженных побочных эффектов и могут использоваться при продолжительном лечении.

Цель исследования. Получение системы адресной доставки проспицина в пораженный орган- мишень и оценка кинетики релиза противоопухолевого вещества из гидрогелей в модельных опытах *in vitro* и *in vivo* в зависимости от степени сшивки фосфатов декстрана, массового соотношения полимер/противоопухолевое вещество.

Материалы и методы. В настоящей работе фосфаты декстрана с содержанием фосфорнокислых групп 2,0–2,9 ммоль/г были получены путем этерификации ортофосфорной кислотой в расплаве мочевины. Приготовление противоопухолевого гелеобразующего препарата (доза проспицина 1000 мг/г) проводили путем смешения проспицина с фосфатом декстрана и последующей стерилизацией γ -излучением в дозе 2,5 Мрад. Воду для инъекций добавляли за 15–20 мин до применения.

Результаты и выводы. Установлено, что в течение первых 60 минут из фазы носителя в фосфатный буферный раствор высвобождается от 45 до 70 % массы сорбированного проспицина. Максимальная доля высвобожденного проспицина зависит от степени сшивки гидрогелей и массового соотношения ФД/проспидин: чем ниже степень сшивки, и соответственно, выше степень набухания, тем выше количество высвобождающегося цитостатика. По мере дальнейшего роста времени инкубации в буферном растворе наблюдается потеря массы гелеобразующей лекарственной формы, что свидетельствует о высвобождении проспицина из гидрогеля в виде комплекса ФД-проспицина в результате осуществления перехода гель-золь. Приведены результаты изучения противоопухолевой активности пролонгированной формы проспицина в условиях *in vitro* и *in vivo*. В опытах *in vitro* установлено, что скорость высвобождения проспицина из гидрогелей замедляется по мере роста массового соотношения полимер- носитель/цитостатик. На модели гепатомы Зайделя установлено увеличение противоопухолевой активности пролонгированной формы проспицина по сравнению с субстанцией.

Е.Ф. Странадоко¹, Т.И. Малова², А.С. Савчук¹

ЛЕЧЕНИЕ УПОРНО РЕЦИДИВИРУЮЩЕГО БАЗАЛЬНОКЛЕТОЧНОГО РАКА КОЖИ

¹ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины ФМБА России», Москва

²ООО «ВЕТА-ГРАНД», Москва

Актуальность. Базальноклеточный рак кожи (БКРК) составляет 90 % всех злокачественных новообразований кожи. Наиболее эффективным методом лечения БКРК признана фотодинамическая терапия (ФДТ). Наряду с высокой степенью излечения БКРК, составляющей 95–96 %, ФДТ обеспечивает хорошие и отличные косметические результаты. Некоторые формы БКРК в 10–12 % случаев характеризуется упорно рецидивирующим течением (УРТ), при котором ни один из традиционных методов лечения не позволяет добиться излечения.

Задачи исследования. Оценить возможности ФДТ в лечении упорно рецидивирующего БКРК и разработать методические подходы к проведению ФДТ.

Материалы и методы. Под нашим наблюдением находилась большая группа больных БКРК с УРТ, которые перенесли по 3–5 процедур различных видов лечения (близкофокусная рентгенотерапия, криодеструкция, электрокоагуляция, лазерная вапоризация и пр.). У 3 больных было более 10 лечебных вмешательств. Основная масса больных поступила с распространенными рецидивами, соответствующими символам T₃–T₄ международной классификации. Так как возможности традиционных методов лечения у этой категории больных были исчерпаны, мы применяли повторные курсы ФДТ с повышенными дозами фотосенсибилизаторов, плотности энергии светового воздействия и различными вариантами подведения света (фракционное поверхностное облучение, внутритканевое и внутрисполостное подведение света). В процессе динамического наблюдения у больных с рецидивами размерами до 5 мм выполняли лазерную вапоризацию.

Результаты. ФДТ у всех больных сопровождалась терапевтическим эффектом, однако полной резорбции БКРК при УРТ удалось добиться лишь в половине случаев. Лечение иногда длилось годами. Необходимо отметить, что благодаря, прежде всего, сосудистому механизму действия ФДТ, длительность безрецидивных интервалов при УРТ составляла от 6 месяцев до 3–6 лет.

Выводы. Больные БКРК с УРТ не являются бесперспективными в отношении возможности специального лечения. ФДТ при БКРК с УРТ оказалась эффективным методом лечения и в ряде случаев приводила к излечению с длительностью наблюдения более 5 лет. В зависимости от локализации и распространенности процесса при проведении ФДТ следует использовать все возможные методы подведения световой энергии.

К.Д. Творогова¹, С.В. Шуმიлова¹, Д.В. Новиков¹, Г.А. Кравченко¹, В.В. Новиков¹, А.Ю. Барышников²
ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ICAM-1 ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ ЛИМФОМ

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Актуальность. ICAM-1 (CD54) является поверхностным клеточным гликопротеином, который представлен на клетках многих типов, включая Т- и В-лимфоциты. Процесс взаимодействия ICAM-1 с рецепторами вовлечен в формирование клеточных адгезивных контактов и играет ключевую роль в миграции и инвазии лейкоцитов в очаг воспаления, а также в метастазировании раковых клеток. В результате альтернативного сплайсинга ген ICAM-1 способен давать форму мРНК с делецией трансмембранного домена, которая транслируется в растворимый белок ICAM-1.

Цель исследования. Изучение профиля экспрессии гена ICAM-1 в клетках перевиваемых линий, полученных от больных Т-клеточной лимфомой кожи, лимфомой взрослых, лимфомой Беркитта.

Материалы и методы. Исследовали клетки перевиваемых линий HuT78, H9, Kit225K6, Ramos, имеющих происхождение от больных лимфомами. Анализ экспрессии гена ICAM-1 проводили с использованием ОТ-ПЦР. Нуклеотидные последовательности транскриптов гена ICAM-1 определяли путем секвенирования.

Результаты и выводы. В клетках линий HuT78, H9 (Т-клеточная лимфома кожи) и Ramos (лимфома Беркитта) обнаружена полноразмерная форма мРНК ICAM-1, что свидетельствует о том, что злокачественная трансформация клеток данных типов не сопровождается выключением гена ICAM-1. В линии Kit225K6, имеющей происхождение от раковых клеток больного лимфомой взрослых, данный вариант мРНК не детектировался. Альтернативная форма мРНК ICAM-1 не выявлена в клетках ни одной из тестируемых линий. Потеря экспрессии гена ICAM-1 Т-лимфоцитами при лимфоме взрослых может являться отражением изменения механизмов адгезии, сопровождающего злокачественное перерождение клеток.

Работа выполнена в рамках базовой части государственного задания №2014/134 Минобрнауки России (проект 2575).

Л.Р. Тилова¹, О.И. Задорожная¹, К.И. Кирсанов¹, А.М. Оглоблина¹,
 М.Г. Якубовская¹, И.В. Будунова², Г.А. Белицкий¹, Е.А. Лесовая¹
**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕЛЕКТИВНЫХ АГОНИСТОВ
 ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО РЕЦЕПТОРА (SEGRA)
 В КОМБИНИРОВАННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ГЕМОБЛАСТОЗОВ**

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

²Northwestern University, Chicago, USA

Актуальность. В настоящее время перспективным направлением исследований является анализ молекулярных механизмов действия комбинаций препаратов для терапии гемобластозов с использованием селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора, которые вызывают меньше метаболических осложнений при длительных курсах приема, чем глюкокортикоиды. Ранее нами был продемонстрирован противоопухолевый эффект CpdA, нового соединения данного класса, *in vitro*. Более того, был показан синергизм действия CpdA и ингибитора протеасом бортезомиба.

Цель исследования. Изучение противоопухолевой активности CpdA в комбинациях с препаратами различного действия на клетки лимфом *in vitro*.

Задачи исследования. Определить суммарную противоопухолевую активность комбинаций CpdA с: ингибиторами белка DDIT4, играющего ключевую роль в сигнальном пути mTOR; ингибиторами протеасом; ингибиторами убиквитинирования; узкобороздочными лигандами. Изучить механизмы комбинированного действия указанных соединений.

Материалы и методы. Цитотоксический эффект ингибиторов DDIT4, ингибиторов протеасом, ингибиторов убиквитинирования и узкобороздочных лигандов; определяли путем прямого подсчета клеток. Уровень апоптоза и степень реактивации эпигенетически молчащих генов определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. Разобщение межклеточных контактов определяли по степени проникновения люминесцентного красителя между слоями клеток.

Результаты и выводы. На клетках лейкозов *in vitro* был показан синергизм действия для комбинации CpdA с ингибиторами DDIT4, узкобороздочными лигандами, ингибиторами убиквитинирования. Антипролиферативное действие этих соединений коррелировало с развитием апоптоза. Были получены данные о том, что CpdA, в отличие от дексаметазона, не снижает степень кооперации клеток, стабилизирует эпигенетическое молчание генов, а также не запускает процесс аутофагии в трансформированных лимфобластах, что способствует увеличению цитотоксического эффекта.

А.С. Тихомиров^{1,2}, А.Е. Щекотихин^{1,2}, М.Н. Преображенская¹

ИССЛЕДОВАНИЕ

ВЛИЯНИЯ СТРУКТУРЫ БОКОВОЙ ЦЕПИ АНТРА[2,3-*b*]ФУРАНКАРБОКСАМИДОВ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

¹ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе» РАМН, Москва

²ФГБУ ВПО «РХТУ им. Д.И. Менделеева», Москва

Актуальность. Для углубленных доклинических исследований отобрано производное 4,11-дигидрокси-5,10-диоксоантра[2,3-*b*]фуран-3-карбоксамида (препарат ЛХТА-2034), обладающее высокой противолейкозной активностью *in vivo* и *in vitro* (А.Е. Щекотихин и др., патент РФ №2412166). С целью выявления закономерностей связи структура-активность синтезирована серия новых аналогов ЛХТА-2034.

