

использования рутинных мазков затрудняло постановку цитологического диагноза. Таким образом, для установления цитологического диагноза по жидкостным препаратам в обоих случаях необходимо проводить исследование совместно с традиционными цитологическими мазками.

Полученные с помощью жидкостных технологий препараты можно использовать для проведения иммуноцитохимического исследования. Уменьшается расход дорогостоящих реактивов, что особенно важно при иммуноцитохимических и молекулярно-генетических исследованиях. Выраженность экспрессии антител совпадает при использовании обеих жидкостных методик, но в препаратах, приготовленных с помощью аппарата E-Prep, отмечались более чистый фон, большее число патологических клеток в мазке, что значительно облегчает оценку реакции, сокращая время просмотра мазка. Благодаря достоинствам препаратов, приготовленных с помощью аппарата E-Prep, удалось провести иммуноцитохимию в 3 из 18 случаев. В 2 случаях центрифужные препараты оказались неинформативны из-за большого числа элементов крови, и в 1 большое количество клеточного детрита не позволило провести иммуноцитохимию.

Монослойные препараты с хорошо сохранившимися клетками на определенной фиксированной площади позволяют использовать современные компьютерные технологии обработки изображений, проведения морфометрии.

Однако существуют и недостатки жидкостных препаратов, среди которых являются следующие.

Цитолог в своем заключении опирается не на одну, отдельно взятую клетку, а на совокупность клеток. Часто большое значение придается взаимному расположению клеток и их взаимодействию с элементами стромы, что нарушается при получении жидкостных препаратов и в большинстве случаев требует просмотра их совместно с рутинными цитологическими мазками.

Большое значение для оценки процесса имеет фон препарата, в жидкостных препаратах он значительно снижен или отсутствует – эритроциты, нейтрофильные лейкоциты, лим-

фоциты, детрит, миксоидное вещество, что лишает цитолога дополнительной диагностически важной информации.

Морфология клеток в жидкостных препаратах отличается по сравнению с рутинными цитологическими препаратами, необходим опыт в просмотре таких препаратов.

Метод жидкостной цитологии позволяет получать высококачественные стандартные, монослойные цитологические препараты, является более эффективным, чувствительным в сравнении с рутинным методом. Он может успешно использоваться в диагностике опухолей молочной железы, щитовидной, слюнной железы, опухолей мягких тканей, выпотных жидкостей, метастазов в лимфатические узлы в сочетании с рутинным методом, так как в настоящее время еще нет достаточно накопленного опыта в просмотре таких препаратов (изменены морфология клеток, фон, пространственное расположение клеток).

Цитологические препараты, приготовленные методом жидкостной цитологии, могут успешно применяться для проведения иммуноцитохимического исследования, морфометрии, компьютерной обработки изображений. Более тщательный анализ структур клетки достигается благодаря равномерному распределению клеточного материала на стекле, хорошо визуализирующимся деталям ядра и цитоплазмы, чистому фону, значительному снижению числа элементов воспаления, эритроцитов, артефактов. Наряду с этим надо отметить, что метод жидкостной цитологии в сравнении с рутинным имеет свои морфологические особенности, которые необходимо учитывать: вид и снижение фона, структурные изменения, такие как преимущественно разрозненное расположение клеток, фрагментация крупных клеточных скоплений, нарушение эпителиально-стромального соотношения, уменьшение размера клеток, отдельные клетки приобретают более округлую или вытянутую форму, разреженный хроматин. Описание особенностей морфологии жидкостных цитологических препаратов при патологических процессах различных локализаций позволяет накопить необходимый опыт и в целом улучшить качество постановки морфологического диагноза.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В. В. Делекторская. Нейроэндокринные опухоли: эпидемиология, номенклатура, лабораторная и морфологическая диагностика. ФГБУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Нейроэндокринные опухоли (НЭО) были впервые описаны в конце XIX века. Данная группа новообразований обладает общей способностью синтезировать биологически активные вещества и включает широкий спектр относительно редких опухолей, правильная диагностика, клинико-морфологическая характеристика и оценка особенностей «биологического поведения» которых являются необыкновенно сложной и актуальной задачей.

Эпидемиология. НЭО могут возникать в любых органах, но наиболее часто локализованы в различных отделах пищеварительной системы, легких и бронхах. Частота возникновения данных опухолей увеличилась приблизительно в 5 раз за последние 30 лет, что частично может быть связано с улучшением и расширением возможностей диагностики. С помощью регрессионного анализа показано, что частота встречаемости НЭО в 2013 г. составит 8 случаев на 100 000 населения.

Номенклатура. Различия в терминологии часто вызывают трудности в оценке этих опухолей. В настоящее время подразумевается, что все НЭО обладают злокачественным потенциалом и их нельзя рассматривать как доброкачественные новообразования. В соответствии с классификацией ВОЗ

2010 г. выделяют 2 основных типа нейроэндокринных новообразований: нейроэндокринная опухоль (высокодифференцированная) и нейроэндокринная карцинома (низкодифференцированная, НЭК). Различная степень злокачественности этих опухолей (Grade, G1, G2, G3) основана на оценке гистологии и определении пролиферирующей фракции (уровня митотической активности и индекса Ki67).

Лабораторная и морфологическая диагностика. Углубленное изучение НЭО позволило выделить маркеры нейроэндокринной дифференцировки клеток, которые представляют следующие классы молекул: ассоциированные с секреторными гранулами, ассоциированные с синаптическими пузырьками, промежуточные филаменты, адгезивные молекулы, цитозольные. Два основных маркера хромогранин А и синаптофизин рекомендованы для обязательного использования в процессе морфологической диагностики НЭО. Важно отметить, что хромогранин А, который продуцируется и секретируется нейроэндокринными клетками, может определяться в сыворотке и плазме крови при биохимическом исследовании, а также в ткани опухоли при иммуногистохимическом (ИГХ) анализе. Уровни хромогранина А в плазме крови используются для мониторинга ответа на терапию. Морфологическая верификация нейроэндокринного характера опухоли принципиально важна для выбора тактики лечения пациента. НЭО различной локализации классифицируются в соответствии со статусом дифференцировки и типом

опухолевых клеток. Иммуногистохимическое определение индекса пролиферации и соответственно Grade помогает химиотерапевтам классифицировать нефункционирующие НЭО на 3 различные группы в соответствии с мишенями для терапии. Гормоны, определяющие специфический тип секреции клеток опухоли, в отличие от хромогранина А не относятся к факторам, которые нужно выявлять обязательно при ИГХ-исследованиях НЭО. Перспективным направлением исследования НЭО является определение ИГХ маркеров лекарственной чувствительности, к которым относятся рецепторы соматостатина, молекулы сигнального пути mTOR, MGMT и ряд других факторов.

НЭО – сложные и относительно редкие опухоли, исследование которых с использованием современных биохимических и иммуногистохимических методов является основой не только для проведения точной диагностики и дифференциальной диагностики, но и для получения оптимальных результатов лечения данной патологии, а также для внедрения в практику научных разработок и новых методов терапии.

Н. С. Сергеева, Н. В. Марицутина, И. И. Алентов, М. П. Солохина. Серологические маркеры СА 125 и HE4 в мониторинге больных распространенным раком яичников. ФГБУ МНИОИ им. П. А. Герцена Минздравсоцразвития РФ, Москва

Цель – сравнить динамику изменения СА125 и HE4 в мониторинге больных раком яичников (РЯ) на этапах лечения и наблюдения.

В сыворотке крови 18 больных РЯ, из которых 15 имели серозный, 2 – эндометриоидный и 1 – недифференцированный рак, оценили концентрацию HE4 на анализаторе Architect (AbbottDiagnostics, США) с использованием наборов «ARCHITECTHE4 assay» (AbbottDiagnostics, США), уровень СА125 – на анализаторе AxSym (AbbottDiagnostics, США) с использованием наборов «СА 125-AxSym» (AbbottDiagnostics, США) в динамике лечения и наблюдения.

