

ДИАГНОСТИКА

А. С. Белохвостов¹, В. М. Фениксов², А. Р. Зарецкий¹,
А. А. Абрамов¹, С. И. Маркова¹, А. Г. Румянцев¹

ОПТИМИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ АНАЛИЗОВ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ, МОНИТОРИНГА ОПУХОЛЕВОГО ПРИСУТСТВИЯ И СВОЕВРЕМЕННОЙ ДЕТЕКЦИИ ПРИОБРЕТЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

¹ФГУ ФНКЦ ДГОИ Росздрава, Москва

²РМАПО, Москва

Цель исследования. Определение общей стратегии оптимизации молекулярно-генетических тестов для их рутинного клинического использования, т.е. создание максимально чувствительных, специфичных и воспроизводимых методик при минимизации финансовых и трудовых затрат на осуществление каждого отдельного теста.

Материалы и методы. Различные протоколы анализа гипермутабельных участков генов *p53*, *k-ras*, *B-raf*, *EGFR* и *C-kit* сравнивались по чувствительности и специфичности. В основе каждого из методов лежала ПЦР-амплификация соответствующего фрагмента ДНК; сопоставлялись разные протоколы амплификации, а также разные методы обогащения ПЦР для увеличения ее чувствительности (с помощью обработки рестриктазами и с помощью труднообратимой гибридизации с PNA-пробами) и различные способы детекции ПЦР-продукта (электрофорез в агарозном геле, рестрикция с последующим электрофорезом в агарозном геле, SSCP-электрофорез в ПААГ и real-time PCR с использованием зондов TaqMan).

Результаты. Для молекулярно-генетического профилирования опухолевой ткани оптимальным по соотношению всех параметров оказался метод ПЦР-амплификации с одновременным обогащением с помощью PNA-проб и детекцией в реальном времени с помощью зондов TaqMan. Однако этот метод показал себя недостаточно чувствительным при анализе ультраминорных фракций ДНК с мутациями. Для этих целей оптимальным оказался четырехэтапный метод анализа, включающий ПЦР-амплификацию, обработку рестриктазой, вторую ПЦР-амплификацию и детекцию с помощью обработки другой рестриктазой и последующего агарозного электрофореза.

Выводы. Задача молекулярно-генетического профилирования опухоли может быть решена с помощью мультиплексных тест-систем, основанных на real-time PCR с зондами TaqMan и обогащением с помощью PNA-проб. Неинвазивный мониторинг мутаций опухолевого происхождения в различных биологических образцах можно осуществлять только с помощью рестрикционно-обогащенной ПЦР.

А. С. Белохвостов, С. И. Маркова, А. Р. Зарецкий,
А. А. Абрамов, А. Г. Румянцев

РАННЯЯ НЕИНВАЗИВНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ПРИОБРЕТЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ К ИНГИБИТОРАМ БЕЛКА EGFR (ПРЕПАРАТАМ ИРЕССА И ТАРЦЕВА)

ФГУ ФНКЦ ДГОИ Росздрава, Москва

Цель исследования. Разработка и оптимизация высокочувствительного теста для выявления в плазме крови и слюне минорных фракций ДНК с изменениями в 20-м экзоне гена *EGFR*, вызывающими резистентность опухолей к препаратам Иресса и Тарцева.

Материалы и методы. Сравнивались между собой различные протоколы ПЦР-амплификации гипермутабельного участка 20-го экзона гена *EGFR*, а также различные методы обогащения ПЦР-продукта мутантной фракцией (с мутацией Т790М) и детекции этой фракции. Кроме того, сравнивались между собой разные протоколы метилспецифической ПЦР для выявления гиперметилированной аллели 20-го экзона гена *EGFR* (поскольку *de novo* этот участок гипоме-

тилирован, а мутация в 790-м кодоне ACG-ATG возникает только вследствие метилирования цитозина).

Результаты. Оптимальным по чувствительности для выявления минорной фракции ДНК с мутацией Т790М оказался четырехэтапный метод анализа, включающий ПЦР-амплификацию, обработку специфичной к нормальной аллели рестриктазой Bsh12361, вторую ПЦР-амплификацию и детекцию с помощью обработки рестриктазой Hsp III, специфичной к мутантной аллели, и последующего агарозного электрофореза (чувствительность порядка 1×10^4). Удалось также создать относительно чувствительный (чувствительность порядка 1×10^3) протокол метилспецифической ПЦР для выявления гиперметилированной аллели 20-го экзона гена *EGFR*.

Выводы. Молекулярно-генетический анализ мутаций и статуса метилирования 20-го экзона гена *EGFR* в ДНК плазмы крови и слюны обладает достаточной чувствительностью при оптимальной специфичности и воспроизводимости. Он может быть использован в рутинной клинической практике для мониторинга приобретенной лекарственной устойчивости у пациентов, проходящих лечение препаратами Иресса и Тарцева.

А. С. Белохвостов¹, В. М. Фениксов², А. А. Абрамов¹, О. В. Горючева¹, А. Р. Зарецкий¹, А. Г. Румянцев¹ НЕИНВАЗИВНЫЙ МОНИТОРИНГ РАДИО- И ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ АНАЛИЗОВ

¹ФГУ ФНКЦ ДГОИ Росздрава, Москва

²РМАПО, Москва

Цель исследования. Определение возможности неинвазивного мониторинга чувствительности и устойчивости глиальных опухолей к консервативному лечению, подбор оптимальной панели генов для такого мониторинга и оптимизация техники анализа этих генов.

Материалы и методы. Произведен поиск литературы по маркерам радио- и химиочувствительности и устойчивости глиальных опухолей и метаанализ этой литературы. Исследован также статус генов, выбранных на основе этого анализа, в различных биологических образцах 14 пациентов с глиальными опухолями головного мозга до и в процессе лучевого и лекарственного лечения.

Результаты. Оптимальный набор генов для неинвазивного мониторинга чувствительности и устойчивости глиальных опухолей к лучевой терапии и лечению алкилирующими агентами включает в себя гены *p53* (мутации и статус метилирования экзонов 5-8) и *MGMT* (статус метилирования промоторной области и 5-го экзона). В слюне и плазме крови больных с глиальными опухолями регулярно обнаруживалась ДНК опухолевого происхождения, что говорит о возможности такого мониторинга. Мутационный анализ удалось оптимизировать при использовании всех реагентов отечественного производства, тогда как для анализа статуса метилирования необходимым оказалось использование ДНК-полимеразы AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, США). Детекция результатов метилспецифической ПЦР требует специфических методов таких, как SSCP-электрофорез или рестрикционный анализ, поскольку агарозный электрофорез не позволяет получить информацию о профиле метилирования гиперметилированных последовательностей ДНК.

Выводы. Неинвазивный мониторинг в процессе консервативного лечения глиальных опухолей возможен и потенциально высокоинформативен; после некоторой доработки тест-системы для подобного мониторинга целесообразно использовать при проведении клинических испытаний.

Е. Г. Вакуловская, А. Н. Губин, Б. К. Поддубный,
В. В. Кузнецов, Е. С. Вакурова, А. Н. Грицай
ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ЛАПАРОСКОПИЯ
С ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОМ АЛАСЕНС

У БОЛЬНЫХ ОПУХОЛЯМИ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ С МЕТАСТАТИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ БРЮШИНЫ

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

Цель исследования. Оценить безопасность и эффективность флюоресцентной лапароскопии (ФЛ) у больных опухолями различных локализаций с использованием фотосенсибилизатора аласенс (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», РФ) (АС), ее диагностическую ценность в раннем выявлении метастатического поражения брюшины.

Материалы и методы. Открытое проспективное исследование проведено 42 пациентам: 38 больных раком яичников (РЯ) 3–4-й стадий, 2 больных раком желудка, 2 – раком печени. В исследование были включены 38 женщин и 4 мужчин в возрасте от 32 до 60 лет. Всем больным РЯ ранее проведено комбинированное лечение: хирургическое + ПХТ. При гистологическом исследовании у больных РЯ выявлена папиллярная цистаденокарцинома, у больных раком желудка – аденокарцинома. Не было обнаружено признаков поражения брюшины при клиническом и инструментальном обследовании. АС в дозе 20 мг/кг веса тела больного, растворенный в 100–150 мл питьевой воды, принимался внутрь за 4 ч до ФЛ, которая выполнялась после традиционного лапароскопического осмотра в белом свете под эндотрахеальным наркозом с использованием флюоресцентно-спектроскопической установки ЛЭСА-01 (ЗАО «Биоспек», РФ).

