

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ EGFR (РЕЦЕПТОР ФАКТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО РОСТА) НА АПОПТОЗ И КЛЕТОЧНУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ПРИ РАКЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Агаев Б., Муслимов Г., Ягублу В., Гейдрих Б.

Научный центр хирургии им. М. Топчубашова, Азербайджан

Мангеймская хирургическая клиника Гейделбергского университета, Германия

ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз, или запрограммированная смерть клетки, — специальная программа суицида клеток, которая является необходимой для развития и сохранения здоровой ткани. Дерегуляция этого процесса в основном происходит вследствие развития раковых перерождений, аутоиммунной болезни и нейродегенеративных разрушений.

В настоящее время для интерпретации апоптотических процессов применяются два наиболее значимых подхода: гибель соответствующих рецепторов и изменения митохондрий. Предварительное изучение обоих процессов показало, что блокирование фактора эпидермального роста и его рецепторов может привести к апоптозу в сложноструктурных образованиях раковых клеток, включая рак поджелудочной железы (РПЖ) [16–18].

Тем не менее механизм действия и эффективность новых ингибиторов EGFR, их влияние на апоптоз при раке поджелудочной железы еще недостаточно хорошо изучены. Целью данного исследования является изучение эффективности нового ингибитора EGFR AG и его влияние на апоптоз и клеточную пролиферацию в клеточной линии РПЖ.

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

По литературным данным последних лет, среди смертей от разновидностей рака рак поджелудочной железы занимает 4–5-е место в мире [1]. Каждый год от этой болезни только в Европе умирает около 40 000 человек, в Соединенных Штатах Америки — 30 000 человек [2, 3].

Из-за поздней диагностики рака поджелудочной железы средняя продолжительность жизни больных составляет менее 6 месяцев, при этом 12-месячная выживаемость с данным диагнозом составляет 10%, а 5-летняя выживаемость наблюдается лишь у 3–5% больных [4, 18]. При диагностике РПЖ лишь в 10–15% случаев присутствует показание к хирургическому лечению, после которого средняя продолжительность жизни больных составляет

10–18 месяцев, а до 5 лет выживают только 17–24% больных [5].

J.P. Neoptolemos и соавт. (2003) пришли к выводу о том, что главными причинами короткой продолжительности жизни при злокачественных опухолях поджелудочной железы являются:

- достаточно позднее диагностирование болезни;
- возможность успешного хирургического лечения лишь в специализированных центрах;
- резистентность рака поджелудочной железы к существующим терапевтическим методам из-за принадлежности к агрессивному биологическому фенотипу.

Однако, несмотря на эти проблемы, в последние годы в диагностике, адъювантивной и неоадъювантивной терапии, а также в хирургическом лечении РПЖ достигнуты значительные успехи. В ряду этих достижений особое место занимает изучение молекулярного онкогенеза рака поджелудочной железы [4, 5, 6, 7, 8].

Самой значимой из достижений молекулярной биологии является генная терапия, уже применяемая в современной клинической практике [6, 8, 18].

Целью генной терапии является:

- торможение абнормальной экспрессии онкогенов;
- активизация функционально ослабленных опухолевыми супрессорными генами;
- придание опухолевым клеткам иммунной способности и т.д. [6].

В некоторых литературных источниках последних лет применение моноклональных ингибиторов EGFR после радикального хирургического лечения рака поджелудочной железы, а также их различные комбинации считаются клинически эффективными [9, 18]. По сведению авторов, при адъювантной терапии опухолей поджелудочной железы применение ингибиторов EGFR в комбинации с гемситабином у 32,5% больных продолжительность жизни составила 1 год.

Успехи в области молекулярной биологии за последние годы доказали, что в образовании рака поджелудочной железы немаловажную роль играют

некоторые супрессорные гены (p16, p53, K-ras и т.д.), высокие экспрессии различных изоформ факторов развития [10, 11] различных генов, а также их рецепторов, а также регулятор апоптоза Bcl-Xl [18]. Среди них особый интерес у исследователей вызывает фактор эпидермального роста и его рецепторы. М. Yamada и соавт. (1997), изучая патогенез рака поджелудочной железы, установили, что сигнал, активизированный EGFR, проникнув в ядерный состав, затрагивает нуклеары и тем самым ускоряет фосфорилизацию протоонкогенов. Именно поэтому считается, что серьезный прогноз рака поджелудочной железы одновременно обуславливается и высокой экспрессией EGFR.