Для всех точек измерения обоих маркеров, полученных при динамическом наблюдении каждой пациентки, было высчитано отношение абсолютного значения маркера к значению его дискриминационного уровня. В качестве дискриминационного уровня СА125 было выбрано значение 35 ед/мл, для HE4 – 70 пмоль/л у пациенток в пременопаузе и 140 пмоль/л у пациенток в постменопаузе. В большинстве случаев изменения уровней обоих маркеров коррелировали с ответом на лечение и клиническим течением болезни. При этом у 12 пациенток динамика изменений СА 125 как в процессе лечения, так и в процессе развития рецидивов оказалась более выраженной, чем HE4, у двух больных HE4 имел преимущества по сравнению с СА 125 и у 4-х – динамика обоих маркеров оказалась сходной.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ряде случаев HE4 может дать дополнительную информацию о динамике опухолевого процесса при РЯ.

Е. С. Герштейн, В. В. Пророков, Е. А. Короткова, В. В. Делекторская, Д. А. Головков, Н. Е. Кушлинский. Прогностическое значение опухолясоциированных протеиназ у больных раком толстой кишки. ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Разработка новых подходов к лечению рака толстой кишки (РТК) – важная проблема онкологии, привлекающая пристальное внимание клиницистов, поскольку, несмотря на успехи, достигнутые в диагностике и совершенствовании хирургических методов лечения, смертность от этого заболевания остается довольно высокой. Многие исследователи связывают дальнейший прогресс в повышении эффективности лечения РТК не только с рациональным использованием комбинированных и комплексных методов лечения, но и с разработкой принципиально новых патогенетических методов терапии, основанных на современных достижениях в изучении биохимии и молекулярной биологии опухолей.

Известно, что одним из основных механизмов инвазии злокачественных опухолей является разрушение окружающей базальной мембраны и внеклеточного матрикса (ВКМ) ассоциированными с опухолью протеиназами, играющими также важную роль в процессах метастазирования и неоангиогенеза. В опухолевой инвазии задействовано несколько классов протеиназ, к важнейшим из которых следует отнести семейство матриксных металлопротеиназ или матриксин, названных так за свою способность специфически гидролизовать все основные белки ВКМ, а также активирующий их протеолитический каскад активации плазминогена с образованием пламина. Важную роль в регуляции инвазии и метастазирования играют также природные ингибиторы этих протеиназ: тканевые ингибиторы ММП (ТИМП) и ингибиторы активаторов плазминогена – PAI-1 и PAI-2.

Цель исследования – проанализировать взаимосвязь содержания ММП-2, 7, 9, ТИМП-1, 2, а также uPA, tPA и PAI-1 с основными клинико-морфологическими особенностями РТК, а также прогнозом выживаемости пациентов и на основании полученных результатов оценить возможное клиническое значение определения данных маркеров при РТК.

В исследование вошли 2 группы пациентов. 1-я группа – 67 больных РТК (38 мужчин и 29 женщин) в возрасте от 38 до 78 лет (медиана – 62 года), лечившихся в ФГБУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН в 2000 г. и прослеженных в течение 6–134 мес (медиана – 59 мес) после операции; у этих пациентов определяли концентрацию uPA, PAI-1 и tPA в цитозолях тканей с помощью наборов реактивов для иммуноферментного анализа, разработанных в Католическом Университете г. Наймеген (Нидерланды). 2-я группа – 9 больных РТК (50 мужчин и 49 женщин) в возрасте от 37 до 80 лет (медиана – 61 год), оперированных в отделении проктологии ФГБУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН в 2005–2008 гг., у которых в экстрактах опухолей и участках гистологически не измененной слизистой толстой кишки, а также в плазме крови, полученной до начала лечения и через 5–27 дней после операции, определяли содержание ММП-2, 7, 9, ТИМП-1 и ТИМП-2 стандартными наборами для прямого иммуноферментного анализа серии Quantikine® (R&D Systems, США). При сравнении и анализе взаимосвязи показателей использовали непараметрические критерии: парный тест Вилкоксона, тест Манна-Уитни и тест корреляции рангов Спирмена (R). Выживаемость больных оценивали методом Каплана-Мейера (при сравнении кривых использовали F-тест Кокса), а также использовали регрессионную многофакторную модель Кокса. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica (версия 8.0).

Содержание uPA, tPA и PAI-1 в опухолях и окружающей неизменной слизистой толстой кишки не зависело от ключевых клинико-морфологических особенностей РТК, что не исключало их потенциальной роли в качестве независимых факторов прогноза выживаемости больных. Для проверки этой гипотезы были проанализированы результаты более чем 10-летнего наблюдения за обследованными пациентами с учетом концентрации изучаемых белков в опухоли. В качестве пороговых значений рассматривали по два уровня для каждого маркера: показатель медианы и показатель верхнего квартиля концентрации в опухоли. В целом по группе достоверного влияния на выживаемость пациентов ни для одного из исследуемых маркеров не обнаружено. В прослеженной группе было всего 2 пациента с I стадией заболевания и 4 – со II, все они живы в течение всего периода наблюдения. Достоверное влияние на выживаемость больных РТК с III стадией оказывал только уровень PAI-1 в опухоли: при содержании этого маркера, равном или выше верхнего квартиля (3,17 нг/мг белка), 10-летняя выживаемость пациентов была более чем вдвое меньше, чем у пациентов с меньшим уровнем PAI-I. При этом, если во всех остальных подгруппах медиана выживаемости либо не была достигнута за весь период наблюдения, либо превышала 100 мес, то в подгруппе

больных с III стадией и уровнем PAI-1 $\geq 3,17$ нг/мг белка, она составила всего 63 мес. Выживаемость больных РТК с IV стадией достоверно не зависела от уровня экспрессии изученных компонентов системы активации плазминогена в опухоли. Дополнительно была проанализирована выживаемость больных с использованием в качестве пороговых значений уровней маркеров, соответствующих верхней границе нормы (95% показателей неизменной слизистой). Достоверных различий в зависимости от уровней tPA и tPA и в этом случае выявлено не было, а для PAI-1 выживаемость больных с высоким (более 4,0 нг/мг белка) и низким уровнем маркера в опухоли различалась еще больше, чем при пороговом значении 3,17 нг/мг белка.

Анализ результатов 5-летнего наблюдения показал, что высокие уровни ММП-7 (более 4,0 нг/мл) и ТИМП-1 (более 347 нг/мл) в плазме крови являются факторами неблагоприятного прогноза РТК в общей группе пациентов. Далее мы проанализировали, каким образом концентрация ММП и ТИМП в плазме крови и опухоли влияет на выживаемость в зависимости от степени распространенности опухолевого процесса. Для этого все больные были разделены на 3 группы в зависимости от наличия лимфогенных и гематогенных метастазов: I группа – без лимфогенных и гематогенных метастазов $T_{1-4}N_0M_0$ (41); II группа – только с лимфогенными метастазами $T_{1-4}N_0M_0$ (23); III группа – с диссеминированным процессом $T_{1-4}N_{0+}M_+$ (23). В группе I достоверные различия выявлены только для ММП-7 плазмы крови: выживаемость больных с низким плазматическим содержанием ММП-7 составила 100%, а пациентов с высоким уровнем маркера – всего 60% ($p = 0,0003$). В группе II ни один из маркеров не влиял на выживаемость пациентов. В то же время выживаемость больных с диссеминированным процессом зависела не только от уровня ММП-7 в плазме крови, но и от содержания этой протеиназы в опухоли. В группе с низкой концентрацией ММП-7 в плазме 3-летняя выживаемость составила 65%, а в группе с высокой концентрацией – только 8% ($p = 0,007$); 5-летнюю выживаемость в этой группе проследить не удалось). В подгруппе с низким содержанием ММП-7 в опухоли (менее 7,8 нг/мг белка) медиана выживаемости составила 15,6 мес, а при более высоком уровне ММП-7 – 9,2 мес ($p = 0,03$). У больных диссеминированным РТК проявилось и прогностическое значение содержания ТИМП-1 в плазме крови: при низком уровне маркера медиана выживаемости не достигнута, а при высоком она составила всего 9 мес, выживаемость – 57 и 11% соответственно ($p = 0,01$). При многофакторном анализе, включавшем стадию заболевания, локализацию, гистологическое строение (степень дифференцировки), глубину инвазии опухоли, наличие лимфогенных или гематогенных метастазов, а также все исследованные биохимические показатели, уровни ММП-7 и ТИМП-1 в плазме крови оказались независимыми факторами прогноза РТК ($p = 0,02$ и $0,006$ соответственно) наряду с показателем гематогенного метастазирования $M+$.