Результаты. Зоны флюоресценции на брюшине были выявлены у 40 больных РЯ (95,2 %), при этом при осмотре в белом свете метастатическое поражение брюшины выявлено у 21 (52,4 %). Количество обнаруженных метастазов варьировало от 2 до 11, размеры метастазов от 3 до 9 мм, при этом даже у больных, у которых метастатическое поражение брюшины было выявлено при обычном лапароскопическом исследовании, часть метастазов была обнаружена только при ФЛ. Флюоресцентная контрастность на границе «опухоль/норма» варьировала от 2,4 : 1 до 4,8 : 1. Щипцовые биопсии (216) были выполнены из всех выявленных зон флюоресценции и из нефлюоресцирующих участков брюшины, при морфологическом исследовании верифицирована опухоль у 38 больных в 96 % биоптатов.

Выводы. Результаты наших исследований показывают, что ФЛ с АС позволяет получать диагностически значимую информацию у больных опухолями различных локализаций, выявлять раннее метастатическое поражение брюшины, определять субклинические очаги, оценивать границы распространения процесса с высокой чувствительностью (91 %) и специфичностью по сравнению с традиционной лапароскопией (61,5 %).

Е. Г. Вакуловская, В. Б. Карахан, В. А. Алешин ФЛЮОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА С ПРЕПАРАТОМ АЛАСЕНС У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНЫМИ И МЕТАСТАТИЧЕСКИМИ ОПУХОЛЯМИ МОЗГА

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

Цель исследования. Разработать и апробировать методы интраоперационной флюоресцентной диагностики (ФД) у больных первичными и метастатическими опухолями мозга с использованием отечественного фотосенсибилизатора аласенс (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Москва, РФ) (АС).

Материал и методы. Открытое проспективное исследование проведено 5 пациентам: 2 больным рецидивами глиобластомы мозга после хирургического лечения и 3 – метастазами рака почки (1 большой), рака легкого (1 большой), меланомы (1 большой) в головной мозг. В исследование были включены 1 женщина и 4 мужчин в возрасте от 42 до 63 лет. АС в дозе 20 мг/кг веса тела больного, растворенный в 100–150 мл питьевой воды, принимался внутрь за 3 ч до начала эндотрахеального наркоза. ФД выполнялась интраоперационно через 4–6 ч после введения препарата АС с использованием флюоресцентно-спектроскопической установки ЛЭСА-01 (ЗАО «Биоспек», РФ), источником излучения в которой является гелий-неоновый лазер (длина волны 633 нм). Определялись спектр с анализом его по форме и амплитуде сигнала и интегральная интенсивность флюоресценции АС в разных точках опухоли, прилегающей к ней ткани мозга, неизмененных участках мозга, определялись флюоресцентные границы зоны поражения, а также оценивалась интенсивность флюоресценции нормальной кожи руки, лица и слизистой нижней губы пациентов. Определялся также

флюоресцентный контраст – соотношение между значениями интенсивности флюоресценции в опухоли и нормальной ткани. Для ФД использовались торцевые волоконно-оптические катетеры.

Результаты. Зоны флюоресценции в головном мозге были выявлены у 4 больных, размеры образований варьировали от 1,3 до 7,0 см. Интенсивность флюоресценции у больных рецидивами глиобластомы была существенно выше, чем у больных метастатическим поражением мозга. У больной меланомой интенсивность флюоресценции метастаза достоверно не отличалась от фоновой, не было получено флюоресценции некротической части рецидивной глиобластомы. При морфологическом исследовании верифицирована опухоль у всех больных.

Выводы. Первые результаты наших исследований показывают, что методика ФД с АС позволяет получать диагностически значимую информацию у больных как первичным, так и метастатическим поражением мозга, оценить границы распространения процесса.

И. Г. Гатауллин, С. В. Петров, Я. Ф. Шамсутдинова,
М. Р. Гильмутдинова

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОГНОЗА МЕТАСТАЗОВ В КОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Клинический онкологический диспансер МЗ РТ, Казань

Введение. Представляется актуальным изучение метастатического поражения костей у больных раком молочной железы в аспекте дифференцированного подхода к прогнозированию и соответственно более ранней диагностике костных метастазов.

Цель исследования. Оптимизация методов ранней диагностики и прогнозирования метастазов в кости у больных раком молочной железы.

Материалы и методы. Работа основана на анализе результатов клинического обследования, лабораторных методов диагностики и лечения 464 больных раком молочной железы. В зависимости от цели исследования все больные разделены на 2 группы: основную составили 248 больных раком молочной железы с синхронными и метастатическими метастазами в кости, контрольную – 216 пациентов – больные раком молочной железы без отдаленных метастазов.

Результаты. Выявлено, что длительность безрецидивного периода уменьшалась с увеличением размеров первичной опухоли при наличии регионарного метастазирования, в группе больных с HER-2/neu позитивным статусом и позитивным статусом по онкогену-супрессору p53. Кроме того, при множественном метастатическом поражении костей скелета гиперкальциемии и повышенный уровень щелочной фосфатазы отмечали у большего числа пациентов, чем при единичном метастазировании в кости.

Нами изучено влияние совокупности 30 факторов на прогноз при раке молочной железы, и только с 8 факторами отслежена достоверная корреляционная взаимосвязь, позволяющая распределить больных на 2 прогностические группы.

На основании полученных данных проведено математическое моделирование индивидуального прогнозирования течения заболевания у больных раком молочной железы. Анализ проводился с использованием программы Microsoft Excel и дополнительного пакета макросов. Метод был апробирован на 342 больных, достоверность его составила 97 %.

Выводы. Принадлежность конкретного пациента по результатам моделирования к группе неблагоприятного прогноза позволяет предложить более тщательную программу диагностических мероприятий, проведение расширенного объема обследований с большей периодичностью и в более ранние сроки, планирование адьювантной химиотерапии уже на ранних стадиях заболевания, возможность адекватного диспансерного наблюдения больных раком молочной железы.

И. Г. Гатауллин, С. В. Петров, А. А. Валиев, А. И. Тухонов ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Клинический онкологический диспансер МЗ РТ, Казань

Цель исследования. Прогнозирование результатов лечения и его коррекция путем изучения клинико-иммуноморфологических параметров колоректального рака.

Материалы и методы. Работа основана на анализе результатов клинического обследования и лечения 76 пациентов с колоректальным раком, находившихся на лечении с 1999 по 2000 гг. При локализации опухоли в нижней и среднеампулярном отделе прямой кишки проводилась предоперационная лучевая терапия, и при поражении локорегионарных лимфатических узлов использовалась адъювантная химиотерапия. У всех пациентов, помимо стандартного гистологического исследования, удаленные препараты подвергались иммуногистохимическому исследованию, включавшему исследование экспрессии тканевых маркеров: тканевому РЭА, гену *p53*, Ki 67, протоонкогена *dcl 2*, *c-erb-B2*, фактора неангиогенеза CD31, цкр № 7.

Результаты. По стадии заболевания больные распределились следующим образом: 1-я стадия – 23 %, 2-я стадия – 38 %, 3-я и 4-я стадии – 33 и 6 % соответственно. Более 36 мес прожили 54 % исследованных пациентов. Экспрессия маркеров дифференцировки и пролиферации в клетках колоректального рака при иммуногистохимическом исследовании распределилась согласно таблице.

| Маркер | РЭА | p53 | Ki67 | CD31 | Vcl-2 | c-erb-B2 | Цкр № 7 |
|------------------|-----|-----|------|------|-------|----------|---------|
| Положительная, % | 74 | 83 | 76 | 79 | 20 | 19 | 29 |
| Умеренная, % | 21 | – | 16 | – | – | – | – |
| Отрицательная, % | 5 | 17 | 8 | 21 | 80 | 81 | 71 |

Выводы. На исход заболевания влияют многие клинико-морфологические данные (локализация опухоли, глубина инвазии, наличие или отсутствие метастазов в регионарных лимфатических узлах, степень дифференцировки опухоли и ряд других факторов) и иммуногистохимические параметры опухолевого роста (неблагоприятные факторы: положительная реакция на *p53* и *c-erb-B2*, отрицательные экспрессия *Vcl-2*, CD31). Изучение совокупности генетических маркеров в сочетании с клиническими и патоморфологическими особенностями злокачественных новообразований дает возможность судить о прогнозе заболевания и в соответствии с его генетическими характеристиками планировать лечебную тактику.