Цель исследования. Изучение роли карбоксамидной группы в антипролиферативных свойствах 4,11-дигидрокси-5,10-диоксоантра[2,3-*b*]фуранкарбоксамидов.

Материалы и методы. Серия антра[2,3-*b*]фуранкарбоксамидов синтезирована из соответствующих 4,11-дигидрокси-5,10-диоксоантра[2,3-*b*]фуран-2- и 3- карбоновых кислот (А.С. Тихомиров и др., ХГС 2011, 10, 1464; ХГС 2013, 2, 264) и циклических диаминов. Цитотоксичность соединений определяли в МТТ-тесте на линиях клеток лейкоза мышей L1210.

Результаты. Новая серия амидов антра[2,3-*b*]фуран-5,10-дион-3-карбоновой кислоты и циклических диаминов обладает высокой антипролиферативной активностью, ингибируя рост клеток лейкоза L1210 в микромолярных и субмикромолярных концентрациях. Наиболее активными в серии оказались производные, содержащие 3-аминопирролидин ($IC_{50}=0.67$ мкМ) и 3-аминопиперидин ($IC_{50}=0.69$ мкМ), значение 50%-й рости-гибирующей концентрации которых близко к соединению-лидеру ЛХТА-2034 ($IC_{50}=0.60$ мкМ). Изомерные аналоги 3-карбоксамидов – производные антра[2,3-*b*]фуран-5,10-дион-2-карбоксамида оказались значительно менее активными ($IC_{50}=93–250$ мкМ).

Выводы. Показано, что амиды 4,11-дигидрокси-5,10-диоксоантра[2,3-*b*]фуран-3-карбоновой кислоты и циклических диаминов обладают высокой антипролиферативной активностью, в то время как изомерные производные антра[2,3-*b*]фуран-2-карбоновой кислоты практически не влияют на рост опухолевых клеток. Полученные данные говорят о критической роли фармакофорной группы в положении 3 антра[2,3-*b*]фуран-5,10-дионов.

Работа выполнена в рамках гос. контракта Министерства промышленности и торговли РФ № 12411.1008799.13.007, шифр «2.1 Топоизомеразы 2012».

Е.Г. Толоконников¹, Ш.С. Калиева², С.М. Адекенов¹

ФАРМАКОЭКОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА «АРГЛАБИН»

¹Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Казахстан

²Карагандинский Государственный Медицинский Университет, Караганда, Казахстан

Актуальность. Рак молочной железы занимает первое место среди злокачественных новообразований у женщин и в настоящее время значительное внимание уделяется поиску и внедрению эффективных препаратов для лечения данной патологии, как с клинической, так и с экономической точки зрения. Многочисленные поиски препаратов с противораковой и иммуномодулирующей активностью привели к необходимости использования в комплексной терапии злокачественных новообразований лекарственных препаратов природного происхождения, одним из которых является отечественный препарат «Арглабин».

Задачи исследования. Изучить клинико-экономическую эффективность оригинального препарата «Арглабин» при местнораспространенном раке молочной железы в клинической практике на основе методов фармакоэкономического анализа.

Материалы и методы. Применяли методы фармакоэкономического анализа “стоимость болезни” (прямые затраты), “затраты – эффективность”.

Результаты. Проведенный фармакоэкономический анализ оригинального препарата «Арглабин» показал эффективность схемы с использованием арглабина, что подтверждается показателями выживаемости – трехлетняя безрецидивная выживаемость в группе больных, получавших арглабин на фоне лучевой терапии выше на 55,2 %, чем при использовании только лучевой терапии. По показателю «затраты-эффективность» схема арглабин+лучевая терапия дешевле, чем для стандартной лучевой терапии.

Выводы. Таким образом, с точки зрения фармакоэкономического анализа способ лечения больных местнораспространенным раком молочной железы с назначением препарата «Арглабин» является эффективным, и что позволяет рекомендовать широкое использование его в клинической практике.

А.С. Толстоколов, И.В. Федотов, С.А. Дергунова

РОЛЬ *Helicobacter pylori* В РАЗВИТИИ РАКА ЖЕЛУДКА

ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов

Актуальность. *Helicobacter pylori* (НР) связан с широким спектром гастродуоденальных заболеваний – от бессимптомного гастрита до рака желудка. Его влияние на развитие рака желудка не столь бесспорно, однако, вызывает значительную заинтересованность гастроэнтерологов. В некоторых работах отмечается прямая патогенетическая связь между НР-инфекцией и развитием рака и лимфомы желудка. Прослеживается корреляция между уровнем антител к НР и риском развития рака желудка. При серологических исследованиях антитела IgG к НР чаще обнаруживались у больных раком желудка, чем у здоровых. В более молодом возрасте связь рака желудка и НР-инфекции прослеживается более чётко, и чем раньше произошло инфицирование НР, тем выше риск развития рака желудка. Положительная корреляция между НР-инфекцией и раком желудка касается некардиальной локализации поражения, в отличие от рака кардии, где связь с инфекцией не достоверна.

Задачи исследования. Определение уровня контаминации НР в биоптатах у пациентов с раком желудка и выявление наиболее вирулентных штаммов.

Материалы и методы. В последнее время всё большее применение в выявлении НР находит ПЦР (полимерная цепная реакция) – диагностика, которая даёт возможность идентифицировать видоспецифичный для НР фрагмент ДНК. Этот метод является высокоспецифичным, даёт возможность типировать и дифференцировать штаммы бактерий, что позволяет осуществить их эпидемиологическое изучение: установить ответственность того или иного штамма за возникновение различной патологии, выявить наиболее вирулентные штаммы.

Результаты. Важным этапом научного исследования было определение уровня контаминации НР у пациентов с раком желудка и установление частоты заболеваемости раком желудка от наличия хеликобактериоза. Морфологическая верификация биоптатов со слизистой оболочки желудка осуществлялась у 41 пациента с раком желудка. Наличие НР в биоптатах выявилось в 51,2% случаев. Обсеменённость носила выраженный характер – более 50 микробных групп в исследуемом поле зрения. При морфологической верификации выявлено: аденокарцинома – 24 пациента (у 14 выявляли НР), недифференцированный рак – 15 (7), скirr – 2 случая без обсеменённости.

Выводы. У больных раком желудка контаминация НР возрастает до 80 %.

А.М. Торчинов¹, М.М. Умаханова¹, Р.А. Дуванский¹, В.А. Дуванский²

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ В ЛЕЧЕНИИ НЕОПУХОЛЕВЫХ И ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ

¹ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет», Москва

²ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины ФМБА, Москва

Задачи исследования. Оценить эффективность лазерной фотодинамической терапии (ФДТ) в лечении больных с неопухолевыми и предраковыми заболеваниями шейки матки.

Материалы и методы. Пролечено 102 женщины с неопухолевыми заболеваниями шейки матки: эктопия у – 50 пациенток (49%), лейкоплакия у – 36 (35,3 %), эндометриоз у – 9 (8,8%), плоская кондилома шейки матки у – 7 (6,9%); и 57 пациенток с дисплазией шейки матки различной степени тяжести: легкая (CIN I) – у 18 (31,6%) больных, умеренная (CIN II) – 26 (45,6%) пациентки и тяжелая (CIN III) – 13 (22,8%) обследованных. Обследование больных включало в себя: клиническое обследование; кольпоскопическое, микробиологическое, цитологическое и гистологическое исследования, флуоресцентную диагностическую и оптическую когерентную томографию. 93 (58,5%) пациенткам, которым проводили ФДТ. В группе сравнения – 66 (41,5%) пациенток, использовали диатермохирургический (ДХ) метод лечения. ФДТ с ФС «Радахлорин» (гель для наружного применения, 0,1% – 25,0 г. при неопухолевых и раствор для в/в введения, 0,35% – 10,0 мл при предраковых заболеваниях) проводили с использованием лазерного аппарата МИЛОН ЛАХТА в непрерывном режиме, длина волны 662 нм, мощность – 1 Вт, плотность – 80-200 Дж/см² при неопухолевых, и 250-300 Дж/см² при предраковых заболеваниях). ФДТ проводилась в I фазу менструального цикла, не требовала проведения анестезии.

Результаты. При неопухолевых заболеваниях эффективность ДХ составила 71,1%, неполная эпителизация отмечена у 13 (28,9%) пациенток, рецидив эктопии отмечен у 10 (22,2%) пациенток. Эффективность ФДТ – 89,5%, частичная эпителизация отмечена у 6 (10,5%) пациенток, рецидив заболевания отмечен у 5 (8,8%) пациенток с эктопией. Эффективность лечения дисплазии шейки матки I-III степени тяжести методами ДХ – 95%, ФДТ – 94%, Число осложнений при ФДТ ниже (2,8%) против 9,5% при ДХ. Повторное возникновение дисплазии шейки матки при различных ее степенях нами отмечено 4,8% при диатермоэлектроконизации и в 8,3% наблюдений при ФДТ.

Выводы. ФДТ с использованием фотосенсибилизатора «Радахлорин» является эффективным методом лечения больных с неопухолевыми заболеваниями шейки матки и успешно может применяться при лечении дисплазии, не сочетающейся с рубцовой деформацией ткани шейки матки.