При исследовании компонентов системы активации плазминогена показано, что значимым, но не независимым фактором неблагоприятного прогноза общей 5- и 10-летней выживаемости больных РТК является высокое содержание PAI-1 в опухоли, роль которого достоверно выражена преимущественно у пациентов III стадии. Высокие предоперационные уровни ММП-7 и ТИМП-1 в плазме крови являются независимыми факторами неблагоприятного прогноза РТК, а при однофакторном анализе неблагоприятное прогностическое значение имеет и высокий уровень ММП-7 в опухоли больных с диссеминированным процессом.

А. Н. Понукалин, В. М. Попков, Н. Б. Захарова, В. Ю. Михайлов. Перспективы включения молекулярных маркеров в стандарты диагностики и стадирования рака мочевого пузыря. НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ГБОУ ВПО Саратовского ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России

Как известно, стадия рака мочевого пузыря (РМП) определяет вид, характер лечения и прогноз заболевания для пациента. Однако частота ошибок, при определении стадии РМП в настоящее время достигает 73%. Считается, что диагностическое значение биомаркеров при РМП недостаточно изучено. Окончательно не определен основной перечень серологических и мочевых биомаркеров в ранней диагностике РМП и при выборе оптимальной тактики хирургического и патогенетического лечения заболевания.

Цель исследования – определение перечня молекулярных маркеров ранней диагностики РМП и при выборе оптимальной тактики хирургического и патогенетического лечения заболевания. Проведено обследование 121 больного, с диагнозом рака мочевого пузыря – 76 человек, группа контроля – 25 пациентов. Группу сравнения составили 20 пациентов с циститом и мочекаменной болезнью. Из 76 пациентов с раком мочевого пузыря в группы с немышечно-инвазивным РМП (НМИРМП) (T_a – T₁ N₀ M₀) включены 16 человек, мышечно-инвазивным РМП (МИРМП) (T_{2a} N₀ M₀; T_{3a} N₀ M₀) – 39 человек и раком, прорастающим и выходящим за пределы стенки мочевого пузыря (T_{3b} N₀ M₀ – 14; T_{3b} N₁ M₀₋₆; T₄ N₁ M₁₋₁) – 21 человек. При гистологическом исследовании у всех 76 больных диагностирован переходноклеточный рак. Исследование содержания онкомаркеров, факторов апоптоза и ангиогенеза проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа. При определении онкомаркеров в сыворотке крови – TPA и TPS, в моче – UBC использовали наборы фирмы IDL Biotech AB (Швеция). Содержание факторов роста (фактора роста эндотелия сосудов – ФРЭС), апоптоза (FAS-рецептор и FAS-L) определяли с помощью наборов реактивов фирм Biosource, Eurore S. A. При определении содержания онкомаркеров UBC, TPA и TPS в моче и в сыворотке крови отмечено значимое увеличение уровня UBC у больных поверхностным раком. Нарастание содержания TPS в сыворотке крови пациентов групп сравнения значительно меньше, чем у пациентов с раком мочевого пузыря. Изменение содержания факторов апоптоза – Fas и FasL в плазменной взвеси мононуклеаров у больных раком мочевого пузыря происходило по мере нарастания глубины инвазии и снижения степени дифференцировки ткани опухоли. По мере развития глубины инвазии в сыворотке крови практически у всех больных раком мочевого пузыря нарастало содержание ФРЭС. Наиболее высокие значения ФРЭС отмечены у больных экстраорганным и низкодифференцированным РМП. Установлено, что в диагностике НМИРМП целесообразно использовать определение содержания UBC II в моче, TPS и TPA, для оценки глубины инвазии, прогноза развития рецидивов, продолженного роста опухоли проводят определение TPS и TPA, ФРЭС, Fas и FasL. Применение предложенного перечня молекулярных маркеров позволяет перейти к качественно новому уровню диагностики и лечения рака мочевого пузыря.

Г. В. Корицунов, Н. Н. Павленко, Д. М. Пучиньян, Е. В. Гладкова, С. Г. Шахматова. Цитокины в сыворотке крови больных с опухолями костей. ФГБУ «Саратовский НИИТО» Минздрава России

Цель – оценить уровни фактора некроза опухоли- α : (ФНО- α), интерлейкина-6 (ИЛ-6) и неоптерина при доброкачественных и злокачественных опухолях костной ткани.

257 больных с опухолями злокачественного характера (метастатическое поражение костей, солитарная миелома) и доброкачественного (гигантоклеточная опухоль, костная киста, фиброзная дисплазия, хондрома, костно-хрящевой экзостоз) костной системы определяли в сыворотке крови содержание ФНО- α , ИЛ-6 и неоптерина в период поступления их в стационар ИФА-методом на ридере «Anthos 2020» (Австрия) с помощью наборов фирмы Human (Германия), «Bender Med Systems» (Австрия). При статистической обработке использовали как параметрические, так и непараметрические критерии.

Содержание ФНО- α в сыворотке крови больных с доброкачественными опухолями составило $22,3 \pm 2,1$, при злокачественных опухолевых процессах – $43,75 \pm 2,4$ пг/мл ($p < 0,001$). Диагностическая чувствительность теста (ДЧ) – 87,5%, диагностическая специфичность (ДС) – 96,3%, диагностическая значимость (ДЗ) – 94,3%.

Содержание ИЛ-6 в сыворотке крови больных с доброкачественными опухолями составило $23,4 \pm 2,1$, при злокачественных опухолевых процессах – $12,2 \pm 2,4$ Ед/мл ($p < 0,001$). ДЧ теста – 85,7%, ДС – 75,0%, ДЗ – 77,1%.

Содержание неоптерина в сыворотке крови больных с доброкачественными опухолями составило $5,3 \pm 2,1$, при злокачественных опухолевых процессах – $13,75 \pm 2,4$ нмоль/л ($p < 0,001$). ДЧ теста – 91,3%, ДС – 72,9%, ДЗ – 79,0%.

Все три теста способны к дифференцированию доброкачественных и злокачественных опухолей костной ткани, но по общей диагностической точности и специфичности тест ФНО- α превосходит определения ИЛ-6 и неоптерина.