А. К. Голенков, Т. А. Митина, Т. Д. Луцкая, И. Н. Козарко, А. Ю. Барышников, М. В. Козлова, Е. В. Трифонова, Л. Л. Высоцкая

РОЛЬ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ СЫВОРОТКИ В ОПРЕДЕЛЕНИИ АКТИВНОСТИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского, Москва

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

Цель исследования. Определение концентрации свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов сыворотки на автоматическом анализаторе Hitachi 911 у леченных больных множественной миеломой (ММ) в зависимости от величины остаточной опухоли.

Материалы и методы. Метод (Freelight) основан на использовании антител к скрытым детерминантам СЛЦ (А. Bradwell). В исследование включены 20 больных множественной миеломой (ММ) III стадии. Больные были разделены на 2 группы в зависимости от объема остаточной опухоли, определяемого по концентрации парапротеина (PIg), выраженного в процентах по отношению к его исходным значениям. 1-ю группу составили 15 больных с PIg > 50 %, 2-ю – 5 с PIg < 50 %. Анализ проводили в зависимости от типа легких цепей PIg.

Результаты. В 1-й группе у больных с κ-типом ММ (n=11) концентрация СЛЦ-κ была в среднем 290 мг/л (18,2–1453), что значительно превышало норму 7,3 мг/л (3,3–19,4). В этой же группе у больных с λ-типом ММ (n=4) концентрация СЛЦ-λ была также значительно выше нормы – 333 мг/л (75,8–924) при норме 12,7 мг/л (5,7–26,3). Во 2-й группе больных с κ-типом ММ (n=3) концентрация СЛЦ-κ составляла 17,3 мг/л (4,9–30,7), а с λ-типом (n=2) – 23,15 мг/л (16,7–29,6). Очевидно, что в этой группе концентрация СЛЦ была близка к нормальным значениям. При анализе κ/λ-отношения СЛЦ сыворотки установлено, что у всех пациентов 1-й группы (за исключением 1) с κ-типом ММ оно превышало 1,65 (норма 0,26–1,65), а при λ-типе ММ выходило за пределы нормы (< 0,26), у 1 больного с Vj/λ ММ κ/λ было в пределах нормы. Во 2-й группе больных κ/λ-

отношение было в пределах 0,26–1,65 у 4 больных. У 1 больного этой группы с Vj/κ ММ κ/λ-отношение было больше 1,65.

Выводы. Метод определения СЛЦ непосредственно в сыворотке (Freelight) на нефелометре хорошо коррелировал с концентрацией PIg, определяемой электрофорезом. Несовпадение результатов Freelight и суточной протеинурии при Vj ММ может свидетельствовать о неточности последней и служить основанием для пересмотра результатов лечения. Учитывая короткое время полураспада СЛЦ и быстроту получения результатов их измерения, результаты Freelight-метода можно рассматривать как фармакодинамическую характеристику химиотерапии в реальном времени.

А. С. Гриневич, Е. Ю. Григорьева, М. Н. Краева, О. Н. Донская, И. В. Чинарева, Н. В. Голубцова, М. Г. Найденов, Т. Ф. Кучеренко,

И. Н. Нечкина, П. К. Иванов

ОСВОЕНИЕ ПРОМЫШЛЕННОГО ВЫПУСКА РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАБОРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ПРОСТАТА-СПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИГЕНА (ПСА) И АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНА (АФП)

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

В последние годы важную роль в диагностике злокачественных опухолей, оценке их распространенности, контроле эффективности лечения онкологических больных играют иммунометрические методы определения опухолеассоциированных антигенов (ОА-Аг), таких как иммуноферментный, иммунолюминесцентный и радиоиммунологический (РИА) анализ.

Основные достоинства РИА:

высокая чувствительность, точность и воспроизводимость метода; широкий диапазон определяемых концентраций; простота процедуры определения.

Радиоиммунологические исследования в целом и, в частности, определение опухолевых маркеров на сегодняшний день в России находятся в незаслуженном забвении, несмотря на то, что в свое время было создано более 400 специализированных лабораторий. При этом в России нет отечественных производителей РИА-наборов, и такие исследования полностью зависят от импорта, что существенно увеличивает себестоимость проводимых анализов. Вместе с тем в РОНЦ им. Н. Н. Блохина имеются все необходимые для создания таких наборов условия: материально-техническая база, высококвалифицированный научный персонал, имеющий огромный опыт работы с радиоактивными материалами. Важным обстоятельством является наличие в РОНЦ собственной коллекции гибридом - продуцентов моноклональных антител (МКАТ) к ОА-Аг, опыт гибридомной технологии и медицинских испытаний диагностических наборов.

Научным коллективом лабораторий радиоизотопных методов исследования и медицинской биотехнологии НИИ ЭДнТО инициирована тема НИР по созданию отечественных РИА наборов, первым этапом которой стала разработка диагностикумов для определения уровня 2 ОА-Аг: простата-специфического антигена (ПСА) и альфа-фетопротеина (АФП).

Ранее были разработаны методы выделения и очистки антигенов, получены и отобраны пары гибридом-продуцентов МКАТ к непрерывно продуцируемым эпитомам АФП и ПСА, что позволяло рассчитывать на использование их в «сэндвич»-системе. Были оптимизированы технологии наработки и очистки МКАТ с высокой активностью, необходимой для достижения заданных характеристик создаваемых диагностикумов.

В ходе исследования были оптимизированы условия радиоактивного мечения МКАТ для каждого типа РИА-наборов, откорректированы буферные системы и подобраны условия постановки РИА-реакций. Созданные радиоиммунологические диагностикумы по своим характеристикам, таким, как чувствительность, специфичность и точность, не уступают зарубежным аналогам, что было подтверждено тестированием сыворотки крови здоровых доноров и больных с доброкачественными и злокачественными опухолями различной локализации. Диапазон определяемых концентраций составил для ПСА 0,15–50 нг/мл, для АФП 0–350 нг/мл.

В настоящее время проводится подготовка нормативно-технической документации для медико-технических испытаний диаг-

ностикумов в МЗСР РФ, результатом которых ожидается внесение данной продукции в реестр медицинских изделий и разрешение их практического применения.

Т. Н. Заботина, А. А. Борунова, З. Г. Кадагидзе
**СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ
 ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ
 В ОНКОЛОГИИ**

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

В настоящее время очевидно, что успехи в лечении онкологических больных непосредственно зависят от уровня и точности диагностических мероприятий, в том числе от результатов проводимых клинико-лабораторных исследований. Это стало возможным, с одной стороны, в связи с разработкой и внедрением в клиническую практику современных тест-систем для определения поверхностных и внутриклеточных структур клеток и ДНК-специфичных зондов, с другой стороны, с максимальным использованием возможностей самого современного лабораторного оборудования в сочетании с компьютерным обеспечением для анализа и статистической обработки данных. Методом предпочтения в научно-практической работе современной клинико-иммунологической лаборатории сегодня является проточная цитофлюориметрия.

Проточная цитофлюориметрия имеет целый ряд достоинств: 1) анализу подвергается единичная клетка, а не группы клеток; 2) всегда есть отрицательный контроль, не зависящий от субъективного мнения исследователя; 3) скорость анализа составляет десятки тысяч клеток в секунду; 4) возможно одновременное изучение нескольких параметров в/на одной клетке, основанное на количественной оценке интенсивности флуоресценции; 5) отсутствует необходимость фрагментации исследуемого материала на отдельные субпопуляции, что значительно сокращает время приготовления образца.

В ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН метод проточной цитофлюориметрии обязателен при рутинных клинических и научных исследованиях. Так, мониторинг состояния иммунной системы больных с солидными новообразованиями включает оценку показателей клеточного иммунитета с применением двух- и трехцветного анализа поверхностных антигенов лимфоидных клеток, а также оценку функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Иммунодиагностика гемобластозов основана на выявлении линейной принадлежности бластных клеток по экспрессии поверхностных дифференцировочных антигенов. Однако в ряде случаев (ОМЛ, ХМЛ) изучается экспрессия и функциональная активность белков круга МЛУ – Pgp, MRP-1 и др. В наших исследованиях большое внимание уделяется оценке прогностической значимости экспрессии гликопротеидов, регулирующих апоптоз. Определение уровня внутриклеточных белков Bcl-2, Вах, р53mit, маркера ядерной пролиферации Ki-67 позволяет прояснить механизмы развития лимфопролиферативного заболевания, а также совершенствовать терапевтические подходы, основанные на нормализации регуляции апоптоза в лейкозных клетках.