Н.Е. Устюжанина¹, Н.А. Ушакова², М.И. Билан¹, А.И. Усов^{1,3},
А.Ю. Анисимова², Н.Э. Нифантьев², М.В. Киселевский³

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ

СТРУКТУРНО РАЗЛИЧНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ФУКОИДАНОВ

¹ФГБУ «Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского» РАН, Москва

²ФГБУ «Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» РАМН, Москва

³ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН, Москва

Задачи исследования. Изучить серию фракций полисахаридов фукоиданов из различных видов бурых водорослей *in vitro*, оценить их иммуностимулирующую, антиангиогенную и антиадгезионную активность.

Материалы и методы. Фракции полисахаридов фукоиданов были выделены из бурых водорослей видов *C. flageliformis*, *F. evanescence*, *F. distichus*, *S. latissima* и *C. okamuraanus* методами экстракции, ионообменной хроматографии и гель-хроматографии. Была изучена способность образцов блокировать адгезию клеток рака молочной железы человека (MCF-7) на монослое тромбоцитов, ингибировать ангиогенез на матригеле, а также стимулировать натуральные киллеры (НК) по отношению к опухолевым клеткам К-562.

Результаты. Показано, что все образцы не оказывают прямого цитотоксического действия на мононуклеарные лейкоциты в диапазоне концентраций 0,75-25 мг/мл и значимо повышают цитотоксическую активность натуральных киллеров по отношению к клеткам линии К-562. Исследуемые соединения блокируют адгезию опухолевых и тромбоцитов, и ингибирует процесс формирования капиллярных трубочек (начальный этап ангиогенеза) при испытании на линии эндотелиальных клеток (HUVES). Исследовано взаимодействие фукополимеров с очищенными белками. В качестве белка-мишени был выбран тромбин, который играет важную роль в процессе метастазирования. Было установлено образование комплекса белка с полисахаридом. Исследованные образцы существенно различаются по активности и наиболее перспективны полисахариды из водорослей *S. latissima* (SL) и *C. flageliformis* (CF), построенные из (1-3)-связанных альфа-L-фукопиранозных остатков и несущие отрицательно заряженные группы в боковых заместителях.

Выводы. Величина биологического эффекта существенно зависит от структурных характеристик полисахаридов фукоиданов. Обнаружены образцы фукоиданов, проявляющие иммуностимулирующую, антиангиогенную и антиадгезивную активности, перспективные для дальнейших исследований *in vivo*.

И.И. Файнгольд, А.Ю. Рыбкин, Г.В. Костюк, А.А. Терентьев, Р.А. Котельникова, А.И. Котельников

ФОТОДИНАМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КОНЬЮГАТОВ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФУЛЛЕРЕНА И КРАСИТЕЛЕЙ НА ПЛАЗМИДНУЮ МОЛЕКУЛУ ДНК

Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка

Актуальность. В основе фотодинамической терапии (ФДТ) лежит фотодинамический эффект повреждения биологических объектов световым излучением в присутствии некоторых красителей (фотосенсибилизаторов), которые повышают чувствительность объекта к свету при доступе кислорода. Впервые фотодинамический эффект был описан Raab в 1900 г., обнаруживший летальное действие акридинового оранжевого на парameций при освещении их солнечным светом. Повреждение нуклеиновых кислот (ДНК, РНК) является важным этапом фотодинамической терапии. В зависимости от количества повреждений, полученных молекулой ДНК, может быть вызвана остановка клеточного цикла, запущен механизм апоптоза.

Задачи исследования. Изучить способность конъюгатов полифункциональных производных фуллерена C₆₀ (ППФ) и красителей вызывать повреждение молекулы плазмидной ДНК pET-21 при облучении светом в полосе поглощения красителя.

Материалы и методы. В работе исследованы конъюгаты ППФ-Рубоксил и ППФ-Флуоресцеин. Фотодинамическое действие ППФ и красителей исследовали на плазмидной ДНК pET-21, выделенной из *Escherichia coli* (плазмиды представляют собой двуцепочечные замкнутые кольцевые молекулы ДНК). Исследование проводили методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле.

Результаты и выводы. При облучении светом растворов (*in vitro*), содержащих плазмидную ДНК pET-21, NADH, ППФ-Рубоксил и плазмидную ДНК pET-21, NADH, ППФ-Флуоресцеин наблюдали изменение структуры ДНК pET-21, исчезновение суперскрученной формы и переход ее в кольцевую форму. Такой переход возможен при одноцепочечном разрыве цепочки ДНК. Это доказывает эффективное фотодинамическое действие конъюгатов ППФ-Рубоксил и ППФ-Флуоресцеин на структуру ДНК.

Эти исследования являются перспективными для применения ППФ в качестве фотосенсибилизирующих систем в фотодинамической терапии опухолевых процессов.

Благодарности: П.А. Трошину и А.Б. Корневу за синтез конъюгатов полифункциональных производных фуллерена C₆₀ и красителей.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН № 24, программы ОХНМ-09 и проекта РФФИ №14-04-31587 мол.а.

Е.В. Филоненко¹, Г.П. Крылова¹, А.Н. Окушко¹, П.В. Грачев², К.Г. Линьков², В.Б. Лощенов²
ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ПОДКОЖНО РАСПОЛОЖЕННЫХ ПЕРВИЧНЫХ, РЕЦИДИВНЫХ И МЕТАСТАТИЧЕСКИХ ОПУХОЛЕЙ С ОХЛАЖДЕНИЕМ ПОВЕРХНОСТНЫХ СЛОЕВ КОЖИ

¹ФГБУ «МНИОИ им. П.А.Герцена» МЗ РФ, Москва

²Институт Общей Физики им. А.М.Прохорова РАН, Москва

Актуальность. Особую сложность при лечении больных со злокачественными опухолями кожи представляет группа пациентов с узловыми формами роста рака кожи и с внутрикожными метастазами рака молочной железы. Крупные размеры очагов, множественный характер поражения, невозможность или неэффективность традиционных методов лечения снижает психолого-эмоциональный статус больных, способствует появлению впоследствии болевого синдрома, отека, изъязвления и кровотечения из опухолевых узлов, интоксикации, косметических дефектов, особенно при расположении опухолевых узлов на лице. Наряду с хирургическим, лучевым и лекарственным методами при лечении злокачественных опухолей кожи применяется метод фотодинамической терапии. Для повышения эффективности лечения, в МНИОИ им. П.А.Герцена разработан метод неинвазивной внутритканевой сочетанной фотодинамической терапии и лазерной гипертермии с низкотемпературной протекцией здоровых тканей.

Цель исследования. Оптимизация и повышение эффективности лечения больных раком кожи узловой формой роста и с внутрикожными метастазами рака молочной железы. **Материалы и методы.** МНИОИ им. П.А. Герцена располагает опытом использования сочетанной фотодинамической терапии с использованием фотосенса и лазерной гипертермии с низкотемпературной протекцией здоровых тканей у 39 больных данной группы, у которых проведение традиционных методов лечения сочтено нецелесообразным. Возраст больных колебался от 40 до 90 лет, средний возраст составил 69,2 года. Лечебному воздействию подвергались опухолевые узлы от 0,5 до 6,0 см в диаметре, количество опухолевых узлов у одного больного варьировало от 1 до 6. При проведении сеанса внутритканевой сочетанной ФДТ+ЛГ в качестве источника света используют лазерные аппараты «ЛФТ-БИОСПЕК» (ООО «Биоспек», Россия) с длиной волны 675 нм для ФДТ «Кристалл» или «Биоспек» с длиной волны 808 нм для ЛГ. Низкотемпературная протекция достигается благодаря оригинальному устройству, дистальный конец которого представлен сапфировой линзой, во время сеанса лечения устанавливается на поверхность кожи в проекции расположения опухолевого очага. При этом установка устройства производится под достаточным давлением для компрессии здоровых тканей. Плотность энергии лазерного излучения составила при ФДТ режиме – 764 Дж/см², мощность лазера в режиме гипертермии – 6 Вт. В зоне опухоли в режиме гипертермии нагревание тканей происходило от 42 до 55 °С. Курс лечения проводился в течение 4-10 сеансов в зависимости от размеров опухолевого узла. Во время проведения процедуры осложнений не отмечено.

Результаты: у 31 больного раком кожи (100,0 %) отмечена полная регрессия очагов опухоли после проведенного лечения, у 8 больных с 31 внутрикожными и подкожными метастазами рака молочной железы 8 очагов (25,8 %) подверглись полной регрессии, 9 (29,0 %) – частичной регрессии, 14 (45,2 %) – стабилизации.

Выводы. Накопленный нами опыт свидетельствует об улучшении результатов лечения больных с узловыми формами рака кожи и с внутрикожными метастазами рака молочной железы и может применяться как наряду, так и при невозможности проведения традиционных методов лечения.

Е.В. Филоненко¹, Г.П. Крылова¹, А.Г. Яникова¹, И.А. Шикунова³, В.Н. Курлов³, В.В. Волков², В.Б. Лощенов²
ПРИМЕНЕНИЕ САПФИРОВЫХ КАПИЛЛЯРОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ К ОПУХОЛЯМ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

¹ФГБУ «МНИОИ им. П.А.Герцена» МЗ РФ, Москва

²Институт общей физики имени А.М. Прохорова РАН, Москва

³Институт физики твердого тела РАН, Москва

Актуальность. В последнее десятилетие активно развиваются оптические методы медицинской диагностики и терапии, основанные на достижениях современной науки в изучении взаимодействия света с живыми тканями, которые выводят на новый уровень лазерные методы терапии внутритканевых опухолей. В настоящее время для внутритканевых методов облучения в режиме гипертермии или фотодинамической терапии в качестве систем доставки лазерного излучения разработан новый класс контактных облучателей на основе кварцевых волокон, помещенных в сапфировые игловые капилляры, которые обладают высокой теплопроводностью, стойкостью к термоудару, твердостью, прочностью, а также химической инертностью к крови и тканям человека в сочетании с высоким пропусканием в широком диапазоне длин волн излучения. Использование сапфировых облучателей позволяет более точно определять требуемые параметры облучения и стабилизировать динамику пространственного фототермического распределения в течение всей процедуры.