Основываясь на вышесказанном, считается, что одной из целей адьювантной и неоадьювантной терапии рака поджелудочной железы является ингибция рецепторов фактора эпидермального развития [5, 8, 10, 11]. На данный момент известны только два клинически эффективных ингибитора EGFR — трастузумаб и сетуксимаб, которые успешно применяются при раке легких [14, 15]. Одновременно с этим в последнее время в объект исследований превратились также молекулярные ингибиторы, тормозящие активность тирозин-киназ [16].

Но до сегодняшнего дня относительно эффективности ингибиторов EGFR при РПЖ не проведены ни клинические, ни экспериментальные исследования. Поэтому целью настоящего исследования явилось экспериментальное изучение влияния ингибитора EGFR нового поколения AG на апоптоз и клеточную пролиферацию при РПЖ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования были проведены в лаборатории экспериментальных исследований (зав. лабораторией — профессор Г. Аллгаер) Мангеймской хирургической клиники Гейдельбергского университета Германии (директор — профессор С. Пост) на клеточной линии рака поджелудочной железы PaTu 8902 (Elsasser, Heydtmann, Lehr, Agricola v Kern, 1993).

Клеточные колонии были инактивированы и культивированы в атмосфере, состоящей из 95% воздуха и 5% CO₂ при температуре 37 °С. После того как было доказано, что клетки не инфицированы различными патогенными вирусами, они были признаны пригодными для исследований и были выращены на специальном медиуме FBS.

С целью определения апоптоза в клеточной линии РПЖ был использован Vybrant®Apoptosis Assay Kit 2. Для изучения влияния ингибитора EGFR нового поколения AG на апоптоз исследования были проведены в 4 группах. В целях лечения клеток были использованы: ингибитор EGFR-AG (в дозе 50 μM), 5-фторурацил (5FU) (в дозе 25 μM) и их комбинация (AG + 5FU) (табл. 1).

Количество апоптотических, живых и умерших клеток определяли флуоцитометрическим методом (FACS).

Таблица 1

Методика исследований

Группы исследования	Результаты цитометрии (в %)		
	24 часа (10 серий)	48 часов (10 серий)	72 часа (10 серий)
Контрольная	апоптотический	апоптотический	апоптотический
	живой	живой	живой
	умерший	умерший	умерший
5FU	апоптотический	апоптотический	апоптотический
	живой	живой	живой
	умерший	умерший	умерший
AG	апоптотический	апоптотический	апоптотический
	живой	живой	живой
	умерший	умерший	умерший
AG + 5FU	апоптотический	апоптотический	апоптотический
	живой	живой	живой
	умерший	умерший	умерший

Исследование пролиферации в клеточной линии были проведены с помощью считывающей системы ELISA (Model-550, Bio-Rad) и аппарата Beckman Coulter Analysator (Кооперация Колтер, Майами, Флорида, США).

Для этого выращенные вышеуказанным методом опухолевые клетки промываются, трипсинизируются и концентрируются в соотношении 2000 клеток на 100 мл. Затем берется 96-гнездовая чаша, каждое гнездо которой заполняется 100 мл изготовленной суспензии, и подвергается инкубации в течение 12 часов с целью выпадения осадка.

На следующий день клетки делились на 6 групп: в группе наблюдения нормальные клетки поджелудочной железы смешивались с лекарственными веществами и подвергались инкубации. В остальных группах лечения использовались следующие комбинации: 5FU в дозе 25 мкМ (2-я группа); гливек, являющийся на данный момент ингибитором EGFR, эффективность которого доказана клинически при стромальных опухолях желудочно-кишечного тракта — в дозе 50 мкМ (3-я группа); AG-ингибитор EGFR нового поколения, в дозе 50 мкМ (4-я группа); 5FU (25 мкМ) + гливек (50 мкМ) (5-я группа) и 5FU (25 мкМ) + AG (50 мкМ) (6-я группа). После добавления лекарственных средств в вышеуказанные клеточные культуры, по окончании срока экспозиции в каждое гнездо CellTiter 96 Aqueous One Solution добавляется 20 мл реагента и помещается на 2–4 часа в клеточный инкубатор. После этого с помощью считывающей системы Elisa с частотой 490 нм анализируется степень полиферации клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели цитометрии после лечения различными препаратами через 24, 48 и 72 ч после лечения показаны в табл. 2.