*Е. Н. Захарова^{1,2}, Т. Н. Заботина¹, А. В. Чудинов³,
 А. С. Гриневич¹, Д. Ю. Блохин^{1,2}, П. К. Иванов^{1,2}*
**ДВУХЦВЕТНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ
 ПОПУЛЯЦИЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ
 ЦИТОМЕТРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
 ЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ IMD-306**

¹ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

²НПЦ «МедБиоСпектр», Москва

³Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

Введение. Проточная цитофлюориметрия интенсивно используется в различных областях биологии и медицины, в том числе в онкологии. Мультипараметрический анализ позволяет получать информацию о наличии и сочетании нескольких антигенов на поверхности отдельных клеток, проводить популяционный и субпопуляционный анализы многокомпонентных клеточных систем. При этом необходимо использовать несколько различных флуоресцентных зондов одновременно, что дает возможность проведения двух-, трех- и многоцветного анализа одного объекта. Однако для этого весь используемый набор флуорофоров должен обладать способностью к возбуждению флуоресценции монохроматическим светом установленного

в приборе лазера (обычно 488,5 нм), и при этом каждый из них должен флуоресцировать с эмиссией вторичных квантов в узких спектральных диапазонах, определяемых конструкцией прибора (каналы регистрации флуоресценции FL1, FL2, FL3, FL4).

Цель исследования. Определить пригодность конъюгатов отечественных моноклональных антител (МКА) (НПЦ «МедБиоСпектр») и активной флуоресцентной метки Imd-306 (ИМБ им. В. А. Энгельгардта РАН) для двухцветного анализа субпопуляций лимфоцитов человека.

Материалы и методы. Использовали конъюгированные с цианиновым красителем Imd-306 МКА к Т- (анти-CD4, клон ICO-86, соотношение метка/белок = 8–10/1 моль/моль; анти-CD8, клон ICO-31, м/б = 6–10/1 М/М) и В-клеточному (анти-CD20, клон ICO-180, м/б = 5:1 М/М) рецепторам лимфоцитов человека. Для определения рабочей концентрации конъюгатов МКА/Imd-306 исследовали их активность в диапазоне конечных концентраций 0,4–4,0 мкг/мл. В качестве второго зонда использовали FITC-меченные МКА анти-CD3, клон ICO-90 (НПЦ «МедБиоСпектр»). Реакцию клеток с двойной меткой проводили как последовательно, так и параллельно. В качестве референс-контроля для определения доли антиген-позитивных клеток (%) и медианы интенсивности флуоресценции (MFI) применяли коммерческие МКА (BD Pharmingen) к тем же антигенам, меченные FITC или PE. Результаты анализа учитывали на проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) в режиме DotPlot (2D-диаграмма), регистрируя флуоресценцию FITC по каналу FL1, а Imd-306 и PE – по каналу FL2.

Результаты. Оптимальная концентрация для Imd-306-конъюгатов МКА анти-CD4 и анти-CD8 находится в диапазоне 0,8–1,7 мкг/мл при соотношении м/б = 10/1 М/М, а для анти-CD20 – в диапазоне 1,7–4,0 мкг/мл как при последовательной, так и при параллельной реакции окрашивания.

Выводы. По аналитическим характеристикам синтезированные конъюгаты не уступают коммерческим аналогам и могут быть использованы для двухцветного анализа клеточных популяций.

*Е. Н. Захарова^{1,2}, Т. Н. Заботина¹, А. В. Чудинов³,
 А. С. Гриневич¹, Д. Ю. Блохин^{1,2}, П. К. Иванов^{1,2}*
**ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНЫЕ ЗОНДЫ
 НА ОСНОВЕ МКА СЕРИИ ICO
 И ОТЕЧЕСТВЕННОГО ФЛЮОРОФОРА IMD-306**

¹ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва;

²НПЦ «МедБиоСпектр», Москва;

³Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

Введение. Одним из наиболее информативных инструментов изучения клеточных популяций является проточная цитофлюориметрия. Возможности данного метода прямо зависят от свойств флуоресцентных зондов. Большинство специальных зондов получают конъюгированием специфических биоактивных молекул с активными формами флуорофоров. В качестве последних наиболее часто используют FITC, PE, PE-Cy5, Per-CP, APC.

В последние годы в проточной цитометрии используются и производные цианинового красителя Су3 в виде сукцинимидного эфира, который может связываться с антителами, авидином, ДНК и другими молекулами, содержащими группы первичных аминов. Эти соединения водорастворимы, мало чувствительны к изменению pH, практически не агрегируют при конъюгировании с другими молекулами, имеют приемлемые для проточных цитометров спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции. Однако широкое использование цианиновых красителей ограничено их высокой стоимостью: эксклюзивным производителем этих флуорофоров является компания Amersham. В ИМБ им. В. А. Энгельгардта (Россия) синтезирована группа цианиновых флуорофоров, сходных по физико-химическим свойствам с Су3, в частности, соединение Imd-306.

Цель исследования. Оптимизация условий получения флуоресцентных зондов на основе Imd-306 и мышинных моноклональных антител (МКА) серии ICO.

Материалы и методы. В работе использованы мышинные 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 цианинового красителя Imd-

306. Специфическую активность конъюгатов оценивали в прямой реакции поверхностной иммунофлюоресценции с последующим анализом на проточном цитофлюориметре FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) и регистрацией флюоресценции по каналу FL-2. Для сравнительной характеристики доли антиген-позитивных клеток в популяции (%) и медианы интенсивности флюоресценции (MFI) применяли коммерческие МКА к тем же антителам, конъюгированные с FITC и PE (BD Pharmingen, Caltag).

Результаты. Получены конъюгаты МКА и Imd-306 с различным соотношением краситель/белок. Показано, что оптимальным соотношением метки и иммуноглобулина для конъюгата CD20/Imd306 является 5:1 (моль:моль), для конъюгатов CD4/Imd306 и CD8/Imd-306 – в диапазоне 8-10:1 и 6-10:1 (моль:моль) соответственно.

Выводы. Конъюгирование флюоресцентного красителя Imd-306 с МКА в оптимальных соотношениях не оказывало сколько-нибудь заметного влияния на иммунохимические свойства последних, что позволяет рекомендовать синтезированные конъюгаты для цитометрического анализа клеточных популяций.

В. Д. Копачевский, А. В. Качинский, А. Н. Кузмин, П. Н. Прасад
**РАМАНОВСКАЯ МИКРОСПЕКТРОСКОПИЯ
 И КАРС МИКРОСКОПИЯ
 ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ**
 ООО «Промэнерголаб», Москва

Прогресс современной клеточной биологии и медицины непосредственно связан с методами и оборудованием, позволяющими проводить бесконтактный структурный анализ биологических образцов и протекающих в них процессов в реальном времени и с высоким пространственным разрешением. Оптическая лазерная микроскопия обладает неоспоримыми преимуществами и успешно дополняет существующие физико-химические, радиационные, электронно-лучевые методы анализа. Конфокальная флюоресцентная лазерная микроскопия в сочетании с достижениями в нанопотонике и синтезе флюоресцентных биомаркеров позволяет изучать состав и структурные превращения клетки. Для биологических образцов, которые не флюоресцируют и биологически не совместимы с внедряемыми флюоресцентными метками в силу токсичности последних в качестве контрастного механизма формирования сигнала могут быть использованы молекулярные колебательные свойства органических соединений, входящих в состав биологических объектов.

Одними из перспективных и интенсивно развивающихся в настоящее время направлений оптического анализа биологических объектов на клеточном уровне, основанными на характерных колебательных резонансах, являются Рамановская микроспектроскопия и микроскопия спонтанного рамановского рассеяния (СРР) и Когерентного анти-стоксового рамановского рассеяния (КАРС). В отличие от СРР с присущими ему ограничениями ввиду малой интенсивности сигнала и большой величины аутофлюоресцентного фона КАРС-отклик среды нелинейно зависит от мощности возбуждающего сигнала, и, как минимум, на 5 порядков превышает сигнал СРР.

В настоящем сообщении обсуждаются возможности оптических методов активного и спонтанного Рамановского рассеяния для бесконтактного, неразрушающего структурного клеточного анализа, и приборные средства для биологии и медицины, основанные на лазерной микроспектроскопии и сканирующей лазерной микроскопии СРР и КАРС. Широкое применение методов связано с перспективами в изучении меж- и внутриклеточных взаимодействий, изучении селективных процессов, происходящих на уровне мембраны, цитоплазмы, липидов, ядра и присущих ему РНК и ДНК взаимодействий.