Цель исследования. Повышение эффективности лечения больных раком различной локализации с использованием сапфировых облучателей.

Материалы и методы. Мы располагаем опытом использования сапфирового иглового капилляра при ФДТ и ФДТ в сочетании с гипертермией опухолей различной локализации у 18 больных. Сапфировый игловой капилляр (внутренний диаметр 0.5-0.6 мм, внешний – 1.2 мм) диффузором 25 мм вводят параллельно поверхности кожи на расстоянии около 3 мм. При проведении сеанса внутритканевого излучения с использованием сапфировых игловых капилляров в качестве источника света используют лазерные аппараты «ЛФТ-БИОСПЕК» (ООО «БИОСПЕК», Россия) с длиной волны 808 нм и мощностью лазера 6 Вт. При этом биологическая ткань прогревается не более 39 °С. В течение сеанса облучения распределение температуры фиксируется тепловой камерой. При использовании сапфировых облучателей в режиме ФДТ и гипертермии практически исключена вероятность образования очагов перегрева.

Результаты и выводы. Таким образом, использование сапфировых игловых капилляров позволяет более точно определять требуемые параметры облучения и стабилизировать динамику пространственного фототермического распределения в течение всей процедуры.

А.А. Фильченков¹, М.П. Завелевич¹, Л.М. Куява¹, В.В. Семенов², М.Н. Семенова³

ИЗУЧЕНИЕ СОЧЕТАННОГО ДЕЙСТВИЯ ТРИАЗОЛЬНОГО АНАЛОГА КОМБРЕТАСТАТИНА А4 И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КЛЕТКИ JURKAT Т-КЛЕТОЧНОГО ОЛЛ

¹ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

²ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

³ИБР им. Н.К.Кольцова РАН, Москва

Актуальность. В связи с широким использованием полихимиотерапии в онкологии актуальным является изучение комбинированного действия препаратов различных групп на опухолевые клетки. Комбретастатины (КС), как природные лиганды тубулина, ингибируют его полимеризацию и препятствуют формированию микротрубочек. Показано выраженное антимитотическое и цитотоксическое действие *in vitro* на опухолевые клетки пространственно стабилизированных аналогов КС А4, синтезированных в ИОХ (Demchuk D.V. et al., 2014). Эффекты триазольных аналогов КС А4 в комплексе с известными препаратами ранее не исследовались.

Цель исследования. Изучение эффективности воздействия *in vitro* триазольного аналога КС А4 в сочетании с доксорубицином или цисплатином на лейкозные клетки человека линии Jurkat.

Материалы и методы. Клетки Т-лимфоblastного лейкоза человека линии Jurkat культивировали в суспензии. Использовали триазольный аналог КС А4 N-комбретатриазол-71 (синтезирован в ИОХ). Доксорубицин или цисплатин ("Ebewe", Австрия) вносили одновременно с N-комбретатриазолом-71 либо за 24 ч до применения последнего. Цитотоксическую активность оценивали в МТТ-тесте.

Результаты и выводы. При совместном действии цисплатина и N-комбретатриазола-71 в клетках Jurkat отмечается лишь незначительное усиление эффекта по цитотоксичности и торможению роста в сравнении с таковым для каждого препаратов в отдельности, причем суммарные показатели ниже аддитивного эффекта. При совместном действии доксорубицина и N-комбретатриазола-71 при разных схемах достоверного усиления антипролиферативных и цитотоксических свойств каждого из исследуемых препаратов не выявляется. Эффекты усиления цитотоксичности цисплатина или доксорубицина КС А4, обнаруженные на моделях солидных опухолей *in vivo* (Siemann D.W. et al., 2002; Nelkin B.D., Ball D.W., 2001), по-видимому, обусловлены мощным антиангиогенным действием КС А4.

Исследования поддержаны грантами Государственного Фонда фундаментальных исследований Украины (№ Ф53.4/056) и Российского Фонда фундаментальных исследований (№13-03-90455).

А.А. Фильченков¹, М.П. Завелевич¹, Л.М. Куява¹, В.В. Семенов², М.Н. Семенова³

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТОКСИЧНОСТИ И АПОПТОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИС-СТАБИЛИЗИРОВАННОГО ТРИАЗОЛЬНОГО АНАЛОГА КОМБРЕТАСТАТИНА А4 НА МОДЕЛЯХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

¹ИЭПОР им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина

²ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

³ИБР им. Н.К.Кольцова РАН, Москва

Актуальность. Известно, что биологическая активность комбретастатинов (КС) реализуется лишь их цис-изомерами. Поэтому продолжают активные поиски аналогов со стабилизированной пространственной конфигурацией. В ИОХ на основе природного растительного сырья была синтезирована серия триазольных и пиразольных аналогов КС А4. Среди синтезированных соединений в тесте на зародышах морских ежей был отобран 5-(4-метоксифенил)-1-(3,4,5-триметоксифенил)-1,2,3-триазол (N-комбретатриазол-71).

Цель исследования. Сравнительное изучение цитотоксического и апоптотического действия 5-(4-метоксифенил)-1-(3,4,5-триметоксифенил)-1,2,3-триазол (N-комбретатриазол-71) на В- и Т-клеточных перевиваемых линиях злокачественных лимфоидных клеток человека.

Материалы и методы. Использовали линии Т-клеточного лимфоblastного лейкоза человека (MOLT-4, Jurkat) и лимфомы Беркитта (Namalwa). В качестве препарата сравнения применяли КС А4 фосфат ("OXiGENE", США). Уровень апоптоза и распределение клеток по фазам клеточного цикла определяли с помощью проточного цитометра FACSCalibur ("Becton Dickinson", США). Для выявления активной формы каспазы-3 использовали набор с моноклональными антителами ("BD Bioscience Pharmingen", США).

Результаты и выводы. N-комбретатриазол-71 проявляет цитотоксическое действие в отношении как Т-, так и В-клеточных линий злокачественных лимфоидных клеток человека. Токсичность N-комбретатриазола-71 для клеток Namalwa гораздо ниже, чем для клеток Jurkat или MOLT-4. Вместе с тем, дозовая зависимость по индексу торможения пролиферации для клеток Namalwa практически совпадает с таковой для клеток Jurkat и MOLT-4. N-комбретатриазол-71 в концентрациях, угнетающих пролиферацию клеток, блокирует прохождение цикла в фазе G₂/М. N-комбретатриазол-71 является индуктором каспазо-зависимого апоптоза в исследуемых клетках и не уступает по своей эффективности КС А4.

Исследования поддержаны грантами Государственного Фонда фундаментальных исследований Украины (№ Ф53.4/056) и Российского Фонда фундаментальных исследований (№13-03-90455).

И.Ю. Филлюшкина¹, Н.В. Голубцова¹, В.В.Новиков², М.А. Барышникова¹,
А.И. Чкалина², З.А. Соколова¹, Е.В. Борисова², П.К. Иванов¹, И.К. Воротников¹, А.Ю. Барышников¹
**ДИНАМИКА СЫВОРОТОЧНЫХ УРОВНЕЙ РАСТВОРИМЫХ АНТИГЕНОВ HLA I, CD18, CD54
И РАСТВОРИМЫХ КОМПЛЕКСОВ CD8-HLA I И CD18-54
У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

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

²ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

Задачи исследования. Исследовать содержание сывороточных уровней растворимых антигенов у больных раком молочной железы до хирургического удаления опухоли.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы сывороток периферической крови 64 больных раком молочной железы (РМЖ) II стадии до хирургического удаления опухоли. Больные были разделены на 2 группы. Группу №1 (n=58) состояла из нелеченных пациенток, а группу №2 (n=6) составили больные, которые перед операцией получали неоадьювантную терапию. В качестве контроля использовались образцы сывороток крови 63 здоровых женщин. Определение сывороточных уровней растворимых антигенов проводилось иммуноферментным методом, разработанным в Нижегородском госуниверситете им. Н.И.Лобачевского (Новиков В.В. и др., 2008) с использованием моноклональных антител серии ИКО (Барышников А.Ю., 1997) против соответствующих антигенов, меченных пероксидазой хрена, и поликлональных антител против мононуклеарных клеток периферической крови человека. Учет результатов проводился спектрофотометрически при длине волны 492 нм. Результаты выражали в условных единицах (МЕ/мл). Статистический анализ данных проводился с помощью пакета программ EXCEL 2003, STATISTICA 10.0, SPSS 20.0. Результаты считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и выводы. При проведенном исследовании выявлены различия в содержании растворимых форм антигенов HLA I, CD18, CD54 и растворимых комплексов CD8-HLA I и CD18-54 в образцах сывороток крови больных РМЖ II стадии перед хирургическим удалением опухоли. У нелеченных больных сывороточный уровень исследуемых антигенов был сопоставим с показателями в контрольной группе доноров. Повышенное содержание сывороточных уровней данных маркеров обнаружено у больных, получавших неоадьювантную терапию ($p < 0,05$).