А. А. Ващенко, В. Г. Зайцев, О. В. Островский, Р. А. Хвастунов. **Определение содержания циркулирующей ДНК в сыворотке крови как основа для разработки теста мониторинга течения онкологических заболеваний.** Волгоградский государственный медицинский университет

Цель исследования – оценка возможности использования содержания внеклеточной циркулирующей ДНК

(цДНК) в сыворотке крови для мониторинга течения онкологических заболеваний. Исследовали образцы сывороток, полученных от здоровых добровольцев и пациентов, страдающих различными формами онкологических заболеваний. Выделение цДНК проводилось с помощью набора ДНК-сорб АМ (Интерлабсервис, Россия) с последующей оценкой содержания цДНК по поглощению в УФ-области спектра. В образцах сывороток 25 здоровых добровольцев содержание цДНК составило 0,017 мг/мл (медиана; 95% доверительный интервал: 0,013000,018). В сыворотке крови больных онкологическими заболеваниями (34 пациента) до проведения хирургического вмешательства содержание цДНК составило 0,028 мг/мл (медиана; 95% доверительный интервал: 0,019–0,041). Были определены достоверные различия по критерию Манна-Уитни между содержанием цДНК в сыворотке больных онкологическими заболеваниями и здоровых добровольцев ($p < 0,001$). У 19 пациентов были повторно взяты образцы сыворотки после проведения операции. Содержание цДНК составило 0,013 мг/мл (медиана; 95% доверительный интервал: 0,007–0,021). По критерию Вилкоксона обнаружены статистически значимые различия по содержанию цДНК у больных до и после оперативного вмешательства ($p < 0,001$).

Таким образом, способ оценки содержания цДНК в сыворотке крови может быть использован для создания лабораторного теста мониторинга течения онкологического процесса.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ПРОБЛЕМЕ

Р. Р. Ажигова, В. Д. Ермилова, О. Д. Галдава, Л. Т. Лякина, О. Т. Шарашенидзе, И. Б. Манухин, К. П. Лактионов, О. М. Кузнецова, Т. Т. Березов. **Рецепторы эпидермального фактора роста в раке эндометрия и яичников.** ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Известно, что чувствительность к эндокринным стимулам свойственна, как правило, опухолям с достаточно высокой степенью дифференцировки, сохраняющим определенную зависимость от регуляторных воздействий со стороны организма или от внешних стимулов. Между тем одной из фундаментальных особенностей высокозлокачественных опухолей является способность к неограниченному автономному росту. В основе этого свойства лежат эффекты факторов роста – белков или полипептидов, продуцируемых опухолевыми клетками или другими компонентами опухолевой ткани (фибробластами, инфильтрирующими опухоль макрофагами и лимфоцитами, эндотелиоцитами) и взаимодействующих со специфическими рецепторами на поверхности клеток-продуцентов или соседних клеток, стимулируя в результате последующей сложной цепи событий клеточное деление. Наиболее изученным и клинически реализованным является механизм действия сигнальной системы рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР) и родственных ему рецепторов семейства c-erbB или HER (human epidermal growth factor receptor). В это семейство входят четыре белка – собственно РЭФР (ErbB-1, HER1), а также ErbB-2 (HER2/neu), ErbB-3 (HER3) и ErbB-4 (HER4) – сходные по структуре трансмембранные рецепторы, внутриклеточная часть которых обладает тирозинкиназной активностью. Известно довольно много лигандов рецепторов семейства c-erbB, наиболее известными из них являются эпидермальный и α -трансформирующий факторы роста, амфигулин и spiro, взаимодействующие только с РЭФР, а также херегулины (неурегулины), взаимодействующие с ErbB-3 и ErbB-4 [35]. Ни одного лиганда, взаимодействующего с рецептором ErbB-2 (HER2/neu), до настоящего времени не обнаружено. Пристальный интерес к РЭФР в последнее время связан также с тем, что на стадию клинических испытаний и прак-

тического использования вышли препараты, специфически воздействующие на РЭФР – моноклональные антитела к рецептору (Эрбитукс) и ингибиторы его внутренней тирозинкиназы (Iressa®, Tarceva™), реализующей первый этап передачи митогенного сигнала. Эти препараты уже рекомендованы для лечения немелкоклеточного рака легкого, опухолей головы и шеи, колоректального рака и рака поджелудочной железы.

Цель – сравнительное изучение частоты выявления и содержания РЭФР в злокачественных и доброкачественных опухолях эндометрия и яичников, оценка их взаимосвязи с основными клинико-морфологическими характеристиками новообразований и прогнозом.

В исследование было включено 125 больных раком эндометрия, 44 больных раком яичников с различными стадиями заболевания и 10 пациенток с доброкачественными новообразованиями яичников (в возрасте от 27 до 75 лет). У всех больных диагноз рака эндометрия, рака (РЯ) и доброкачественные новообразования яичников подтверждены данными гистологического исследования опухоли. Концентрацию РЭФР определяли в гомогенатах опухолей. Кусочки тканей опухоли массой 300–500 мг подвергали гомогенизации либо хранили в течение 1–30 дней при температуре -70°C . Перед гомогенизацией ткань тщательно очищали от участков жира и некроза, взвешивали и растирали в жидком азоте. Полученный порошок переносили в центрифужные пробирки, предварительно помещенные в ледяную баню, и добавляли ТЭД-буфер (10 мМ трис-НС1, 1,5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ дитиотрейтол; pH 7,4), содержащий 10% глицерина (по объему), из расчета 1 мл буфера на 100 мг ткани. Тщательно перемешивали гомогенат и центрифугировали 30 мин 105000xg при 4°C (центрифуга Optima TM TLC, «Beckman», США). Осадок, полученный после центрифугирования, регомогенизировали в 1 мл буфера А (0,25 мМ К₂Na-PBS, 70 мг/л бацитрацина, 1 г/л бычьего сывороточного альбумина) и центрифугировали еще раз в течение 10 мин при 2000xg, 4°C на той же центрифуге. Надосадочную фракцию, представляющую собой грубую мембранную суспензию, замораживали в жидком азоте, хранили при температуре -70°C , а затем использовали для определения РЭФР. Содержание

РЭФР в мембранной фракции опухолей и нормальных тканей эндометрия, яичников проводили модифицированным радиолигандным методом Т. J. Benraad и J. A. Foekens. В качестве меченого лиганда использовали мышинный ЭФР (receptor grade; фирма «Sigma», США), йодированный с помощью Na^{125}I в присутствии хлорамина Т (уд. радиоактивность 45–120 Ки/ммоль). Суспензию мембран (0,1 мл; концентрация белка 0,2–1 мг/мл) инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (20–25°C) с 3,5 нМ ^{125}I -ЭФР в присутствии и в отсутствие 200-кратного избытка немеченого ЭФР («Sigma», США), периодически встряхивая на миксере. По окончании инкубации помещали пробирки в ледяную баню и осаждали лиганд-рецепторный комплекс охлажденной суспензией гидроксилатапата (Sigma; DNA-grade) в PBS-буфере (2:1 по объему). После дополнительной инкубации при 0–4°C в течение 30 мин добавляли к пробам по 0,5 мл PBS и центрифугировали 3–5 мин при 2000xg, 4°C (центрифуга PC-6), надосадочную жидкость удаляли, и затем трижды промывали осадок гидроксилатапата 1 мл PBS. Просчитывали радиоактивность осадка на гамма-счетчике (фирма «ЛКВ», Швеция) и вычисляли количество специфического связанного ^{125}I -ЭФР по разнице между общим (в отсутствие конкурента) и неспецифическим (в присутствии избытка немеченого лиганда) связыванием. Количество РЭФР выражали в фмоль/мг мембранного белка. Пробы считали рецепторположительными при содержании РЭФР не менее 5 фмоль/мг белка. Математический анализ полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 17.0 for Windows. Достоверность различий частот признаков в изучаемых группах определяли с использованием критерия χ^2 . Различия между показателями считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Построение кривых выживаемости проводили методом Каплан-Майера. Проведен однофакторный (log-rank тест) и многофакторный (по Cox) анализ полученных данных. В опухолях эндометрия также определяли концентрацию РЭ и РП декстран-угольным методом по связывающей способности цитоплазматических белков-рецепторов по отношению к ^3H -ORG-2058 и ^3H Э₂ в цитозольной фракции опухолей эндометрия. Образцы опухоли эндометрия массой от 200 до 500 мг измельчали в фарфоровой ступке при охлаждении жидким азотом. Смешивали с буфером. Состав буфера: 10 ммоль/л трис-HCl («E. Merck», Германия), 1,5 ммоль/л ЭДТА («Sigma», США), 1 ммоль/л дитиотрейтола («Koch-Light Laboratories», Великобритания), 0,03% азида натрия («E. Merck», Германия), pH 7,4 при 20°C, 10% глицерин марки «осч» (по объему). После размораживания смесь центрифугировали 10 мин при 2500–3000g. Из надосадочной жидкости получали цитозоль, центрифугируя пробы при 105000g в течение 1 ч (ротор АН-650, центрифуга модели «Sorvall, FRC-1» фирма «Du Pont Instruments», Великобритания). Для работы использовали цитозоль с концентрацией общего белка около 1,0 мг/мл. Инкубацию проб цитозоля с ^3H стероидами проводили в течение 12–14 ч при 0–4°C. Пробы 100 мкл цитозоля инкубировали с радиоактивными лигандами ^3H -ORG-2058 или с ^3H Э₂. Чистота используемых лигандов была не менее 98%. Специфическое связывание цитоплазматических белков-рецепторов со стероидами определяли при насыщающей концентрации радиоактивного лиганда 10 нМ с учетом неспецифического связывания в присутствии 100-кратного избытка ORG-2058 («Amersham», Великобритания) – для прогестерона и диэтилстильбестрола («Calbiochem», США) – для эстрогенов. Для разделения связанного стероида от свободного пробы обрабатывали углем, активированным декстраном Т70. В надосадочной жидкости определяли радиоактивность на спектрометре модели MARK 3S (фирма «Trasco Eurora», Голландия). Эффективность счета по тринию составляла около 40%.