Таблица 2.

Динамика влияния различных лекарственных средств на апоптоз в клеточной линии РПЖ

Исследуемая группа	Характеристика клеток	Результаты цитометрии (в %)		
		24 часа	48 часов	72 часа
Группа наблюдения	Здоровые клетки	99,46	97,58	95,04
	Апоптотич. клетки	0,38	0,38	3,97
Лечение 5-ФУ	Здоровые клетки	80,19	34,12	64,17
	Апоптотич. клетки	16,70	53,74	30,78
Лечение AG	Здоровые клетки	91,90	50,47	66,95
	Апоптотич. клетки	7,64	44,08	28,56
Лечение AG + 5FU	Здоровые клетки	87,36	50,29	45,18
	Апоптотич. клетки	11,91	44,78	40,28

Как мы видим, в 1-й день лечения (24 часа) количество апоптотических клеток в группе 5FU составило 16,7% ($p. 0,0001$), в группе AG 7,64% ($p. 0,001$), а при комбинации AG + 5FU 11,91% ($p. 0,0001$). В это время количество здоровых клеток соответственно составило 99,46, 80,19, 91,9 и 87,36%. Интересен тот факт, что показатели апоптоза в группе лечения 5FU гораздо выше, чем в группах AG и AG + 5FU (в 2,2 и 1,4 раза соответственно). Через 24 часа после лечения количество здоровых и погибших клеток превазошло количество апоптотических клеток.

На 2-й день лечения показатели апоптоза во всех исследуемых группах достигли своего пика, что полностью согласуется с данными специализированной литературы. Как видно из таблицы, показатели апоптоза в группах AG и AG + 5FU почти сравнялись и разница с показателями группы 5FU значительно уменьшилась. Особо следует отметить, через 24 часа показателями апоптоза в группах 5FU и AG статистические достоверной разницы не наблюдалось (показатели апоптоза соответственно 53,74 и 44,08%). Полный график цитометрии во 2-й день лечения показан на следующем рисунке (рис. 1).

На 3-й день лечения показатели апоптоза во всех группах начинают уменьшаться и в группе 5FU достигают 30,78%, в группе AG — 28,56%, а в группе 5FU + AG — 40,28%. Кроме этого, интересно отметить, что через 72 часа самый высокий уровень апоптоза наблюдается в группе 5FU + AG. В этой группе количество апоптотических клеток в 1,4 раза больше, чем в группе 5FU, и в 1,3 раза, чем в группе AG.

Наблюдая динамику результатов лечения, легко заметить, что самые высокие показатели апоптоза у группы 5FU + AG (рис. 2). Таким образом, сравнивая показатели апоптоза во 2-й и в 3-й дни, замечаем, что в 3-й день показатели в группе 5FU уменьшились в 1,7 раза, а в группе AG — в 1,5 раза, тогда как в группе 5FU + AG этот показатель достиг 1,1 раза ($p. 0,001$) и составил 40,28%.