В. Г. Лихванцева, И. А. Новиков, Е. А. Осипова
**ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРАЛЬНОЙ
 СОСТАВЛЯЮЩЕЙ АУТОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ
 КОЖИ И СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК
 В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ**

ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва

Введение. Аутофлюоресценция кожи несет информацию о химическом составе эпидермиса и дермы, количестве и кровенаполнении сосудов, пространственном распределении хромофоров и флюорофоров внутри кожи, их концентрации, а также об интенсивности метаболических процессов, происходящих в коже. Многие патологиче-

ские процессы в коже, включая опухолевые, протекающие с изменением метаболизма и кровенаполнения, могут привести к качественным и количественным изменениям аутофлюоресценции.

Цель исследования. Изучить спектральную составляющую аутофлюоресценции кожи и слизистых оболочек в норме и при развитии в них опухолей.

Материалы и методы. Количественную оценку составляющей спектров флюоресценции эндогенных флюорофоров в суммарном спектре аутофлюоресценции проводили по собственной оригинальной методике, спектроскопию – на ЛЭСА-«Биоспекс»(632,8 нм).

Результаты. Установлено, что суммарный спектр в диапазоне 650-800 нм при $\lambda_{ex}=632,8$ нм более, чем на 97 %, составляют спектры коллагена, кератина и порфиринов. Из этого следует, что любой произвольный спектр моделируется суммой 2 спектров-эталонов, взятых с разными коэффициентами. 1-м эталоном может выступать нативный спектр коллагена или тождественный ему спектр кератина, 2-м – спектр водного раствора синтетического ПП IX. При вычислении долевого участия ПП IX в формировании произвольного суммарного спектра критерием оценки может служить максимальная корреляция между произвольным суммарным спектром и модельным. Вклад флюоресценции ПП IX в суммарный спектр аутофлюоресценции, полученный с различных участков тела, различался. Так, в коже руки удельная доля спектра ПП IX составила 8,7 %, в коже век – 13,2 %, в слизистой губы – 18,4 %, в слезном мясе – 32,5 %. В ткани базальноклеточного рака кожи века удельная доля спектра ПП IX составила 31,0 %, в ткани интрадермального невуса этот же показатель не превышал 8,0 %. Таким образом, удельная доля спектра ПП IX в злокачественных новообразованиях достоверно превышала удельную долю ПП IX в нормальной коже интактного века.

Выводы: Проведенные исследования позволяют считать, что вычисление доли спектра ПП IX в суммарном спектре аутофлюоресценции может быть использовано в дифференциальной диагностике новообразований кожи и слизистых оболочек.

В. Г. Лихванцева, Е. А. Осипова, И. А. Новиков
**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ СПЕКТРАЛЬНЫЙ
 АНАЛИЗ В ДИАГНОСТИКЕ
 НОВООБРАЗОВАНИЙ КОЖИ ВЕК**

ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва

Введение. Флюоресцентная диагностика (ФД) с использованием фотосенсибилизаторов (ФС) является одной из перспективных и надежных диагностических технологий обнаружения опухолей кожи. ФД проводится на основе анализ флюоресцентных изображений новообразований.

Цель исследования. Изучить возможности метода дифференциального спектрального анализа с использованием флюоресцентных изображений в диагностике новообразований кожи век.

Материалы и методы. Наблюдали 28 пациентов с новообразованиями кожи век (11 – с базальноклеточным раком (БКР), 6 – с интрадермальными невусами, 3 – с кожным рогом, 3 – со слабопигментированной меланомой и 5 – с гемангиомой). Пациенты *per os* получали препарат 5-аминолевулиновой кислоты (аласенс) в дозе 15 мг на кг массы тела. Используя в качестве источника возбуждающего излучения люминесцентные лампы (433 нм), с помощью цифровой камеры получали трехканальное (RGB) изображение. Вычисляли удельную долю цветового канала, содержащего информацию о флюоресценции протопорфирина IX (R %). Затем рассчитывали разницу (колориметрический отход) между R % в новообразовании и R % в окружающих тканях (ΔR). Обработку производили с помощью оригинального программного обеспечения CancerPlot.

Результаты. Отмечается статистически достоверная разница ΔR для беспигментных доброкачественных и злокачественных новообразований. Так ΔR при базальноклеточном раке колеблется в диапазоне от +8,4 % до +24,3 %, а при беспигментных интрадермальных невусах не превышает +1,5 %. Значения ΔR при гемангиомах принимали нулевые либо слабые отрицательные (-0,5 %). Основание кожного рога характеризуется высокими положительными значениями, соизмеримыми с БКР (от +12,7 % до +15, %), в то время, как его апикальная часть (гиперкератоз) – отрицательными значениями (от -10,6 % до -9,8 %). Аналогичная картина наблюдалась при меланоме кожи века: периферическая часть новообразования (зона роста?) характеризова-

лась слабоположительными значениями (от +3,1 % до +5,0 %), а центральная её часть – слабоотрицательными (от -3,1 % до 2,5 %).

Выводы. Метод ДСА может быть использован в дифференциальной диагностике новообразований кожи.

В. Г. Лихванцева, О. А. Анурова, М. В. Верещагина
**РОЛЬ МАРКЕРА NM-23 В ПАТОГЕНЕЗЕ
 УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ**

*ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва
 ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

Введение. Роль белка nm23 в патогенезе неопластических процессов еще не ясна. Установлено, что в некоторых опухолях клетки с высоким метастатическим потенциалом утрачивают экспрессию nm23 или экспрессируют этот протеин на низком уровне. В качестве биологических функций за белком nm23 признаны: супрессия метастазирования, участие в опухолевой дифференцировке и клеточной пролиферации.

Цель исследования. Изучить роль nm23 в патогенезе увеальной меланомы (УМ).

Материалы и методы. Проводили ИГХ-исследования на 50 архивных парафиновых блоках УМ с маркером nm23 (фирма DAKO). Результаты оценивали по уровню и частоте экспрессии. Выделяли слабую, умеренную и выраженную экспрессию или ее отсутствие. Для выявления коррелятивных связей между ИГХ-данными и метастазированием проводили анализ выживаемости по Каплан-Мейеру среди пациентов с диаметрально противоположными значениями экспрессии белков.

Результаты. Экспрессия nm23 имела место в 34 случаях (68 %) из 50 тестируемых УМ. Синтез белка происходил в ядрах клеток УМ одинаково часто у мужчин и женщин. Амплитуда экспрессии увеличивалась по мере увеличения возраста пациента (коэффициент корреляции $k=0,30$, $p=0,034$). Экспрессия nm23 усиливалась по мере того, как в опухоли увеличивалось количество эпителиоидных клеток ($k=0,31$ $p=0,033$). Достоверно чаще маркер отсутствовал там, где была слабее атипия (I степень, $p<0,05$). Амплитуда экспрессии белка усиливалась по мере прогрессирования заболевания. Синтез белка тесно коррелировал с уровнем пигментации опухоли: его частота и уровень экспрессии нарастали по мере усиления степени пигментации опухоли; достоверно чаще слабо пигментированные опухоли давали негативную реакцию с маркером. В то же время в умеренно и густо пигментированных опухолях чаще и на более высоком уровне происходила (умеренная + выраженная) экспрессия nm23 ($p<0,0001$).

Статистически значимые различия в показателях 3- и 5-летней выживаемости по Каплан-Мейеру в группах пациентов с nm23-позитивной УМ и nm23-негативной УМ не выявлены.

Выводы. Проведенные исследования позволяют считать, что белок-регулятор nm23 определенно вносит свой потенциал в прогрессирование. Об этом свидетельствует коррелятивная связь уровня его экспрессии с прогрессированием УМ. Однако возможность прогнозирования исходов УМ на основе экспрессии nm23 не доказана.

Вероятно, более перспективны исследования экспрессии nm23 в комплексе с другими молекулярно-биологическими маркерами. Они могут предоставить дополнительную информацию с уточнением его роли в прогрессировании и способствовать разработке новых стратегий диагностики, прогнозирования и лечения УМ.

В. Г. Лихванцева, О. А. Анурова, М. В. Верещагина
**СПОСОБ ОДНОВРЕМЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ
 И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДА
 НЕОПЛАСТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА
 ПРИ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЕ**

*ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва
 ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

Введение. Согласно стандартам ИГХ-диагностики все меланомы верифицируются на основании позитивной реакции с меланоцитарными маркерами и маркером S-100. При этом вопрос о чувствительности и специфичности меланоцитарных маркеров при увеальной меланоме (УМ) широко дискутируется.

Цель исследования. Поиск наиболее надежных, чувствительных и специфичных маркеров в ИГХ-диагностике и прогнозе УМ.