Д.С. Хачатрян¹, К.Р. Матевосян², А.Л. Разинов¹
**СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 8-ТИОПУРИНА –
ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ АНТИОПУХОЛЕВЫХ СУБСТАНЦИЙ**

¹ФГУП «ИРЕА», Москва

²РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва

Актуальность. Общеизвестно значение химии пуринов в построении молекул биологически активных структур, особенно с противоопухолевым действием, например 6-тиопурин. В связи с этим любые новые попытки синтеза подобных структур или модификации методик их получения являются актуальной задачей.

Задачи исследования. Разработка препаративных методов синтеза 8-тиопуринсодержащих строительных блоков посредством реакции изотиоцианатов с аминокислотами, через промежуточные 2-тио-5-аминоимидазол-4-карбоксамиды. Создание библиотеки потенциально антиопухолевых субстанций путем дальнейшей функционализации полученных строительных блоков различными алкилаторами.

Материалы и методы. Исходя из коммерчески доступных изотиоцианатов методом тандемных превращений синтезированы 1-R(R=Alk, Ar, Het)-2-тиоимидазоламины. Кипячением последних с ортомуравьиными эфирами получены 9-R-производные-8-тиопурина с «горячими» NH- и SH- функциями, которые служили строительными блоками в создании как виртуальной, так и реальной библиотеки потенциально биологически активных субстанций. Структура полученных соединений подтверждена на основе анализа ЯМР и масс-спектров.

Результаты и выводы. Разработаны препаративные методы синтеза 8-тиопуринсодержащих строительных блоков. Создана комбинаторная библиотека тиопуринсодержащих субстанций с потенциальной антиопухолевой активностью путем алкилирования полученных 8-тиопуринсодержащих строительных блоков различными электрофилами. Исследуется противоопухолевая активность полученных субстанций в опытах *in vitro*.

И.П. Шилов¹, В.М. Маркушев², А.И. Панас¹, А.С. Рябов¹, В.Д. Румянцева¹, К.С. Щамхалов¹, А.В. Иванов³
ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ИТТЕРБИЕВЫХ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ 2, 4-ДИМЕТОКСИГЕМАТОПОРФИРИНА IX В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ ДМСО И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ОНКОЛОГИИ

¹Институт Радиотехники и Электроники им. В. А. Котельникова РАН, Фрязинский филиал

²Институт Радиотехники и Электроники им. В. А. Котельникова РАН, Москва

³ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Цель исследования. Изучение фотолюминесцентных свойств и создание наноразмерных субстанций на основе иттербиевых комплексов 2,4-диметоксигематопорфирина IX (ИКДГ) в водных растворах диметилсульфоксида (ДМСО) для люминесцентной диагностики (ЛД) эндоскопически и визуально доступных форм рака.

Материалы и методы. Изучение фотолюминесцентных свойств ИКДГ в водных растворах ДМСО осуществлялось на экспериментальном измерительном стробоскопическом стенде, разработанном в ИРЭ им. В. А. Котельникова РАН. Исследования люминесцентного диагностического контрастного индекса (ЛДКИ) осуществлялись на мышцах-самках линии Bulb/c с привитой опухолью Льюиса при дозах препарата на уровне 0,05-1,0 мг/кг веса с помощью макетного варианта лазерно-волоконного флуориметра (ЛВФ) разработки ФИРЭ им. В. А. Котельникова РАН.

Результаты. В соответствии с целью исследований было установлено, что такие органические растворители как ДМСО существенно улучшают фотофизические характеристики ИКДГ. Так время жизни люминесценции ИКДГ в 100% растворе ДМСО составило 22 мксек, что является рекордным результатом для ИМКП. В водно-органических растворах этот параметр испытывал существенное снижение и спад люминесценции имел при этом неэкспоненциальный характер, что обусловлено сильным тушением люминесценции колебаниями О-Н групп из ближайшего окружения иона иттербия. В связи с чем оптимальной к применению в медицинской практике нам представляется субстанция на основе ИКДГ в 20-30% растворе ДМСО (такие концентрации разрешены в медицинской практике при внутривенном введении). Интенсивность люминесценции ИКДГ в 20% растворе ДМСО увеличивается более чем в 2 раза на длине волны 980 нм по сравнению с чисто водным раствором ИКДГ, что делает такие комплексы перспективными для ЛД рака. Проведены исследования ЛДКИ опухоли/мышца с использованием ЛВФ и субстанции на основе водорастворимого комплекса ИКДГ в 20% растворе ДМСО на мышцах-самках линии Bulb/c с привитой опухолью Льюиса в режиме *ex vivo*. Показано, что ЛДКИ увеличивался с 16,5 (чисто водный раствор ИКДГ) до значений ~19,0.

Выводы. Синтезированы субстанции на основе ИКДГ в водных растворах ДМСО и исследованы их основные фотолюминесцентные свойства. Данные субстанции являются перспективными для использования в процедурах ЛД эндоскопически и визуально доступных форм рака.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Президиума РАН «Фундаментальные науки - медицине» за 2013г.

*Н.Ю. Шиягина¹, А.Б. Воловецкий¹, И.В. Балалаева¹,
А.В. Масленникова^{1,2}, М.А. Грин³, А.Ф. Миронов³, А.В. Феофанов^{4,5}*
ИЗУЧЕНИЕ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ ПРОИЗВОДНЫХ ХЛОРИНА Е6 С НАНОЧАСТИЦАМИ БОРА
ДЛЯ ЗАДАЧ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ И БОР-НЕЙТРОНЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Нижний Новгород

²Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

³МХТИ им. М.В. Ломоносова, Москва

⁴Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

⁵Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Задачи исследования. Оценка биологического распределения и степени накопления в опухоли нано-конъюгатов хлорина е6 с наночастицами бора, сочетающих в себе свойства фотосенсибилизатора и агента для БНЗТ.

Материалы и методы. Анализ биораспределения наноконъюгата был выполнен на мышцах линии Balb/c с перевитой опухолью Colo-26. Эксперимент проводился на 9–10 день, когда размер опухолевого узла достигал 5 мм. Животным в хвостовую вену вводили 10 мг/кг наноконъюгата в 5% растворе кремофора. Микроскопическое исследование органов *ex vivo* проводили на системе лазерной сканирующей микроскопии Axiovert 200M LSM510 META через 3 часа после введения препарата. Флуоресценцию возбуждали при 543 нм, регистрация спектров позволила идентифицировать сигнал, обусловленный накоплением в тканях конъюгата хлорина е6, на фоне сильной автофлуоресценции.

Результаты и выводы. Введение наноконъюгата приводило к появлению сильного сигнала флуоресценции с максимумом в области 670 нм, соответствующему флуоресценции хлорина е6, в опухолевой ткани. В скелетных мышцах, а также в мышечных стенках полых органов и коже, характерного пика на 670 нм не наблюдалось. Через 3 часа после инъекции значительное количество препарата оставалось в кровеносном русле. Кроме опухолевой ткани, зарегистрировано накопление конъюгата в печени, почках и селезенке. Тем не менее, во всех перечисленных органах, по результатам микроскопического анализа, содержание исследуемого соединения не превышало такового в опухоли ткани, что можно рассматривать как весьма многообещающий результат.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 13-04-00670 и 4-02-00715).

М.В. Ширманова¹, А.И. Гаврина¹, Н.А. Аксенова², А.Б. Соловьёва², Е.В. Загайнова¹
**ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ХЛОРИНА Е6
 С АМФИФИЛЬНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ НА ЖИВОТНЫХ С ОПУХОЛЕВОЙ МОДЕЛЬЮ РШМ-5**

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород,

²Институт химической физики РАН, Москва.

Актуальность. Хлориновые фотосенсибилизаторы (ФС) признаны перспективными агентами для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии опухолей ввиду поглощения и флуоресценции в красной области спектра, высокой фототоксичности. Однако их низкая водорастворимость создает проблемы с внутривенным введением, а недостаточно высокое накопление в опухоли снижает эффективность лечения. Использование биосовместимых полимеров позволяет получить водные формы хлориновых ФС, повышает интенсивность флуоресценции и фотодинамическую активность, но биологические свойства таких комплексов ФС с полимером мало изучены.

Задача исследования. Изучить влияния амфифильных полимеров на биораспределение хлорина е6 и его накопление в опухоли животных.

Материалы и методы. Работа выполнена на мышах линии СВА, самках, с подкожно привитой опухолью – рак шейки матки человека РШМ-5. Исследованы комплексы хлорина е6 с поливинилпирролидоном, поливиниловым спиртом, пльорониками F108 и F127. Кинетику накопления ФС в опухоли оценивали *in vivo* методом флуоресцентного имиджинга на установке IVIS-Spectrum. Абсолютное содержание в плазме крови, опухоли и органах животного определяли методом тканевой экстракции.

Результаты. Анализ флуоресценции опухолей *in vivo* показал, что максимальное накопление препаратов в опухоли наблюдается в интервале от 20 мин до 4 ч после инъекции. Максимальное отношение опухоль/норма достигается к 3 ч после инъекции и мало менялось в течение суток. Определены абсолютные концентрации ФС в органах и тканях животных. Максимальные концентрации препаратов выявлены в кишечнике и фекалиях, а минимальные в мышцах, мозге, яичниках и сердце. Наибольшая избирательность накопления в опухоли РШМ-5 характерна для комплекса хлорина е6 с поливиниловым спиртом: отношение опухоль/кожа составляет 16 (в контроле для чистого хлорина е6 – 3).

Выводы. Полученные результаты указывают на перспективность модификации хлорина е6 поливиниловым спиртом для доставки в опухоль и необходимость дальнейшего изучения фотодинамической активности комплекса.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 14-02-00738).