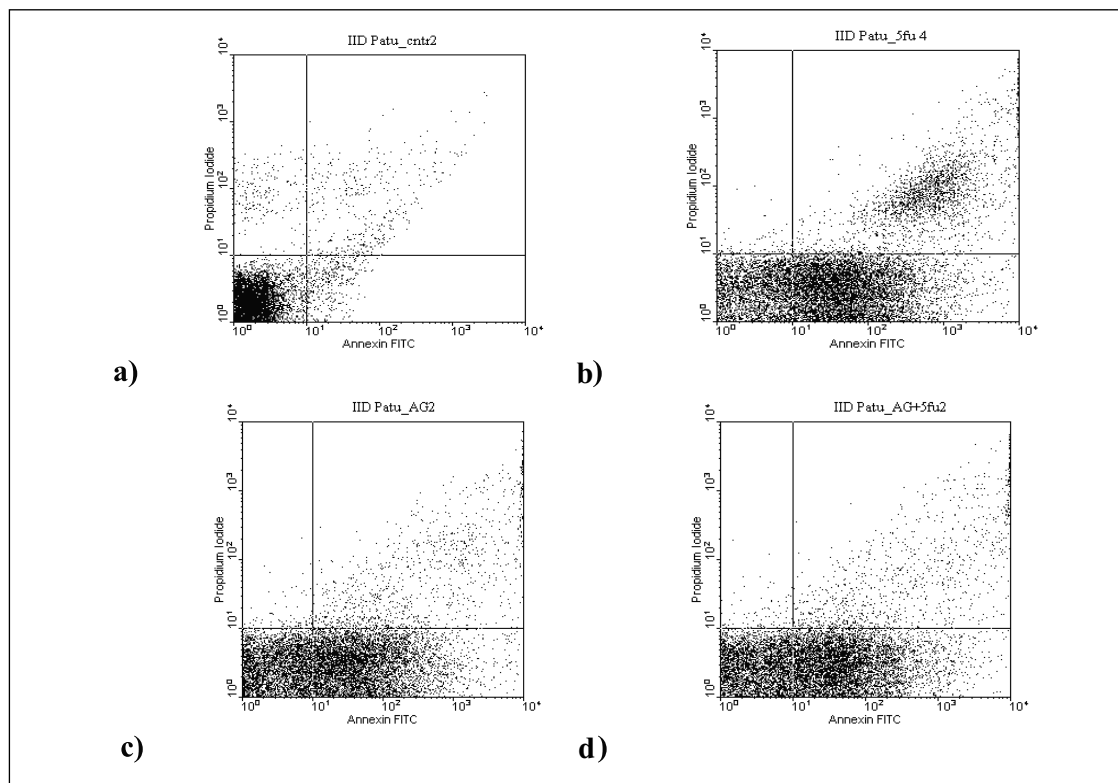


Рис. 1. Показатели апоптоза на 2-й день лечения: (а) — наблюдение (b) — 5FU (c) — AG (d) — 5FU + AG

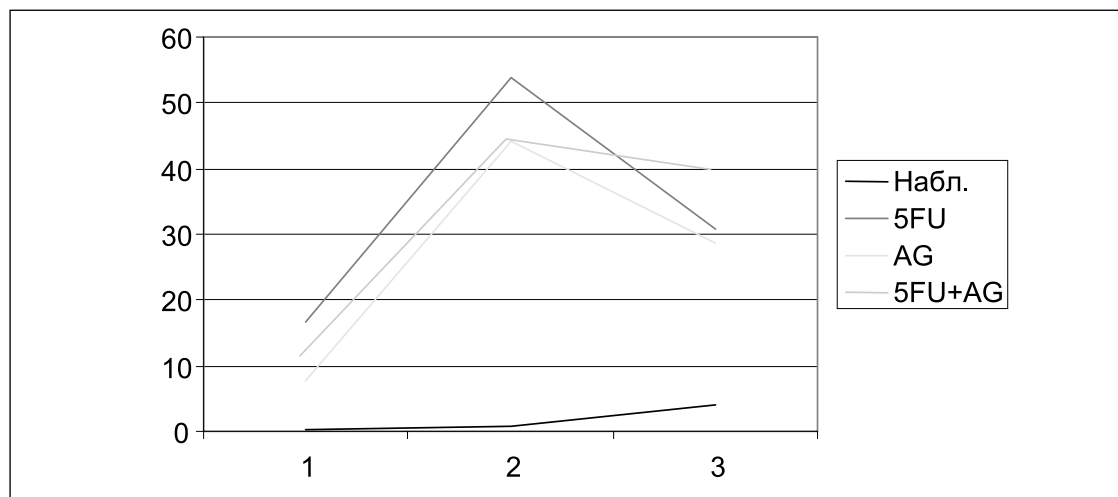


Рис. 2. Динамика показателей апоптоза в различных группах лечения

В последние годы с целью изучения эффективности адъювантной и неадъювантной терапии злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта одним из информативных методов является изучение клеточной пролиферации. Как было отмечено выше, степень пролиферации клеток в сравниваемых группах нами определялась через 24, 48 и 72 ч после начала лечения.

Показатели пролиферации через 24 часа после лечения представлены на рис. 3.

Как мы видим, в первый день лечения самый низкий уровень пролиферации наблюдается в группе AG + 5FU. Через 24 часа эффективность лечения AG была сравнительно выше (степень пролиферации

0,28), чем при лечении 5FU (степень пролиферации 0,32), при лечении гливеком (степень пролиферации 0,33), и даже при использовании комбинации 5FU + гливек (степень пролиферации 0,30). Важен и интересен тот факт, что превосходство AG над 5FU и контрольной группой было одинаковым.