Материалы и методы. Проводили ИГХ-исследования на 83 парафиновых блоках УМ. В качестве маркеров использовали S-100, меланин-A, HMB45, MITF и тирозиназу (фирмы DAKO и NOVOCASTRA). Результаты ИГХ оценивали по уровню и частоте экспрессии. Выделяли слабую, умеренную и выраженную экспрессию или ее отсутствие. Проводили многофакторный корреляционный анализ. Связь между ИГХ-данными и исходами заболевания анализировали по выживаемости по Каплан-Мейеру среди пациентов с диаметрально противоположными значениями экспрессии белков.

Результаты. Все меланоцитарные маркеры обладали высокой специфичностью и примерно равноценной чувствительностью: специфичность MITF достигала 100 %, чувствительность – 98 %; тирозиназы – 100 % и 98,6 % соответственно. HMB-45, как и меланин-A, позволял в 100 % случаев распознать УМ. Однако экспрессия меланина-A в УМ была слабой. Это затрудняло визуализацию ИГХ-реакции в клетке. Повысить надежность ИГХ-метода можно было, включив в панель сразу несколько меланоцитарных маркеров. Обоснованность приема доказывалась статистически: в УМ, гиперэкспрессирующих HMB-45 (+++), имела место гипоэкспрессия (+) меланина-A ($p<0,1$). Мы объяснили это тем, что маркеры отражали разные стадии меланогенеза. Роль всех тканедифференциальных маркеров в прогнозе УМ проверяли на архивных блоках. Оказалось, что почти все тканедифференциальные маркеры не пригодны для прогнозирования исходов неопластического процесса. Исключение составил S-100. Его экспрессия имела обратно пропорциональную высоко достоверную корреляционную связь со степенью малигнизации опухолевых клеток. Экспрессия S-100 ослабевала по мере снижения тканевой дифференцировки ($p=0,05$). Уровни экспрессии S-100 коррелировали исходами заболевания. Выявленный факт позволял использовать количественные показатели экспрессии S-100 в качестве самостоятельного, независимого фактора прогноза, позволяющего с высокой степенью достоверности (95 % совпадений) осуществлять параллельно с диагностикой отбор пациентов в группу риска развития метастазов.

Выводы. Панель маркеров для одновременной ИГХ-диагностики УМ должна включать S-100, а также меланоцитарные маркеры меланина-A и HMB45, отражающие разные стадии меланогенеза, при этом количественные показатели S-100 могут служить самостоятельным фактором прогноза.

В. Г. Лихванцева, О. А. Анурова, М. В. Верещагина
**РОЛЬ МЕСТНЫХ КЛЕТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ
 ИММУННОГО ОТВЕТА
 В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ИСХОДА
 НЕОПЛАСТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА
 ПРИ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЕ**

*ГУ НИИ глазных болезней РАМН, Москва
 ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва*

Введение. Известно, что клеточные реакции иммунного ответа играют важную роль при злокачественных солидных опухолях. Количественные и качественные показатели инфильтрирующих опухоль лимфоцитов порой предопределяют исход заболевания. Однако когда речь идет об опухолях забарьерных органов, таких, как глаз, мнения исследователей расходятся, в связи с чем целью нашей работы было: изучить роль местных клеточных реакций иммунного ответа в прогнозировании исхода неопластического процесса при увеальной меланоме (УМ).

Материалы и методы. Проводили ИГХ на 78 парафиновых блоках УМ. В качестве маркеров использовали CD68 и LCA/CD45 (разведение 1: 100, фирма DAKO). Результаты ИГХ оценивали по уровню и частоте экспрессии. Выделяли слабую, умеренную и выраженную экспрессию или ее отсутствие. Проводили многофакторный корреляционный анализ. Для выявления коррелятивных связей между ИГХ-данными и исходами заболевания (метастазированием и смертностью) проводили анализ выживаемости по Каплан-Мейеру среди пациентов с диаметрально противоположными значениями экспрессии белков.

Результаты. Доказано, что инфильтрация УМ макрофагами (CD68) является сигналом неблагоприятного исхода заболевания. Экспрессия CD68 ($n=78$, 86,7 % экспрессии) усиливалась по мере роста площади основания опухоли, повышения в УМ количества со-

судов, усиления ядерной и клеточной атипии опухолевых клеток. Каждый из перечисленных признаков – атрибут усиления малигнизации опухоли, а, следовательно, событие, приводящее к ухудшению витального прогноза. Это объясняет, почему гиперэкспрессия CD68 ассоциируется с повышением риска развития летального исхода при УМ ($k=0,2440$, $p=0,1$). Однако достоверной разницы в показателях выживаемости по Каплан-Мейеру мы не получили. Более значимым в прогнозе УМ оказался другой тип иммунокомпетентных клеток – CD45. Инфильтрация УМ клетками, маркирующимися CD45 ($n=78$, 85, 5% экспрессии), нарастала параллельно с усилением агрессивности УМ (с усилением васкуляризации, митотической активности, ядерной и клеточной атипии). Избыток клеток в опухоли с иммунофенотипом CD45 ассоциировался с высокой степенью риска летального исхода ($k=0,2265$, $p=0,1$). Вероятность совпадений прогноза по CD45 – 90%.

Выводы. Несмотря на то, что усиление клеточных реакций иммунного ответа в виде инфильтрации опухоли иммунокомпетентными клетками в целом носит положительный характер, для УМ это ассоциируется с плохим витальным и клиническим прогнозом. По-видимому, это связано с нарушением гематоофтальмического барьера, вызванного опухолью, выходом опухолевых клеток в периферическое русло и представлением их АГ иммунной системе с последующим развитием местных клеточных реакций иммунного ответа.

Г. З. Мухаметшина, Р. Ш. Хасанов, И. А. Гилязутдинов, К. Т. Шакиров

КОРРЕЛЯЦИЯ ФАКТОРОВ ПРОГНОЗА С КЛИНИЧЕСКИМ ТЕЧЕНИЕМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Клинический онкологический диспансер МЗ РТ, Казань

Задачи исследования – выявление неблагоприятных факторов прогноза у больных раком молочной железы и назначение патогенетически обоснованной терапии.

Абсолютное число заболевших и умерших в России в 2004 г. составило почти 48 тыс. и 23 тыс. соответственно. К группе традиционных прогностических факторов РМЖ относятся возраст, менструальный статус, размер первичного очага, количество пораженных лимфоузлов, стадия заболевания и гистологический тип опухоли; к неблагоприятным признакам – низкая дифференцировка опухоли, инвазия опухолевыми клетками лимфоидных и кровеносных сосудов. Клинические и морфологические характеристики болезни являются недостаточно точными для предсказания прогноза течения болезни и эффекта химиотерапии. На 1-е место в прогнозировании течения опухолей выходит молекулярная морфопатология, которая учитывает наличие / отсутствие онкогенов и супрессоров опухолевого роста. Определение геномных нарушений, детерминирующих развитие опухоли, степень её злокачественности, метастатический потенциал и скорость прогрессии являются приоритетными в современной онкологии.

Определение молекулярно-биологических маркеров в ткани опухоли может давать дополнительную информацию о скорости ее роста, способности к инвазии и метастазированию, устойчивости к химиопрепаратам.

Имуногистохимическое определение белков в клетках совпадает с данными, полученными при использовании методов определения изменений на геномном уровне.

Исследование прогностических маркеров в комплексе с клиническими данными поможет выбрать наиболее эффективные методы лекарственной терапии индивидуально.

Нами обследованы 356 больных раком молочной железы, у которых были определены гормональный статус (эстрогены / прогестерон), HER-2/neu и другие прогностические факторы. Среди них положительный статус по HER-2/neu был у 88 пациенток, отрицательный – у 268. Это позволило выбрать оптимальные методы лечения для каждой пациентки в зависимости от того или иного прогностического фактора. Неoadъювантную химиотерапию получили 33 пациентки, лучевую терапию (предоперационную или послеоперационную) – 441, адъювантную химиотерапию – 286, гормональную терапию – 86. Исследование продолжается.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СКОРОСТИ ПРИРОСТА И ВРЕМЕНИ УДВОЕНИЯ ПСА В ОЦЕНКЕ ПРОГНОЗА ГОРМОНОТЕРАПИИ РПЖ

Онкологический диспансер №3, Москва

Задачи исследования. Оценить целесообразность использования определения времени удвоения ПСА (PSA-DT) и скорости прироста ПСА (PSA-V) у больных, получающих гормонотерапию РПЖ, определить корреляцию с объективными признаками прогрессирования и развития резистентности, а также показатели прогноза прогрессии РПЖ.