З.С. Шнраха¹, М.И. Кодесс², Г.Л. Левит², М.А. Ежикова², В.П. Краснов², Л.И. Смирнова¹
**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ АНАЛОГА
 ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ГОРМОНА МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР**

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

²ИОС. им. И.Я. Постовского УРО РАН, Екатеринбург

Актуальность. Метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – один из наиболее эффективных аналитических методов, отличающийся высокой специфичностью, чувствительностью и надежностью. ЯМР используется для испытания подлинности лекарственных веществ, которая может быть подтверждена либо по полному набору спектральных параметров, характеризующих структуру соединения, либо по наиболее характерным сигналам спектра.

Задачи исследования. Разработать методику определения подлинности аналога гипоталамического гормона (АГГ) методом ЯМР.

Материалы и методы. АГГ – пентапептид *Woc-Cys(Thp)-Phe-D-Trp-Lys(Z)-Thr-OMe*, синтезированный в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» РАМН. Метод исследования — мультаядерная ЯМР спектроскопия. Запись спектров проводили на ЯМР спектрометре Bruker AVANCE^{III} 500 при температуре 35 °С по стандартным методикам 1D и 2D экспериментов с использованием раствора АГГ в дейтерированном диметилсульфоксиде (DMSO-d₆). Структурную интерпретацию спектров ¹H, ¹³C и ¹⁵N проводили на основе анализа данных двумерных корреляционных 2D экспериментов (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC, и ¹H-¹⁵N HMQC).

Результаты. В спектре ЯМР ¹H характеристичными являются сигналы NH- и α-CH- протонов аминокислотных остатков, которые наблюдаются в диапазонах 11.0 – 6.6 и 4.7 – 4.0 м.д. соответственно. В спектре ¹³C АГГ практически все химически неэквивалентные углероды дают отдельные сигналы, за исключением некоторых сигналов ароматических углеродов и двух α-углеродов аминокислотных остатков Phe и Trp, сигналы которых сливаются в одну уширенную линию δс 53.36 м.д. Детальный анализ данных двумерного гетероядерного эксперимента 2D ¹H-¹³C HMBC позволил установить связи между соседними остатками вдоль пептидной цепи, и тем самым подтвердить последовательность аминокислот в пентапептиде. Отнесение сигналов ¹⁵N осуществляли с помощью двумерного эксперимента 2D ¹H-¹⁵N HMQC по корреляциям между азотами и NH-протонами с известными химическими сдвигами.

Выводы. Комбинация 1D и 2D ЯМР экспериментов на ядрах ¹H, ¹³C и ¹⁵N подтверждает структуру и химическую индивидуальность исследованного пентапептида АГГ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минпромторга РФ.

В.И. Штин, А.И. Рябова, В.А. Новиков, Е.Ц. Чойнзонов, К.Ю. Меньшиков, О.В. Черемисина

СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ ПОЛОСТИ НОСА И ПРИДАТОЧНЫХ ПАЗУХ

НИИ онкологии СО РАМН, Томск

Актуальность. Одним из перспективных методов интраоперационной визуализации опухоли и местной терапии является флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия. В НИИ онкологии СО РАМН разработан лечебный комплекс, включающий в себя лучевую терапию, оперативное вмешательство с флуоресцентной диагностикой и фотодинамической терапией.

Материалы и методы. Всем пациентам с опухолями полости носа и придаточных пазух $T_{2-4}N_{0-3}M_0$ проводится предоперационный курс дистанционной гамма-терапии на установке «Рокус-М». Через 3–5 дней выполняется хирургическое вмешательство в объеме комбинированной электрорезекции верхней челюсти с флуоресцентной диагностикой радикальности операции и фотодинамической терапией. Для проведения флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии используется фотосенсибилизатор «Фотодитазин» (ООО Вета-Гранд, регистрационный номер ЛС-001246). Препарат вводится за 2 часа до операции внутривенно капельно. После удаления опухоли выполняется контроль радикальности операции с использованием флуоресцентной диагностики и мазков-отпечатков со стенок послеоперационной полости. Затем проводится фотодинамическая терапия на ложе опухоли. Интраоперационная фотодинамическая терапия выполняется с применением полупроводникового лазера красного диапазона излучения «АЛЮД-01», длина волны излучения — 662 нм, выходная мощность излучения на торце кварцевого моноволокна от 0,1 до 2 Вт. Доза излучения — от 150 до 350 Дж/см².

Результаты. Проведено комбинированное лечение 8 пациентов с распространенными опухолевыми процессами полости носа и околоносовых пазух. В 7 случаях выполнено удаление опухоли и проведена фотодинамическая терапия. В одном случае фотодинамическая терапия проведена непосредственно на рецидивную опухоль, локализовавшуюся в проекции основания средней черепной ямки. На сегодняшний день максимальный срок наблюдения составил 18 месяцев. Признаков рецидива опухоли нет у 6 пациентов. В двух случаях зафиксирован продолженный рост опухоли в сроки от 1 до 3 месяцев.

Выводы. Таким образом комплексный подход к лечению пациентов с местно распространенными опухолями полости носа и придаточных пазух, с использованием фотодинамической терапии, позволяет повысить непосредственные и отдаленные результаты лечения, не оказывая влияния на качество жизни больных.

Н.А. Шуканова¹, Н.А. Козловская², М.А. Мартынова¹, Е.В. Шаповал², М.М. Молчан¹, И.М. Бушмакина¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТОВ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

²Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Минск, Беларусь

Задачи исследования. Изучение возможности использования разработанной нами новой тест-системы оценки индивидуальной чувствительности к химиопрепаратам опухоли пациенток с диагнозом рак молочной железы (РМЖ) для прогнозирования эффектов неoadьювантной полихимиотерапии (НПХТ).

Материалы и методы. Первичную культуру получали из трепан-биоптатов опухолей пациенток с диагнозом РМЖ. Гомогенат ткани в среде RPMI-1640 культивировали в CO₂-инкубаторе 48 - 64 ч. Лекарственные средства вносили в первичную культуру клеток РМЖ в концентрациях, соответствующих применяемым в клинической практике дозам. Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) определяли стандартным методом с использованием реактива Элмана. Концентрацию белка определяли по стандартному методу Лоури. Активность АХЭ клеток после культивирования в присутствии химиопрепаратов сравнивали с активностью АХЭ таких же клеток после культивирования без препаратов.

Результаты. Ранее нами было показано, что степень ингибирования химиопрепаратами активности АХЭ клеток РМЖ наиболее агрессивного базальноподобного подтипа в условиях *in vitro* и посттерапевтические изменения опухолей пациенток после НПХТ совпадали на 85%. Далее был проведен сравнительный анализ исходной активности АХЭ клеток РМЖ, культивируемых без химиопрепаратов, и рецепторного статуса опухоли после НПХТ. Установлено, что активность АХЭ клеток базальноподобной опухоли до начала лечения составляла 10,7±3,7 отн.ед. в том случае, если после НПХТ в опухоли были обнаружены только клетки люминального Б подтипа; если же после НПХТ в опухоли были обнаружены клетки Her2-позитивного подтипа, первоначальная активность АХЭ составляла 36,0±16,3. При этом активность АХЭ клеток опухоли, рецепторный статус которых оставался после НПХТ без изменения, была равна 79,0±20,4.

Выводы. Таким образом, определяя величину активности АХЭ в первичной культуре ткани РМЖ наиболее агрессивного базальноподобного подтипа, можно с определенной степенью достоверности прогнозировать результаты терапии.

С.В. Шуმიлова¹, Д.В. Новиков¹, А.Ю. Барышников², В.В. Новиков¹

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СИСТЕМЫ «ИНТЕРЛЕЙКИН-2 – ЕГО РЕЦЕПТОР» В КЛЕТКАХ ЛИНИЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва

Актуальность. Экспрессия функционального рецептора интерлейкина-2 (IL-2R) была обнаружена на клетках линий, полученных из различных солидных опухолей человека. В некоторых случаях IL-2 ингибирует рост раковых клеток (рак головы и шеи, рак желудка, рак почки). Для других опухолей описаны эффекты усиления роста и прогрессии при воздействии IL-2 (рак легкого, глиома, фибросаркома, меланома). Кроме того, секреция биологически активного IL-2 обнаружена в клетках линий некоторых меланом и рака молочной железы.

Цель исследования. Анализ экспрессии генов IL-2 и трех цепей его рецептора (IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ) на транскрипционном уровне в клетках линий, полученных от больных раком молочной железы HS578, MCF-7, T-47D.

Материалы и методы. Исследовали лизаты клеток перевиваемых линий HS578, MCF-7, T-47D (рак молочной железы). Анализ экспрессии генов IL-2, IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ проводили с использованием ОТ-ПЦР. Нуклеотидные последовательности транскриптов определяли путем секвенирования.

Результаты и выводы. В клетках линий HS578, MCF-7, T-47D обнаружена экспрессия генов IL-2, бета- и гамма-цепей его рецептора в различных сочетаниях. мРНК интерлейкина-2 детектирована только в клетках MCF-7. Отсутствие экспрессии гена IL-2 в линиях HS578 и T-47D может являться свидетельством независимости пролиферации данных клеток от эндогенного IL-2. мРНК IL-2R β обнаружена в клетках MCF-7, а мРНК IL-2R γ – в T-47D. Вероятным объяснением наличия мРНК лишь одной цепи рецептора из трех в линиях MCF-7 и T-47D является ее принадлежность к рецепторам других цитокинов (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21). мРНК IL-2R α не была детектирована ни в одной из исследованных линий. Предположительно, синтез мРНК IL-2R α в тестируемых изолированных культурах опухолевых клеток не происходит из-за отсутствия активатора, подобного активаторам синтеза IL-2R α в клетках гемопоэтической системы (TGF- β , CD28, IL-1 и др.). Возможно также, что индукция экспрессии гена IL-2R α в линиях HS578, MCF-7, T-47D происходит только после воздействия экзогенного IL-2.