Через 48 часов после лечения динамика показателей пролиферации клеток показывает превосходство AG с точки зрения антипролиферативной эффективности (рис. 3).

На 2-й день лечения самый сильный антипролиферативный эффект отмечается в группе AG + 5FU. В этой серии AG по своей эффективности оказался сильнее 5FU, гливека и их комбинаций.



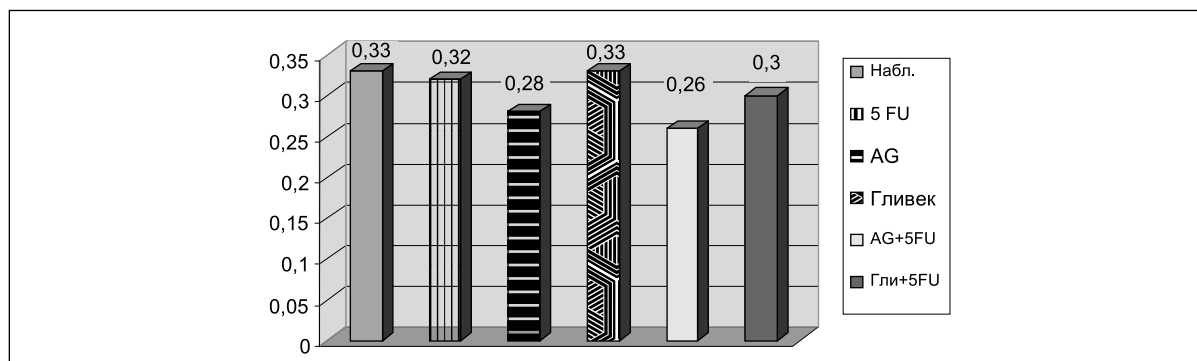


Рис. 3. Показатели пролиферации клеток через 24 часа после лечения

Так как через 48 часов степень пролиферации в контрольной группе достигла 0,42, в группе гливек этот показатель был равен 0,34, в группе 5FU — 0,32 ($p. 0,05$), в группе 5FU + гливек — 0,29 ($p. 0,05$), а в группе AG — 0,26 ($p. 0,01$). Одновременно с этим через 48 часов антипролиферативная эффективность по сравнению с показателями 24-часового периода в группе AG возросла в 5 раз, в группе гливек — в 2 раза, а в группе 5FU — в 1,5 раза.

На наш взгляд, через 72 часа антипролиферативные показатели различных препаратов с точки зрения сравнительной эффективности стали еще интереснее (рис. 4).

Как и ожидалось, в это время клеточная пролиферация в контрольной группе начала уменьшаться (через 24 часа — 0,42; через 72 часа — 0,39). Наряду с этим эффективность гливек и комбинации гливек + 5FU тоже стала уменьшаться, а эффективность AG, 5FU и AG + 5FU продолжала расти, так как если на 2-й день лечения степень пролиферации в группе AG составила 0,26, а в группе AG + 5FU 0,22, то на 3-й день эти показатели соответственно составили 0,22 и 0,2.

На следующем рис. 5 представлен график зависимости эффективности различных препаратов от продолжительности лечения.

Как известно, одним из самых эффективных средств адъювантной терапии рака поджелудочной железы считается 5FU. Поэтому, мы на следующем рисунке представили вашему вниманию сравнительную динамику эффективности AG, являющейся ингибитором EGFR нового поколения и 5FU.

Как видно из рисунка, в первый день лечения в группе AG степень пролиферации клеток достигла

0,28, а в группе лечения 5FU — 0,32. Эти показатели на 2-й и 3-й день лечения соответственно составили: 0,26; 0,32 и 0,22; 0,28. Тем самым становится очевидным превосходство AG над 5FU по антипролиферативному эффекту. Хочется отметить, что через 72 часа после лечения антипролиферативное действие AG увеличилось более чем в 3 раза.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. По эффекту влияния на апоптоз клеток при раке поджелудочной железы AG не имеет особых различий по сравнению с 5FU (максимальный апоптотический эффект, достигнутый AG, — 44,08%, 5FU — 53,74%).