Материалы и методы. 64 пациента с РПЖ наблюдались в ОД № 3 г. Москвы. Распределение по степени распространенности РПЖ: локализованный – 19 (29,7%) больных, местнораспространенный – 19 (29,7%), генерализованный – у 26 (40,1%) больных. ГТ проводилась в период с 06.1993 по 11.2006 г. Возраст больных колебался от 56 до 81 года, средний возраст составил $68,8 \pm 7,37$ года, медиана – 69,5 год, интерквартильный размах – 63–74 года.

У больных РПЖ определяли при ПРИ, ТРУЗИ. Морфологическая верификация больных получена при биопсии ПЖ. Опухолевое поражение одной доли ПЖ выявлено у 36 (54,3%) больных, обеих долей – у 28 (43,7%). По степени дифференцировки (по шкале ВОЗ) у 23 (35,9%) больных определяли высокодифференцированные (G1) опухоли, у 18 (28,2%) – умеренно-дифференцированные (G2) и у 23 (35,9%) – низкодифференцированные (G3). Уровень ПСА у больных в группе ГТ колебался от 4,35 до 198 нг/мл, средний уровень составлял $72,3 \pm 18,8$ нг/мл, медиана уровня ПСА – 35,4 нг/мл, интерквартильный размах – 23,1–99,2 нг/мл. При определении связи между уровнем ПСА и клинической стадией у больных в группе ГТ выявлена сильная прямая корреляция (коэффициент корреляции $R=0,76$, $p<0,001$, метод Спирмена). При сравнении уровня ПСА в подгруппах больных с интра- и экстракапсулярными опухолями также выявлены статистически достоверные различия ($p<0,001$, критерий U Манна-Уитни). 33 (51,9%) больных проводили непрерывную ГТ, 31 (48,1%) – интермиттирующую ГТ. При сравнении подгруппы непрерывной и интермиттирующей ГТ не отмечено статистически достоверных различий между числом больных с интра- и экстракапсулярными опухолями ($p=0,3$, метод χ^2 Пирсона). При сравнении степени дифференцировки опухоли также не выявлено статистически достоверных различий между подгруппами интермиттирующей (ИТГТ) и непрерывной ГТ (НГТ) ($p=0,24$, метод χ^2 Пирсона). Подгруппы непрерывной и интермиттирующей терапии оказались однородными и по уровню ПСА, различий между концентрацией ПСА в обеих подгруппах не выявлено ($p=0,16$, критерий U Манна-Уитни).

Результаты. PSA-DT, PSA-V коррелированы с T-стадией ($P=0,000$), дифференцировкой РПЖ ($P=0,000$), суммой баллов по Глиссону ($P=0,005$), со временем смерти ($P=0,000$), временем объективного прогрессирования ($P=0,003$), уровнем первичного ПСА ($P=0,03$), временем развития резистентности ($P=0,002$). Первичное определение влияния на общую выживаемость (ОВ) по результатам анализа: чем короче PSA-DT и выше PSA-V, тем вероятнее снижение ОВ.

Выводы. PSA-V и PSA-DT, независимо друг от друга, в мониторинге течения РПЖ являются предикторами прогрессирования заболевания. Контроль за временем удвоения ПСА и скоростью прироста ПСА позволит определить резистентность РПЖ и своевременно выбрать другой вариант лечения. В группах ИТГТ и НГТ различия в выживаемости и развитии резистентности выявлено не было.

Г. А. Раскин^{1,2}, С. В. Петров^{1,2}, Р. Ш. Хасанов¹ КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ-II- А И P21/WAF1 НЕОБХОДИМА ПЕРЕД НАЗНАЧЕНИЕМ ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹Клинический онкологический диспансер МЗ РТ, Казань

²Казанский государственный медицинский университет, Казань

Введение. Хорошо известно, что топоизомераза-II- α представляет собой мишень для препаратов ряда антрациклина, а эффективность терапии антрациклинами зависит от уровня экспрессии топоизомераза-II- α . В то же время результат химиотерапии таксонами сильно зависит от уровня экспрессии и активности p21/waf1.

Цель исследования. Разработка и апробирование комплексного подхода к анализу экспрессии и активности p21/waf1, а также уровня топоизомеразы-II- α .

Материалы и методы. Были изучены 23 случая с известной позитивной иммуногистохимической реакцией на HER2 (++ и +++ по критериям HercepTest), где проводился анализ амплификации гена (FISH и CISH), а также иммуногистохимическое морфометрическое исследование E-кадгерина, CD44v6, p21/waf1, топоизомеразы-II- α , Ki-67 при помощи морфометрической станции Leica CTR5000 и программы Leica Qwin Plus. Оценивались поля зрения при увеличении $\times 200$ (2000 клеток) с максимальной экспрессией данного маркера, минимальной и средней экспрессией. Вычислялся средний процент позитивных опухлевых клеток. Далее сравнивались полученные относительные величины каждого маркера. Мы не применяли методов вариационной статистики, так как имели право производить арифметические действия между относительными величинами, анализировались серийные срезы, экстраполяция результата каждого маркера осуществлялась на весь срез. Точный подсчет процента экспрессии маркеров в каждой опухоли на серийных срезах позволял делать выводы об активности p21/waf1, уровне экспрессии топоизомеразы-II- α , процентном распределении раковых клеток в клеточном цикле.

Результаты. Процент раковых клеток, экспрессирующих p21/waf1 сопоставлялся с уровнем экспрессии Ki-67 в каждой опухоли. Ki-67 окрашивает клетки, находящиеся в поздней G1 фазе клеточного цикла, а также в S-, G2- и M-фазах. При исследовании на p21/waf1 учитывался характер иммуногистохимической реакции: цитоплазматическая, ядерная или смешанная. Цитоплазматическая реакция может свидетельствовать о 2 вариантах: либо белок p21/waf1 не активен и не выполняет своей функции ингибитора циклин-зависимых киназ, либо p21/waf1 активен и клетка находится в S-фазе клеточного цикла. Ядерная реакция указывает на то, что, во-первых, белок p21/waf1 активен, а во-вторых, клетка находится в G1- или G2-фазах клеточного цикла. Оказалось, что при сверхэкспрессии HER2 может наблюдаться несколько вариантов статуса опухоли по белку p21/waf1: активное состояние (17 % случаев), неактивное (13 % наблюдений), смешанное состояние – 43 % случаев (в опухоли одни раковые клетки были с активным p21/waf1, другие – с неактивным) и потеря экспрессии p21/waf1 (27 % наблюдений). Анализ экспрессии топоизомеразы-II- α (которая также сопоставлялась с уровнем экспрессии Ki-67) показал, что ее нормальный уровень и сверхэкспрессия наблюдается в 39 %, а сниженная экспрессия – в 61 % случаев. Анализ молекул адгезии также выявил различные состояния их экспрессии.

Вывод. Сравнительная количественная иммуногистохимическая оценка p21/waf1, топоизомеразы-II- α , Ki-67 может стать методом выбора для предсказания эффективности антрациклинов и таксанов в лечении рака молочной железы.

Д. В. Соколов¹, А. Н. Махсон¹, С. Г. Кузьмин², Г. Н. Ворожцов²
**СОВРЕМЕННАЯ ЦИФРОВАЯ
 ДЕРМАТОСКОПИЯ В ОНКОДЕРМАТОЛОГИИ**

¹Московская городская онкологическая клиническая больница № 62, Москва

²ГУП «МНКЦ «Интермедбиофизхим», Москва

В настоящее время дерматоскопия (эпилуминисцентная микроскопия, дермоскопия, поверхностная микроскопия кожи) является одним из основных методов неинвазивной диагностики меланомы кожи в ведущих онкодерматологических клиниках Европы, Австралии и Америки. Использование компьютерных технологий позволило создать дерматоскопическое оборудование для автоматического распознавания меланомы.

В Московской городской онкологической больнице № 62 совместно с ГУП «МНКЦ «Интермедбиофизхим» проходит клиническую апробацию медицинский прибор FotoFinder Dermoscope II (Германия) для дерматоскопического исследования у пациентов с пигментными новообразованиями кожи.

В настоящее время обследованы 39 пациентов с 93 пигментными новообразованиями кожи. Всем больным выполнялись панорамные снимки кожных покровов с последующей маркировкой выявленных подозрительных пигментных новообразований кожи. Затем было проведено дерматоскопическое исследование каждого выделенного

пигментного новообразования (93) с использованием автоматической экспертной оценки («Mole Analyzer»).

Проведенная клиническая апробация продемонстрировала большие потенциальные возможности применения FotoFinder Dermoscope II с программным обеспечением «Mole Analyzer» в клинической практике, особенно при осмотре и динамическом наблюдении пациентов из группы риска.