РЭФР выявлены в 40% опухолей, РЭ – в 87,2%, РП – в 80,8% у больных раком эндометрия. Не отмечено связи между частотой обнаружения РЭФР⁺ и РЭ⁺, РП⁺. Наиболее часто выявляли РЭФР⁺РЭ⁺РП⁺ опухоли (48,8%) и реже – РЭФР⁺РЭ⁺РП⁺ (30,4%).

Значения РЭФР⁺ колебались в широких пределах от 10 до 310 фмоль/мг белка, а медиана составила 93 фмоль/мг белка; РЭ – от 11 до 684 фмоль/мг белка (медиана 66 фмоль/мг белка); РП – от 21 до 1880 фмоль/мг белка (медиана 253 фмоль/мг белка). Отмечена тенденция к снижению частоты выявления и уровней РЭФР у больных раком эндометрия в возрасте старше 70 лет. Содержание РЭФР⁺ было обратно пропорционально индексу массы тела (ИМТ) больных раком эндометрия независимо от других клинических признаков. Частота выявления и уровни РЭФР более медианы (93 фмоль/мг белка) в опухоли были достоверно ниже у больных с ожирением. При этом частота выявления РЭФР в опухолях эндометрия была в 1,8 раза ниже у пациенток с сахарным диабетом II типа, чем у пациенток без такового. РЭ⁺ и РП⁺ в опухолях больных раком эндометрия не были связаны с ИМТ пациенток. Частота выявления РЭФР⁺ опухолей была достоверно ниже при III–IV стадиях (65,4%) по сравнению с I–II стадиями (90,9%). При этом частота выявления и уровни РЭ⁺ и РП⁺ в опухолях эндометрия среди больных с III–IV стадиями достоверно уменьшались ($p = 0,001$). Отмечено также достоверное увеличение числа РЭФР⁺РЭ⁺РП⁺ опухолей при III–IV стадиях заболевания (26,9%) по сравнению с I–II (3,0%). Напротив, число пациенток с РЭФР⁺РЭ⁺РП⁺ опухолями снижалось с увеличением стадии опухолевого процесса: с 33,3% при I–II стадиях до 19,2% при III–IV стадиях ($p = 0,001$). Частота выявления РЭФР в первичной опухоли больных раком эндометрия с высокой степенью ее дифференцировки составила 64,7%, с умеренной – 25,0%, с низкой – 52,2%, различие между 1-й и 2-й группой достоверно ($p = 0,001$). При этом уровни РЭФР в опухолях эндометрия более медианы (93 фмоль/мг белка) выявляли при высокодифференцированных (50%), реже, при низкодифференцированных (34,5%) и крайне редко при умеренно дифференцированных опухолях (4,4%). Выявлено достоверное снижение числа РЭФР⁺РЭ⁺РП⁺ опухолей при снижении степени дифференцировки рака эндометрия: при высокой степени дифференцировки 55,8%, при умеренной 25,0%, при низкой 17,4% ($p = 0,001$). РЭФР выявляли с одинаковой частотой в эндометриодной аденокарциноме и железисто-плоскоклеточном раке эндометрия – 44,0 и 33,3% соответственно, при этом уровни РЭФР также не были связаны с гистологическим вариантом строения опухоли (медианы 98 и 88 фмоль/мг белка соответственно). В то же время частота выявления РЭ и РП была достоверно ниже при железисто-плоскоклеточном раке (75,8 и 69,7% соответственно), чем при эндометриодной аденокарциноме (90,1 и 87,9% соответственно). Однако уровни РЭ и РП в первичных опухолях этих групп пациенток достоверно не различались. В эндометриодных аденокарциномах чаще выявляли три вида рецепторов РЭФР⁺РЭ⁺РП⁺ (42,0%), чем при железисто-плоскоклеточном раке (3,5%) ($p = 0,003$). Установлена корреляционная зависимость между глубиной инвазии опухоли и содержанием РЭФР в первичной опухоли больных раком эндометрия ($r = 0,37$; $p = 0,009$). Частота выявления РЭФР⁺-опухолей была наибольшей у больных раком эндометрия без инвазии (70%) и наименьшей – при глубине инвазии опухоли в стенку матки более 2,0 см (0%) ($p = 0,03$). Однако отмечен сложный характер взаимосвязи значений РЭФР в опухоли с глубиной ее инвазии в стенку матки у больных раком эндометрия. Так, группа больных без опухолевой инвазии характеризовалась высокой частотой выявления РЭФР⁺-опухолей (70,0%) и низкими уровнями рецептора (26 фмоль/мг белка). Почти у половины больных (45,8%) с глубиной инвазии 1–1,4 см выявлены наиболее высокие значения РЭФР (240 фмоль/мг белка). В опухоли больных с глубиной инвазии в миометрий более 2,0 см РЭФР не обнаружены. Глубина инвазии рака эндометрия в стенку матки у 11 пациенток с отрицательным рецепторным статусом опухоли РЭФР⁺РЭ⁺РП⁺ была достоверно больше (1,4±0,3 см), чем у 38 больных с положительным РЭФР⁺РЭ⁺РП⁺ (0,7±0,1 см) ($p = 0,0001$). Не обнаружено корреляционной зависимости между РЭФР, РЭ, РП и размером первичной опухоли эндометрия. Кроме того, отмечена тенденция к увеличению максимально-