2. По влиянию на апоптоз в клеточной линии РПЖ комбинация AG + 5FU может считаться наиболее эффективной.

3. Препарат AG, являющийся ингибитором EGFR нового поколения, эффективно уменьшает пролиферацию клеток при РПЖ.

4. В клеточной линии РаTu-8902 антипролиферативный эффект препарата AG больше эффекта 5FU в 1,5 раза, а гливек — в 5 раз.

5. Использование комбинации AG + 5FU для уменьшения пролиферации опухолевых клеток при раке поджелудочной железы является более эффективным, чем их применение порознь.

6. Таким образом, AG как ингибитор EGFR нового поколения может являться одним из наиболее эффективных средств адъювантной и неадъювантной терапии при РПЖ.

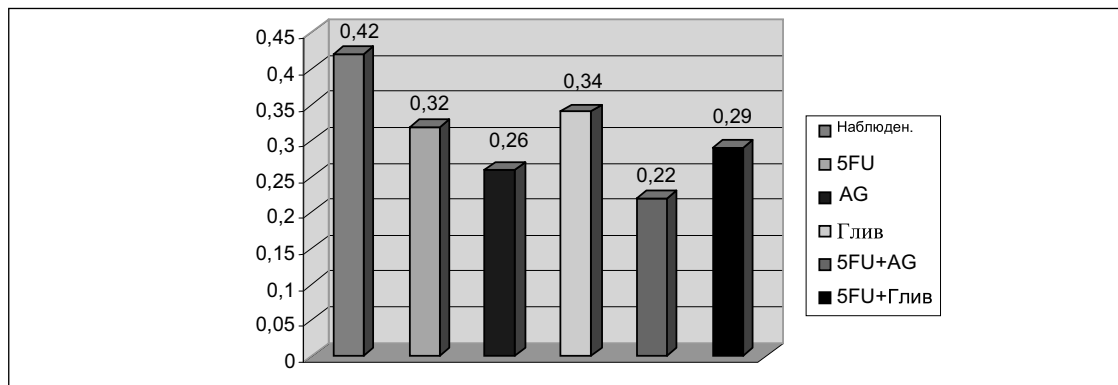


Рис. 4. Показатель пролиферации клеток через 72 часа после лечения

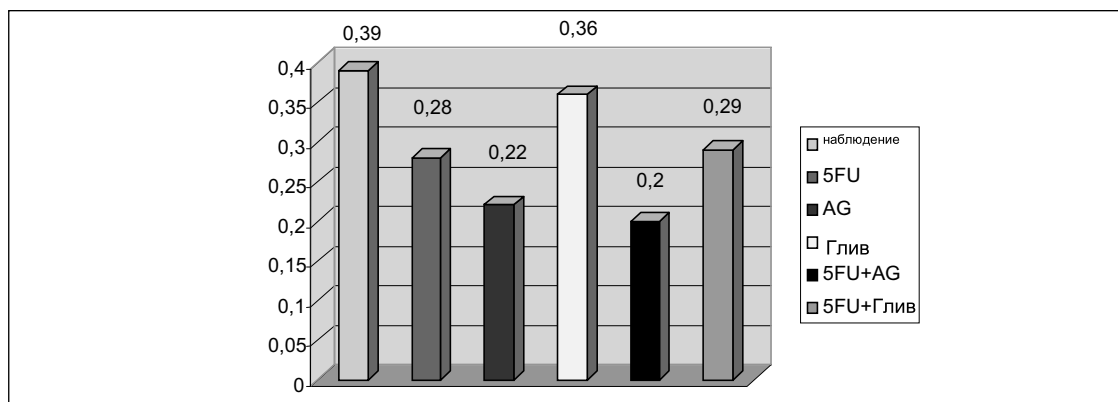


Рис. 5. Динамика показателей пролиферации клеток в зависимости от продолжительности лечения