Работа выполнена в рамках базовой части государственного задания №2014/134 Минобрнауки России (проект 2575).

Д.В. Южакова¹, М.В. Ширманова¹, И.Н. Дружкова¹, Г.С. Перельман¹, А.П. Рюмина², Е.А. Серебровская², С.А. Лукьянов^{1,2}, Е.В. Загайнова¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ АКТИВАЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА МАЛЫМИ ДОЗАМИ ЦИКЛОФОСФАНА НА ОПУХОЛЯХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК KILLERRED

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

²Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Актуальность. Известно, что опухоль способна уклоняться от иммунологического надзора посредством нескольких факторов, в том числе благодаря защите Т-регуляторными клетками (Sitkovsky, 2008). В ряде экспериментальных работ стимуляция иммунного ответа организма против опухоли осуществлялась посредством малых доз циклофосфана, ингибирующего данные клетки (Castano, 2008; Levy, 2009). Но данный подход пока не нашёл широкого применения в лечении опухолей и требует изучения.

Цель исследования. Оценка иммуногенности фототоксичного флуоресцентного белка KillerRed и изучение возможности ингибирования роста опухоли, экспрессирующей KillerRed, малой дозой циклофосфана.

Материалы и методы. Работа проводилась на мышах линии Balb/c с подкожно привитой опухолью колоректальный рак мышей Colo26. Для оценки иммуногенности белка KillerRed оценивался рост опухолей, экспрессирующих KillerRed и без него, у животных с ранее удаленной опухолью, экспрессирующей KillerRed. В эксперименте по лечению опухолей циклофосфаном препарат вводили внутривенно в дозе 50 или 150 мг/кг на 5-й или 7-й день роста опухоли соответственно. Выполнялся анализ динамики роста и флуоресценции опухоли.

Результаты. Повторная прививаемость опухоли, экспрессирующей KillerRed, составляет 43 %, опухоли без белка – 78 %, в то время как первичная прививаемость данной опухоли составляла 80 %, что указывает на иммуногенность белка KillerRed. Установлено, что использование малой дозы циклофосфана вызывает значительное замедление роста опухолевого узла, сопоставимое с применением терапевтической дозы 150 мг/кг. Эффект малой дозы циклофосфана на опухоли Colo26 без KillerRed был менее выражен.

Выводы. Таким образом, применение малой дозы циклофосфана в комбинации с белком KillerRed оказало стимулирующее воздействие на иммунную систему и привело к существенному снижению скорости роста опухоли.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Договор № 11.G34.31.0017).

Т.Л. Юркишович¹, Н.В. Голуб¹, П.М. Бычковский¹, С.О. Соломевич¹, В.А. Алиновская¹,
Р.И. Костерова², Н.К. Юркишович¹, В.А. Будевич¹, Ю.П. Истомин², Е.Н. Александрова²

МИКРОГЕЛИ ФОСФАТОВ ДЕКСТРАНА В КАЧЕСТВЕ ПОЛИМЕРОВ-НОСИТЕЛЕЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ВЕЩЕСТВ

¹Учреждение БГУ «НИИ физико-химических проблем», Минск, Беларусь

²РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

Цель исследования. Получение иммобилизованных форм противоопухолевых веществ основного (проспидин) и цвиттерионного (α -2b-интерферона) характера на основе микрочастиц фосфатов декстрана (ФД), оценка их противоопухолевой активности в модельных опытах *in vitro*.

Материалы и методы. К тестированию были представлены иммобилизованные формы проспидина и α -2b-интерферона, а также ФД, полученные этерификацией ортофосфорной кислотой в расплаве мочевины с содержанием фосфорнокислых групп в интервале от 7,0% до 11,8 %. Эффективность противоопухолевого действия иммобилизованных форм противоопухолевых веществ в виде гидрогелей в условиях *in vitro* исследована на монослойной культуре опухолевых клеток HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, клон М). Оценка роста культуры опухолевых клеток в опытных группах иммобилизованных форм проспидина и α -2b-интерферона по отношению к контролю проведена на основании показателя эффективности противоопухолевого действия ИК₅₀. Определение острой токсичности гидрогелей ФД проведено на крысах (каждая серия по 4 крысы весом 200-250 г).

Результаты. Установлено, что фосфаты полисахаридов относятся к классу малотоксичных веществ и LD₅₀ составляет около 5000 мг/кг. Установлено, что цитостатическая активность исследованных иммобилизованных форм и ФД носит дозозависимый характер. Введение в состав микрогеля ФД проспидина приводит к уменьшению ИК₅₀ в 2 раза, т.е. цитостатическая активность препарата в виде гидрогеля выше по сравнению с инъекционной формой нативного проспидина. Включение α -2b-интерферона в состав микрочастиц ФД (массовое соотношение ФД : интерферон = 600 : 1) вызывает статистически достоверный цитотоксический эффект, который достигает 99 %. Изучена динамика высвобождения проспидина и α -2b-интерферона из пространственной сетки ФД в условиях *in vitro* и установлен эффект пролонгированного действия.

Выводы. Модификация декстрана смесью ортофосфорной кислоты и мочевины приводит к образованию малотоксичных соединений, обладающих противоопухолевым действием и эффективных для использования в качестве полимеров-носителей противоопухолевых препаратов проспидина и α -2b-интерферона.

Р.И. Якубовская¹, Е.А. Плотникова¹, Н.Б. Морозова¹, А.Д. Плютинская¹, Е.А. Лукьянец²

ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ: МЕЗО-ТЕТРА(3-ПИРИДИЛ)БАКТЕРИОХЛОРИН

¹ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава РФ, Москва

²ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Москва

Актуальность. Успешное применение метода ФДТ для лечения злокачественных новообразований стимулирует поиск новых фотосенсибилизаторов (ФС) с улучшенными свойствами.

Задачи исследования. Был синтезирован чисто синтетический ФС - мезо-тетра(3-пиридил) бактериохлорин (H₂Ru₄BC), имеющий поглощение в ближней ИК-области спектра ($\lambda_{\text{max}} = 747 \pm 2$ нм), изучены его фотофизические свойства и специфическая активность в системах *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. ФС получали двухстадийным синтезом, исходя из пиррола и 3-пиридинальдегида. Для его солюбилизации в водных растворах использовали неионогенный ПАВ Cremophor EL (4%-ный раствор). Фотофизические свойства оценивали с помощью абсорбционного и флуоресцентного методов анализа. Фотоактивность изучали на опухолевых клетках человека HEp2 и EJ, варьируя концентрацию ФС (от 13 до 3200 нМ), время инкубации (от 30 минут до 6 часов) при плотности энергии 10 Дж/см². Фотоиндуцированную противоопухолевую активность и биораспределение H₂Ru₄BC изучали на мышах BDF₁ с опухолью S37, фармакокинетику – на интактных мышах. Облучение проводили светодиодным источником с длиной волны 754 $\pm$ 14 нм, биораспределение и фармакокинетику оценивали методом локальной флуоресцентной спектроскопии.

Результаты. Показано, что бактериохлорин стабилен в течение 6 месяцев в затемненных условиях и устойчив при облучении. ФС проявил высокую фотоиндуцированную активность при 4-х часов инкубации, величина ИК₅₀ составляла 32 $\pm$ 2 нМ и 35 $\pm$ 3 нМ для клеток HEp2 и EJ, соответственно. В опухолевой ткани нормированная флуоресценция ФС достигала максимального значения через 5 минут и сохранялась на высоком уровне в течение 1 часа. Выявлена высокая противоопухолевая эффективность ФС в дозах 1,0 и 2,5 мг/кг и облучении через 0,5 и 2 часа после введения: ТРО составляло 70-100%, КИ – 25-100% и УПЖ – 80-131%. H₂Ru₄BC полностью выводился из организма млекопитающих через 7 суток после введения, в коже регистрировался до 5 суток.

Выводы. Таким образом, мезо-тетра(3-пиридил) бактериохлорин является высокоактивным фотосенсибилизатором нового поколения, поглощающий в ближней ИК-области спектра, стабилен при хранении и устойчив при облучении, проявляет высокую фотоиндуцированную противоопухолевую эффективность в системах *in vitro* и *in vivo*, за счет селективного накопления в опухоли и быстрого выведения из организма животных.

Е.В. Ярославцева-Исаева, М.А. Каплан, В.Н. Капинус, И.С. Спиченкова, Е.В. Горанская

ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ ХЛОРИНОВОГО РЯДА

ФГБУ МРНЦ Минздрав, Обнинск, Московская область

Актуальность. Почти все злокачественные опухоли мягких тканей относятся к саркомам. Это большая группа новообразований разнообразного генеза. Саркомы мягких тканей составляют по данным различных авторов 0,5–4 % всех злокачественных опухолей человека и до настоящего времени остаются одним из наименее изученных разделов клинической онкологии.

Цель исследования. Оценить эффективность фотодинамической терапии (ФДТ) больных злокачественными новообразованиями мягких тканей без поражения мышц и костей.

Материалы и методы. С 2000 по 2013 гг. проведены курсы ФДТ 12 больным злокачественными новообразованиями мягких тканей без поражения мышц и костей, среди которых 5 больных с саркомой Капоши (3 – н/конечности, 1 – головка полового члена, 1 – ушные раковины), 3 больных с дерматофибросаркомой волосистой части головы, 2 больных с злокачественной фиброзной гистиоцитомой, 1 больной с ангиосаркомой волосистой части головы, 1 больная с нейрофибросаркомой левой щеки. У всех больных диагноз гистологически верифицирован и соответствовал T1–2v N0M0

(IA-IIA клинической стадии). Использовали ФС «Фотолон» в/в капельно в дозе 1,1–1,5 мг/кг, ФС «Фотодитазин», 0,6–0,8 мг/кг. Облучение проводили дистанционно, у 2 больных контактно, 1 больной интерстициально на лазерных аппаратах «Латус», «Аткус» (662нм). Количество курсов 1–4, доза лазерного облучения от 150–400 Дж/см².