В. А. Тронов, А. Д. Козлова, Л. Ю. Дедерер, А. Г. Кедрова, Л. Б. Горбачева

РОЛЬ КОРРЕКЦИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ДНК (MMR) В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

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

Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля, Москва

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

Тотальная репарационная способность – широко распространенный фенотипический маркер предрасположенности к возникновению злокачественных новообразований. Оценка этого показателя предполагает использование в клеточной системе *in vitro* challenge-мутагена, позволяющего проявить латентную генетическую нестабильность и репаративную недостаточность в тестируемых клетках. Традиционно в таких исследованиях используются 2 показателя мутагенной чувствительности: хромосомные aberrации и генотоксический эффект (метод ДНК-комет). 5 механизмов репарации ДНК вносят свой вклад в тотальную репаративную способность клетки: прямая ферментативная инактивация повреждений, эксцизионная репарация нуклеотидов, эксцизионная репарация оснований, коррекционная репарация (MMR) и репарация двуниевых разрывов (ДР). Большая группа онкопатологий связана с дефицитом MMR: колоректальный рак, рак яичников, рак тела матки и некоторые другие. Для этих опухолей пониженный уровень активности MMR может служить биомолекулярным маркером заболевания. Мы разработали методику оценки функциональной активности MMR в клетках. Она основана на определении количества вторичных ДР ДНК в клетках, пульс-обработанных challenge-мутагеном метилнитрозомочевинной (МНМ). Мутаген метилирует основания в ДНК. Вторичные разрывы образуются в результате процессинга метилированного основания Об-метилгуанина при функционировании активной коррекционной репарации в пострепликативный период. Таким образом, вторичные ДР позволяют количественно определить активность MMR в клетке и в конечном счете оценить связь между активностью MMR в лимфоцитах и риском развития заболевания. Это представление проверено на MMR-дефицитных колоректальных опухолях человека, а также на лимфоцитах здоровых доноров и больных раком яичников и тела матки. Цитотоксический эффект МНМ (апоптотическая гибель лимфоцитов) оценивался 2 показателями: взаимодействием с комплексом аннексин V-FITC и по морфологическим изменениям ядра клеток после их окрашивания смесью 2 ДНК-тропных красителей. Генотоксический эффект МНМ (вторичные ДР ДНК) определялся с помощью метода нейтральных ДНК-комет, модифицированного для подсчета комет, характерных только для делящихся лимфоцитов, меченых BrUdr. Доля таких комет отражала индекс пролиферации клеток. Показано, что покоящиеся лимфоциты были устойчивы к гено- и цитотоксическому эффектам МНМ. В пролиферирующих клетках в ответ на действие МНМ формировались вторичные разрывы ДНК ($p \leq 0,01$) и возростала частота апоптотических клеток ($p \leq 0,05$). Генотоксический эффект МНМ на стимулированных лимфоцитах больных раком яичников и тела матки был в 4 раза ниже, чем на лимфоцитах здоровых доноров. В лимфоцитах больных не изменялся пролиферативный индекс в ответ на действие МНМ, а в лимфоцитах здоровых доноров наблюдалось снижение этого показателя в 2 раза в ответ на МНМ. Полученные результаты обнаруживают связь между гено- и цитотоксическим ответом лимфоцитов на действие МНМ и раком яичников и тела матки. Поскольку генотоксический эффект наблюдается только в делящихся лимфоцитах и через сутки после воздействия этого агента, мы полагаем, что он связан с пострепликативной MMR, субстратом которой является Об-метилгуанин в составе ДНК. Дефицит MMR в лимфоцитах больных определяет их устойчивость к действию МНМ. Генотоксический ответ лимфоцитов на воздействие МНМ может служить маркером MMR. Дефицит MMR был нами обнаружен в лимфоцитах больных раком яичников.

Я. Ф. Шамсутдинова, И. Г. Гатауллин, С. В. Петров
**КОСТНОЕ МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ
 У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Казанская государственная медицинская академия

Введение. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями в мире рак молочной железы занимает 3-е место и составляет 10 % всей заболеваемости. Эта опухоль дает 70 % всех костных метастазов при онкологических заболеваниях.

Цель исследования. Улучшение методов ранней диагностики костных метастазов у больных раком молочной железы (РМЖ).

Задачи исследования. 1. Изучение частоты и локализации костных метастазов у больных РМЖ. 2. Изучение уровня кальция в сыворотке крови.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ историй болезни и амбулаторных карт 430 больных РМЖ с метастазами в кости (с 1997 по 2003 гг.). Выявлены следующие гистологические типы опухолей: инфильтрирующие раки – 78 %; 52 % – протоковый инфильтрирующий рак; 18 % – протоковый инвазивный рак с преобладанием внутрипротокового компонента; 8 % – дольковый инфильтративный рак; аденокарцинома – 10 %; неинфильтрирующий внутрипротоковый рак составил 9 %; слизистый рак – 3 %. Рентгенографическое обследование костной системы было проведено 98,0 % больных; ОСГ – 70,5 %; КТ – 24,5 %.

Результаты. Выявлены характерные для РМЖ локализации костных метастазов: поясничный отдел позвоночника – в 60,8 % случаев, у 44,3 % больных – в L5, у 43,0 % – в L2, у 41,7 % – в L1, у 40,5 % – в L3, у 31,6 % – в L4; у 44,6 % отмечено поражение грудного отдела позвоночника; у 34,6 % больных – метастазирование в ребра. Чаше встречалось сочетанное поражение различных отделов костной системы. Кроме того, был исследован уровень кальция в сыворотке крови. У 43,3 % больных уровень кальция оставался в пределах нормы, у 51,6 % наблюдалась гиперкальциемия, среди которых 93,5 % больных имели множественные костные метастазы, у 6,45 % отмечалось наличие единичных метастазов. У 43,3 % больных показатель уровня кальция в сыворотке находился в пределах нормы: из этой группы у 80,7 % больных имелись единичные метастазы, у 9,2 % больных – множественные метастазы. У 5,0 % больных отмечалась гипокальциемия при наличии единичных метастазов.

Выводы. 1. Наиболее часто костные метастазы РМЖ локализуются в поясничном отделе позвоночника. 2. При наличии множественных костных метастазов у больных РМЖ наиболее вероятно развитие гиперкальциемии.

И. Ж. Шубина, И. С. Стилиди, А. В. Пирогов,
 Н. В. Малахова, Ф. В. Доненко, М. В. Киселевский
**ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ ДИАГНОСТИКА
 МИКРОМЕТАСТАЗОВ В КОСТНОМ МОЗГЕ И
 ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛАХ
 ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ
 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА
 ИММУНОМАГНИТНОЙ СЕПАРАЦИИ**

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

Цель исследования. Оценка возможности применения иммуномагнитной сепарации для интраоперационной диагностики микрометастазов в лимфатических узлах и костном мозге у больных немелкоклеточным раком легких и раком пищевода.

Материалы и методы. Пробы для исследования были взяты у 25 пациентов в возрасте от 40 до 65 лет. Больным проводили лечебное хирургическое вмешательство по поводу немелкоклеточного рака легких и рака пищевода II-III стадий. Резерцированный на этапе торакотомии сегмент ребра и удаленные в процессе операции регионарные лимфатические узлы использовали для анализа на микрометастазы. Удаленный сегмент ребра и лимфатический узел забирали непосредственно из операционной в лабораторию. Выделение цитокератин-положительных (ЦК+) клеток из МНК костного мозга и лимфатических узлов проводили посредством положительной селекции клеток с использованием набора для магнитной сепарации опухолевых клеток.

Результаты. В результате магнитной сепарации образцов костного мозга, взятых у 25 онкологических больных, в 15 случаев были обнаружены от 2 до 15 ЦК+ клеток, окруженных магнитными шариками в виде розеток. В позитивных образцах при окрашивании гематоксилином-эозином выявлялись крупные клетки с ядрами округлой или овальной формы, которые, как правило, при цитологическом анализе не могли быть квалифицированы как опухолевые. Лишь в 2 случаях ЦК+ клетки имели признаки атипии. У 4 пациентов в морфологически интактных лимфатических узлах обнаружены единичные ЦК-позитивные клетки, которые при окрашивании гематоксилином-эозином также были расценены как опухолевые.

Выводы. Метод магнитной сепарации позволяет получить обогащенную фракцию цитокератин-положительных клеток и может быть использован для целей интраоперационной диагностики микрометастазов. Для более точной верификации микрометастазов в костном мозге и лимфатических узлах онкологических больных необходимо дополнительное стандартное окрашивание клеток с последующим цитологическим исследованием.