го размера опухоли эндометрия при отрицательном рецепторном статусе опухоли РЭФР-РЭ-РП. 10-летняя выживаемость больных раком эндометрия в общей группе после проведенного лечения равнялась 53,2±4,7% (медиана 139 мес). Стало быть, половина обследованных больных прожила более 11 лет после проведенной терапии. Отдаленные результаты лечения больных Ia, Ib и II стадий статистически не различались и 10-летняя выживаемость в этих группах была выше 70%. В то же время 3-летняя выживаемость больных с III стадией рака эндометрия равнялась 0% (медиана 21,5 мес), а 1-летняя выживаемость больных с IV стадией равнялась 27% (медиана 12,0 мес). Проведенный многофакторный анализ отдаленных результатов лечения больных раком эндометрия показал, что независимыми факторами прогноза были стадия заболевания ($p = 0,00001$), возраст ($p = 0,002$) и наличие сахарного диабета II типа ($p = 0,01$). Самостоятельной прогностической ценностью при раке эндометрия РЭФР в первичной опухоли не обладал. Так, 10-летняя выживаемость у больных раком эндометрия с РЭФР⁺ опухолями составила 55,6±7,1%, тогда как с РЭФР⁻ – 51,3±6,4%, различия не достоверны. Отмечено, что общая выживаемость больных раком эндометрия в прогностически благоприятной группе пациенток в возрасте до 60 лет достоверно различалась при РЭФР⁻ (48,1±8,3%) и РЭФР⁺ (77,3±8,2%) опухолях ($p = 0,007$). В то же время выживаемость больных раком эндометрия достоверно различалась в группах с РЭ⁺ и РЭ⁻ опухолями ($p = 0,009$). Положительные уровни РЭ были прогностически благоприятным фактором рака эндометрия. РЭФР выявлены в 17 из 44 первичных злокачественных опухолей яичников (38,6%) и не выявлены в 75% доброкачественных новообразований, а в 16 наблюдениях (36,4%, каждой третьей) содержание РЭФР в РЯ превышало выше указанный пороговый уровень группы контроля (13 фмоль/мг белка; $p = 0,01$). При этом наибольшее содержание РЭФР в опухоли больных РЯ составило 1120 фмоль/мг белка, что многократно превышало пороговое значение РЭФР в доброкачественных новообразованиях яичников. Не установлена связь между содержанием РЭФР в опухоли и концентрацией СА-125 в сыворотке крови больных РЯ. У больных РЯ с односторонним и двусторонним опухолевым поражением яичников частота выявления РЭФР была одинаковой и составила соответственно 40 и 37,9%, а медианы этого маркера также в этих двух группах пациенток не различались (37,5 и 36,5 фмоль/мг белка соответственно). Установлена достоверно большая частота обнаружения РЭФР-опухолей яичников среди больных РЯ с I стадией процесса (71,4%) по сравнению с пациентками с большей распространенностью заболевания. Также необходимо отметить, что если в группе больных с I–II стадиями РЯ частота выявления значений РЭФР более 13 фмоль/мг белка составила 22,2% (2 из 9), то у больных с III–IV стадиями она уже равнялась 40% (14 из 35) ($p = 0,001$). Не обнаружено достоверных различий в содержании РЭФР в РЯ с учетом стадии заболевания. Показатели РЭФР в РЯ не зависели от наличия или отсутствия асцита. РЭФР-опухоли встречались среди высокодифференцированных в 81,8% случаев, в умеренно дифференцированных – в 53,9% и в низкодифференцированных – в 61,1%. Анализ отдаленных результатов лечения больных РЯ с учетом РЭФР в опухоли проводится.

Представленные данные свидетельствуют о том, что РЭФР-РЭ-РП опухоли у больных раком эндометрия чаще были связаны с такими неблагоприятными клинико-морфологическими признаками заболевания, как большой размер первичной опухоли и глубина инвазии рака эндометрия в стенку матки, низкая степень дифференцировки опухоли и поздние III–IV стадии заболевания. В общей группе больных раком эндометрия 10-летняя общая выживаемость больных с РЭФР⁺ опухолями выше, чем с РЭФР⁻ более чем в 1,6 раза. Наилучшие отдаленные результаты отмечены среди больных раком эндометрия с РЭФР⁺РЭ⁺РП⁺ опухолями, а наихудшие с рецепторным статусом РЭФР⁻РЭ⁻РП⁻. При

многофакторном анализе только такие клинические признаки как стадия заболевания ($p = 0,00001$), наличие сахарного диабета II типа ($p = 0,0006$) и возраст пациенток до 60 лет ($p = 0,0015$) могли служить независимыми факторами прогноза общей выживаемости. Частота выявления и уровни РЭФР были достоверно выше в РЯ, чем в доброкачественных опухолях. Не обнаружено достоверных различий в содержании РЭФР в РЯ с учетом стадии заболевания и наличия асцита.

И. В. Бабкина, Е. Ю. Руссо, И. В. Булычева, И. Н. Кузнецов, Ю. Н. Соловьев, Е. А. Тен, М. Д. Алиев. Растворимая форма молекулы адгезии эндотелия сосудов I типа (sVCAM-1) при опухолях костей. ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Саркомы костей до настоящего времени остаются одним из самых трудных в диагностическом и лечебном плане разделов клинической онкологии. Эти заболевания объединяют группу различных морфологических вариантов опухолей, которые встречаются в основном в молодом возрасте, отличаются тяжестью клинического течения, низкой эффективностью лечебных мероприятий, ранним метастазированием и неблагоприятным прогнозом. Известно, что на опухолевый рост в костях оказывают влияние различные факторы и среди них молекулы адгезии эндотелия сосудов (VCAM). VCAM-1 – это молекула адгезии эндотелия сосудов I типа – один из членов семейства иммуноглобулинов, который вовлекается в лейкоцитарно-эндотелиальное взаимодействие. VCAM-1 является лигандом интегрина VLA-4. Его обнаружили в составе лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов. Взаимодействие VCAM-1/VLA-4 опосредует прочную адгезию циркулирующих лейкоцитов (кроме нейтрофилов) к эндотелию. VCAM-1 принимает участие в адгезии лейкоцитов вне сосудов, в процессах взаимодействия предшественников лимфоцитов со стромальными клетками костного мозга, а также В-клеток с дендритными клетками фолликулов лимфатических узлов. VCAM-1 обладает относительно селективной лейкоцитарной адгезией, обеспечивая накопление мононуклеарных клеток в процессе смены острой и фазы воспаления хронической. sVCAM-1 – это продукт протеолитического распада VCAM-1 известно, что он содержится как в крови практически здоровых людей, так и у пациентов с различными заболеваниями. Показано, что уровень sVCAM-1 в сыворотке крови повышается при раке молочной железы, матки, раке почек, мочевого пузыря, раке предстательной железы, заболеваниях крови.

Цель исследования – провести сравнительный анализ содержания sVCAM-1 в сыворотке крови практически здоровых людей, больных злокачественными и пограничными опухолями костей с учетом основных клинических и морфологических характеристик заболевания.

Обследовали 166 больных опухолями костей (112 мужчин и 54 женщины) в возрасте от 14 до 68 лет (средний возраст 30,1±2,0 лет). Злокачественные опухоли выявлены у 152 пациентов [остеосаркома – 68, хондросаркома – 46, саркома Юинга – 26, злокачественная фиброзная гистиоцитома кости (ЗФГ) – 12], пограничные – гигантоклеточная опухоль кости (ГКО) – у 14. У всех больных диагноз установлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования опухоли. До проведения настоящего исследования специфическое лечение пациенты не получали. В качестве контроля использованы сыворотки крови 50 практически здоровых людей (28 мужчин и 22 женщины) в возрасте от 13 до 68 лет (средний возраст 28,1±3,1 лет). Концентрацию sVCAM-1 определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом с использованием наборов реактивов фирмы «Bender MedSystems» (Австрия).

Значимые уровни sVCAM-1 выявлены во всех образцах сыворотки крови. При новообразованиях костей наиболее часто содержание sVCAM-1 в крови было в пределах от 400 до 500 пг/мл. В сыворотке крови практически здоровых людей все значения sVCAM-1 были ниже 500 пг/мл, а наиболее часто концентрация sVCAM-1 составляла 200–300 пг/мл, что совпадает с результатами других исследователей. В группе больных

новообразованиями костей среднее содержание sVCAM-1 в сыворотке крови составило $444,7 \pm 37,4$ пг/мл и было почти в 2 раза выше по сравнению с показателями в контрольной группе – $242,5 \pm 23,2$ пг/мл ($p < 0,001$). Достоверных различий в содержании sVCAM-1 при злокачественных и пограничных опухолях костей не выявили. Не было различий в уровнях sVCAM-1 в сыворотке крови с учетом возраста ни у больных злокачественными и пограничными опухолями костей, ни у практически здоровых людей. У всех пациентов с ГКО опухоль была локализована в трубчатых костях. При злокачественных новообразованиях у 94 (62%) пациентов опухоль диагностировали в трубчатых костях, у 58 (38%) – в плоских костях. Более высокие значения sVCAM-1 были выявлены при поражении трубчатых костей, по сравнению с плоскими ($481,0 \pm 63,5$ пг/мл, медиана – $477,1$ пг/мл и $369,6 \pm 37,1$ пг/мл, медиана – $374,8$ пг/мл соответственно), однако различия были недостоверными ($p > 0,05$). С помощью статистических методов исследования нами установлено, что у 75% практически здоровых людей значения sVCAM-1 в сыворотке крови были ниже 300 пг/мл, а у 75% больных новообразованиями костей – выше этого уровня, поэтому концентрация sVCAM-1, равная 300 пг/мл, была принята за пороговое значение при дальнейшем анализе полученных результатов. Так, у больных остеосаркомой частота выявления sVCAM-1 выше 300 пг/мл составила 76,5%, саркомой Юинга – 69,3%, ЗФГ – 66,7%, хондросаркомой – 43,5%. При остеосаркоме среднее содержание и медиана sVCAM-1 были достоверно выше ($537,3 \pm 81,2$ пг/мл, медиана – $491,3$ пг/мл), чем при хондросаркоме – ($344,4 \pm 58,1$ пг/мл, медиана – $302,6$ пг/мл) ($p = 0,03$). Корреляции между содержанием sVCAM-1 в сыворотке крови и размером опухоли ни у больных злокачественными, ни пограничными новообразованиями костей не выявили. У 48 больных злокачественными опухолями костей, которым проводили адьювантное химиотерапевтическое лечение, проведен анализ содержания sVCAM-1 в сыворотке крови до начала лечения и с учетом степени лечебного патоморфоза опухоли, исследованной после ее хирургического удаления. У 1 пациента лечебный патоморфоз в опухоли отсутствовал, у 23 – диагностировали II степень выраженности лечебного патоморфоза, у 20 – III степень, у 4 – IV степень. Достоверно более низкие исходные значения sVCAM-1 в сыворотке крови обнаружены у пациентов, у которых достигнута III и IV степени лечебного патоморфоза ($412,6 \pm 45,5$ пг/мл, медиана – $479,6$ пг/мл при III степени и $498,1 \pm 53,4$ пг/мл, медиана – $498,1$ пг/мл при IV). При отсутствии лечебного патоморфоза в опухоли или его выраженности, соответствующей II степени, значения показателя sVCAM-1 в сыворотке крови были выше и составили в среднем $527,3 \pm 60,9$ пг/мл (медиана $538,5$ пг/мл).

У пациентов с новообразованиями костей среднее содержание sVCAM-1 в сыворотке крови было достоверно выше, чем у практически здоровых людей. Не выявлено различий в содержании sVCAM-1 при пограничных и злокачественных опухолях костей. Достоверных различий в содержании sVCAM-1 в сыворотке крови больных с учетом возраста и типа пораженной кости не выявлено, взаимосвязи между размером опухоли и уровнем sVCAM-1 также не обнаружено. У пациентов с положительным эффектом от химиотерапевтического лечения, соответствующим III–IV степени лечебного патоморфоза опухоли, исходные уровни sVCAM-1 в сыворотке крови были ниже, чем у пациентов, у которых отметили резистентность к химиотерапии или II степень выраженности лечебного патоморфоза.

Н. Б. Захарова, О. Ю. Никольский, А. Н. Понукалин. Перспективы использования "мочевых" биомаркеров в стандартах обследования больных раком почки. НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии ГБОУ ВПО Саратовского ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России

В диагностике стадии рака почки (РП), рецидива заболевания после оперативного лечения может быть использовано лабораторное исследование в сыворотке крови и опухолевой ткани фактора роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor – VEGF). В целом ряде исследований показано,

что концентрацию ряда медиаторов воспалительного процесса и факторов роста можно определять в моче для оценки характера поражения почечной паренхимы. Возможность использования «мочевых» маркеров в диагностических целях при РП практически не рассматривалась. Вместе с тем именно такой неинвазивный метод количественного анализа медиаторов воспаления и ангиогенеза перспективен для разработки новых технологий циторедуктивных нефрэктомий, применения неoadьювантной таргетной терапии, ранней диагностики стадии заболевания T1a и T1b, рецидивов заболевания.

Цель работы – установить возможность использования мочевых биомаркеров в стандартах обследования больных раком почки. Обследованы пациенты с РП ($n = 21$, с доброкачественными опухолями почек – 6 пациентов, с РП стадии T1a и T1b – 6, с РП III стадии – 7), проходившие лечение в НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии Саратовского государственного медицинского университета им. В. И. Разумовского Минздрава России. Оценку стадии заболевания проводили по результатам комплексного обследования, включающего изучение жалоб и сбор анамнеза, ультразвуковое исследование, пошаговую, спиральную и мультиспиральную компьютерную томографию с реконструкцией изображения, магнитно-резонансную томографию, общий и биохимический анализ крови. Контрольная группа была сформирована из 20 практически здоровых лиц.

Для количественного анализа биомаркеров взятие крови у пациентов исследуемой и контрольной групп проводили натощак, в утренние часы из кубитальной вены с использованием систем для забора крови «Vacurette» с активатором свертывания крови и разделительным гелем. Первую порцию утренней мочи в объеме не менее 100 мл собирали в специальные стаканы с крышками. Предварительно в емкость для забора мочи вносили 20 мкл раствора «ProClin 300» («SUPELCO», США). Аликвоты сыворотки крови и мочи разливали в пробирки с крышками типа «Eppendorf» и хранили до проведения исследования при -25°C .

Концентрацию VEGF и MCP-1 в сыворотке крови и моче обследуемых пациентов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), используя соответствующие наборы реагентов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

Показано, что в моче больных РП, не содержащей консерванта «ProClin 300», уже в течение 2 часов при комнатной температуре происходит резкое снижение концентрации исследуемых показателей. Основной причиной значительного падения концентрации определяемых показателей в моче больных РП, очевидно, может быть контаминация ее микроорганизмами, которые в процессе жизнедеятельности секретируют большое количество ферментов, способных к инактивации или деструкции исследуемых биомаркеров.

У больных с доброкачественными образованиями почек отмечены низкий уровень VEGF и MCP-1 в сыворотке крови и подъем их содержания в моче в 1,5–2 раза. У пациентов с РП стадии T1a и T1b, с размером опухоли до 4 см с сыворотке крови и моче повышение содержания VEGF и MCP-1 было в 5–9 раз. Наиболее высокие цифры биомаркеров в сыворотке крови и моче отмечены у больных РП III стадии.

Наибольшую диагностическую значимость для раннего выявления РП стадий T1a и T1b имеют одновременное количественное определение в сыворотке крови и моче VEGF и MCP-1. Исследование концентрации биомаркеров в моче позволяет подтвердить РП на стадиях T1a и T1b. Для определения биомаркеров в моче необходимо использовать консервант с противомикробной активностью, например «ProClin 300».

Д. Н. Кушлинский, Н. В. Левкина, Е. С. Герштейн, В. Д. Ермилова, И. В. Терешкина, К. П. Лактионов, Л. В. Адамян. Клиническое значение исследования компонентов VEGF-сигнального пути и матриксных металлопротеиназ у больных новообразованиями яичников. ФГБУ Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН; ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова РАМН, Москва

Трудности ранней диагностики и высокий метастатический и инвазивный потенциал рака яичников определяют необходимость углубленного изучения механизмов распространения и прогрессирования этой опухоли, знание которых могло бы стать основой для создания новых препаратов, целенаправленно воздействующих на молекулы, играющие ключевую роль в инвазии, отдаленном метастазировании и образовании асцита. Одним из важнейших факторов, необходимых для роста и распространения опухолей, является неоангиогенез. Центральную роль в его регуляции играет фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Биологические эффекты VEGF опосредованы специфическими мембранными рецепторами. В регуляции опухолевого ангиогенеза принимают участие два типа рецепторов VEGF – VEGFR-1/Flt-1 и VEGFR-2/Flk-1/KDR, биологическая роль которых различна: VEGFR-1 индуцирует протеазную активность в эндотелиальных клетках и стимулирует миграцию в опухолевую ткань макрофагов, а VEGFR-2 вызывает дифференцировку, пролиферацию и миграцию клеток эндотелия сосудов. Влияние VEGF на опухолевую прогрессию осуществляется в комплексном взаимодействии с матриксными металлопротеиназами (ММП) – цинк-зависимыми эндопептидазами, способными специфически гидролизовать основные белки внеклеточного матрикса. ММП-зависимый гидролиз окружающей опухоль базальной мембраны и внеклеточного матрикса – один из главных молекулярных механизмов инвазии и метастазирования. Использование антиангиогенных препаратов, в том числе, природных и синтетических ингибиторов ММП, считается в настоящее время одним из наиболее перспективных направлений молекулярно-направленной противоопухолевой терапии, а компоненты VEGF-сигнальной системы и различные ММП рассматриваются в качестве возможных биологических маркеров прогноза и лекарственной чувствительности опухолей.

Цель данного исследования – сравнительная оценка содержания VEGF и его рецепторов 1 и 2 типа, а также некоторых представителей семейства ММП (ММП-2, 7 и 9) в опухолях больных раком, доброкачественными и пограничными новообразованиями яичников и анализ взаимосвязи этих показателей с основными клинико-морфологическими особенностями рака яичников.

В исследование вошли 50 больных раком (33 первичных и 17 – после предоперационной терапии), 9 больных пограничными и 22 доброкачественными новообразованиями яичников. Материал для исследования брали во время операции: кусочки тканей (200–500 мг) доставляли на леду в лабораторию и хранили при -70°C до начала обработки. Образцы тканей лизировали в соотношении 1:3 в буфере следующего состава: 20 мМ Трис-НСI (рН 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 1% Тритон X-100, 2,5 мМ пиррофосфат натрия, 1 мМ β -глицерофосфат, 1 мМ ортованадат натрия, 1 мкг/мл леупептина. Лизаты центрифугировали в течение 30 мин при 20000 об/мин, 4°C . Концентрацию исследуемых белков определяли с помощью стандартных наборов для прямого иммуноферментного анализа: «Human VEGF Immunoassay», «Human VEGFR1 Immunoassay», «Human VEGFR2 Immunoassay», «Human/Mouse/Rat MMP-2 (total)», «Human MMP-7 (total)», «Human MMP-9 (total)» (Quantikine®, R&D Systems, США). Данные обрабатывали с помощью программы «Statistica 7.0». При сравнении показателей и анализе их взаимосвязей использовали непараметрические методы: критерии Манна-Уитни и Kruskal-Wallis, тест корреляции рангов Спирмена (R).

Во всех исследованных опухолях яичников обнаружены измеримые количества VEGFR1, а VEGF и VEGFR2 выявлены в 97% образцов первичного рака. VEGF найден во всех пограничных и только в 60% доброкачественных новообразований, а VEGFR2 – во всех доброкачественных и 91% пограничных опухолей яичников. Содержание VEGF высоко достоверно увеличивается при переходе от доброкачественных опухолей к пограничным и злокачественным ($p < 0,0001$), содержание VEGFR1 в трех типах новообразований практически не различается, а уровень VEGFR2 снижен в ткани рака и

пограничных опухолей по сравнению с доброкачественными опухолями яичников. В опухолях больных раком яичников, оперированных после проведения химиотерапии, содержание VEGF достоверно ниже, а содержание VEGFR2 – выше, чем в опухолях первичных больных, и примерно соответствует показателям доброкачественных опухолей. Содержание VEGFR1 в опухолях первичных и ранее леченных больных не различается. Во всех исследованных опухолях яичников обнаружены измеримые количества ММП-2. ММП-9 выявлена в 94% образцов первичного рака яичников, в 90% доброкачественных и 82% пограничных опухолей, ММП-7 – во всех пограничных опухолях, в 90% доброкачественных и 91% образцов первичного рака. Содержание ММП-2 в ткани первичного рака яичников достоверно снижено по сравнению с доброкачественными опухолями, а содержание ММП-7 и ММП-9 – повышено. В пограничных опухолях уровень ММП-2 такой же, как в ткани рака яичников, а уровень ММП-9, напротив, соответствует показателям доброкачественных новообразований. Уровень ММП-7 в пограничных опухолях выше, чем при других типах новообразований. В опухолях, исследованных после ранее проведенного лечения, содержание ММП-2 достоверно и значительно повышено по сравнению с первичным раком, уровень ММП-7 не меняется, а уровень ММП-9 достоверно снижен. Таким образом, закономерности, продемонстрированные для ММП-2, противоположны обнаруженным для других ММП и VEGF. Только в доброкачественных новообразованиях яичников выявлена достоверная положительная взаимосвязь между содержанием ММП-7 и ММП-9 ($R = 0,47$; $p = 0,02$). В то же время, выявлена высокая достоверная отрицательная взаимосвязь между показателями содержания VEGF и ММП-2 в общей группе больных и у больных первичным раком ($R = -0,47$; $p = 0,00002$ и $R = -0,40$; $p = 0,02$ соответственно), а содержание VEGFR2 в ткани первичного рака положительно коррелирует с уровнем ММП-2 ($R = 0,39$; $p = 0,03$). В общей группе наблюдаются также положительные корреляции между уровнями VEGF и ММП-7, VEGF и ММП-9 (в обоих случаях $R = 0,29$; $p = 0,03$), а также между ММП-2 и VEGFR2 ($R = 0,43$; $p = 0,0006$). Разнообразие и разнонаправленность взаимосвязей между уровнями экспрессии компонентов VEGF-сигнального пути и отдельных представителей семейства ММП, обнаруженных у больных различными новообразованиями яичников, свидетельствуют о сложной взаиморегуляции этих двух систем и ее изменении при переходе от доброкачественных опухолей к злокачественным. Для того чтобы оценить клиническое значение исследуемых маркеров, мы проанализировали их взаимосвязь с основными клинико-морфологическими особенностями заболевания. Обнаружено достоверное увеличение уровня VEGFR2 в опухолях больных III стадии по сравнению с I, увеличение содержания ММП-7 при III стадии по сравнению со II. Отмечены достоверные различия в зависимости от гистологического типа рака: повышение уровня VEGF и снижение VEGFR2 и ММП-2 в муцинозных раках по сравнению с серозными, снижение уровня ММП-2 и повышение VEGFR1 эндометриоидных раках по сравнению с серозными. Достоверной взаимосвязи исследованных показателей с размером и степенью дифференцировки первичной опухоли, наличием отдаленных метастазов и/или асцита выявить не удалось.

В ткани рака яичников достоверно повышено по сравнению с доброкачественными опухолями содержание VEGF, а содержание ММП-2, напротив, снижено. Отсутствие четкой взаимосвязи тканевых концентраций исследованных маркеров с основными клинико-морфологическими характеристиками рака яичников не исключает их потенциальной роли в качестве независимых факторов прогноза безрецидивной и общей выживаемости, что может быть доказано при более длительном наблюдении за больными. Высокий уровень VEGF в ткани рака яичников подтверждает перспективность включения антиангиогенных препаратов, в том числе, природных и синтетических ингибиторов ММП в схемы лечения этого тяжелого заболевания.