Результаты. Непосредственно после лечения у всех больных наблюдали признаки геморрагического некроза, через 1–2 недели формировался струп. Через 3 месяца у 10 больных получена полная регрессия, у 2 с гистиоцитомой – частичная регрессия. На сроках наблюдения от 7 мес. до 3 лет выявлены рецидивы у 2 больных с саркомой Капоши (новые очаги), им проведены повторные курсы. Отдаленных и регионарных метастазов выявлено не было.

Выводы. Больным злокачественными новообразованиями мягких тканей без поражения мышц и костей, IA-IIA клинических стадий, возможно проведение фотодинамической терапии с фотосенсибилизаторами хлоринового ряда в качестве альтернативы хирургическому лечению.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН



**ДВУХЦВЕТНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ
МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МКА СЕРИИ ІСО,
КОНЬЮГИРОВАННЫХ С ЦИАНИНОВЫМ КРАСИТЕЛЕМ ІМD-306**

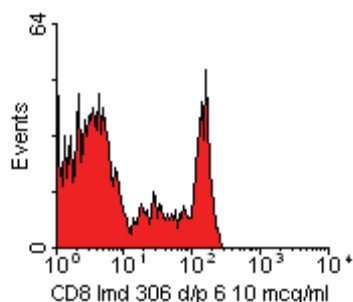


Рис. 1. Экспрессия антигена CD8 на лимфоцитах донора, выявляемая с помощью конъюгата CD8lmd-306 с ПМ 6:1 и концентрацией 10 мкг/мл.

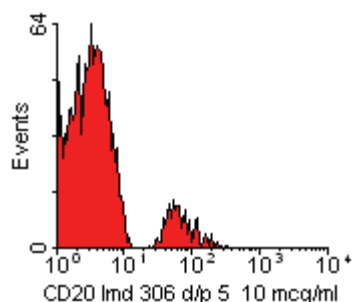


Рис. 2. Экспрессия антигена CD20 на лимфоцитах донора, выявляемая с помощью конъюгата CD20lmd-306 с ПМ 5:1 и концентрацией 10 мкг/мл.

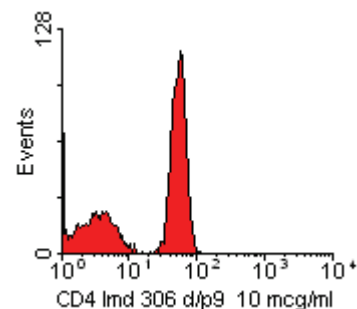


Рис. 3. Экспрессия антигена CD4 на лимфоцитах донора, выявляемая с помощью конъюгата CD4lmd-306 с ПМ 9:1 и концентрацией 10 мкг/мл.

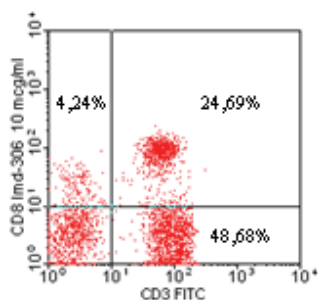


Рис. 4. Двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD8lmd-306 с ПМ 6:1 и рабочей концентрацией 10 мкг/мл.

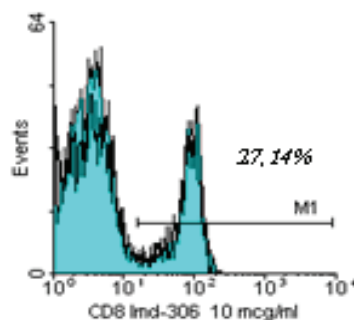


Рис. 5. Одно- и двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD8-lmd-306 с ПМ 6:1 и рабочей концентрацией 10 мкг/мл. Серым цветом выделена гистограмма для монометрического анализа, черным контуром-гистограмма для двухцветного анализа.

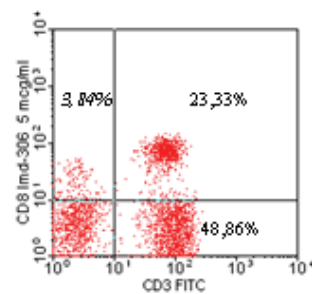


Рис. 6. Двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD8lmd-306 с ПМ 6:1 и рабочей концентрацией 5 мкг/мл.

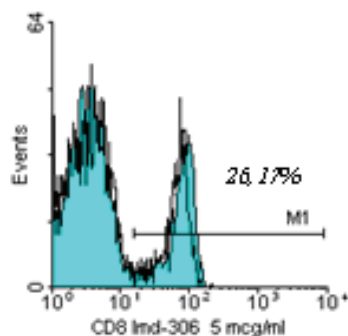


Рис. 7. Одно- и двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD8lmd-306 с ПМ 6:1 и рабочей концентрацией 5 мкг/мл. Серым цветом выделена гистограмма для монометрического анализа, черным контуром-гистограмма для двухцветного анализа.

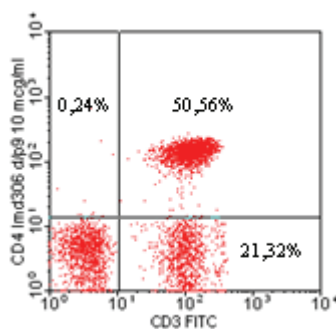


Рис. 8. Двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD20lmd-306 с ПМ 5:1 и рабочей концентрацией 20 мкг/мл.

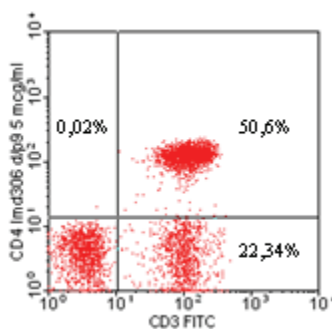


Рис. 9. Одно- и двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD20lmd-306 с ПМ 5:1 и рабочей концентрацией 20 мкг/мл. Серым цветом выделена гистограмма для монометрического анализа, черным контуром-гистограмма для двухцветного анализа.

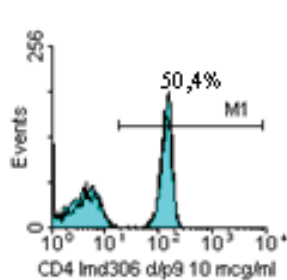


Рис. 10. Двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD20Imd-306 с ПМ 5:1 и рабочей концентрацией 10 мкг/мл.

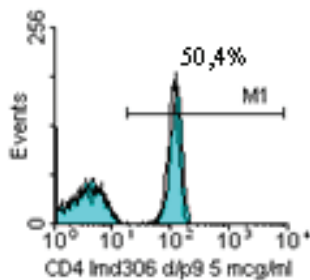


Рис.11. Одно- и двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD20Imd-306 с ПМ 5:1 и рабочей концентрацией 10 мкг/мл. Серым цветом выделена гистограмма для монометрического анализа, черным контуром-гистограмма для двухцветного анализа.

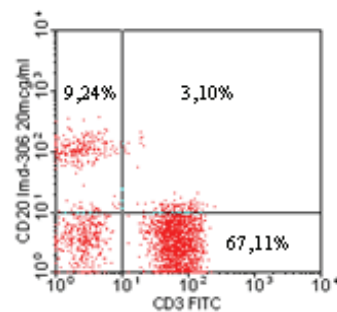


Рис. 12. Двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD4Imd-306 с ПМ 9:1 и рабочей концентрацией 10 мкг/мл.

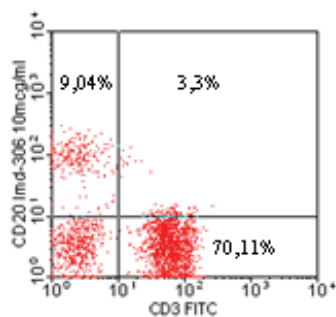


Рис. 13. Одно- и двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD4Imd-306 с ПМ 9:1 и рабочей концентрацией 10 мкг/мл. Серым цветом выделена гистограмма для монометрического анализа, черным контуром-гистограмма для двухцветного анализа.

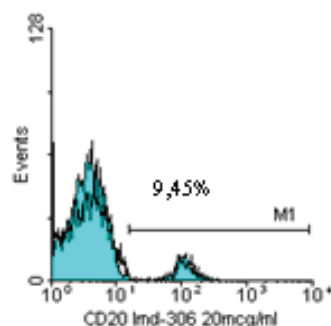


Рис. 14. Двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD4Imd-306 с ПМ 9:1 и рабочей концентрацией 5 мкг/мл.

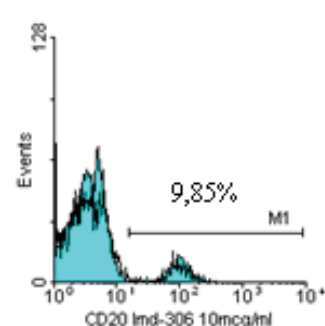


Рис. 15. Одно- и двухцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD4Imd-306 с ПМ 9:1 и рабочей концентрацией 5 мкг/мл. Серым цветом выделена гистограмма для монометрического анализа, черным контуром-гистограмма для двухцветного анализа.

НАУЧНЫЕ ЖУРНАЛЫ РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН