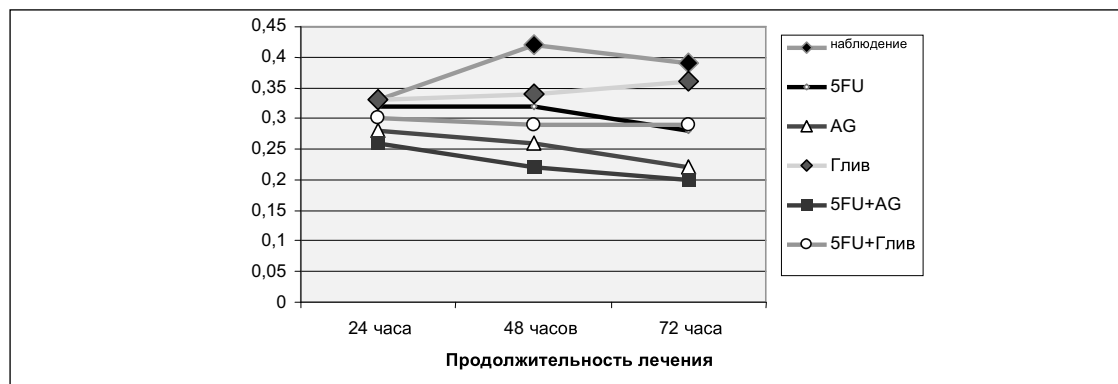


Рис. 6

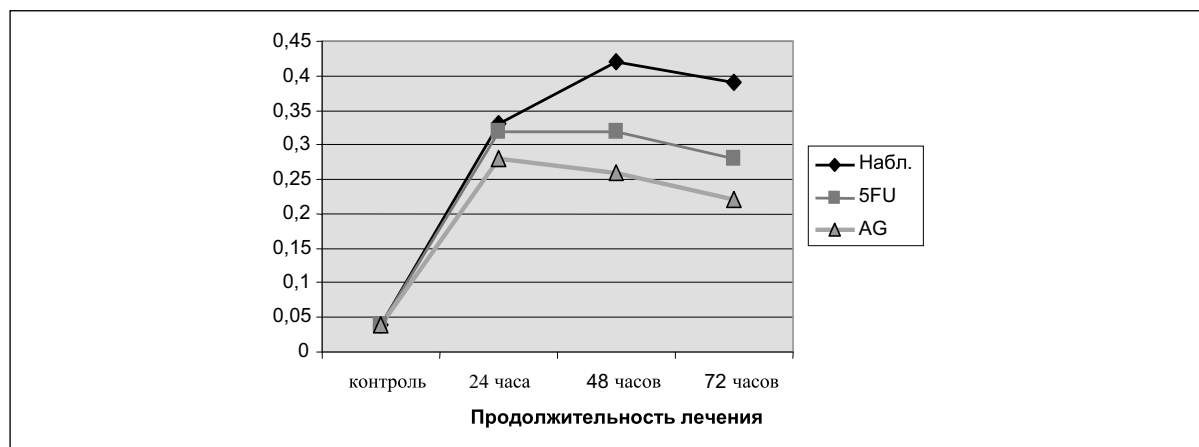


Рис. 7. Сравнительная динамика показателей пролиферации клеток в группе AG и 5FU в зависимости от сроков лечения



ЛИТЕРАТУРА

1. Greenlee, R. Cancer statistics, 2001 / R. Greenlee, M. Hill-Harmon, T. Murray et al. // *CA Cancer J Clin.* 2001. Vol. 51. P. 15–36.
2. Coleman, M. Cancer survival trends in England and Wales, 1971-1995: deprivation and NHS region / P. Babb, P. Damielki. — London: Her Majesty's Stationery Office, 1999.
3. Shon, T.A. Resected adenocarcinoma of the pancreas- 616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators / T.A. Shon, C.J. Yeo, J.L. Cameron et al. // *J Gastrointest Surg.* 2000. Vol. 4. P. 567–579
4. American Cancer Society // *Cancer Facts and Figures.* — Atlanta GA: American Cancer Society, 2001. P. 5–16.
5. Brahmall, S.R., Incidence treatment and survival in 13.560 patients with pancreatic cancer: an epidemiological study in the West Midlands / S.R. Brahmall, W.H. Allum, A.G. Jones et al. // *Br. J Surg.* 1995. Vol. 82 P. 111–115
6. Allen, G. Application of molecular biology studies to gene therapy treatment strategies / G. Allen, P. Lee, M. Ryan et al. // *World J Surg.* 2002 Vol. 26, P. 854–860.
7. Mimeault, M. Recent advances on the molecular mechanisms involved in pancreatic cancer progression and therapies / M. Mimeault, E. Brand, A. Sasson et al. // *Pancreas* 2005. Vol. 31. P. 301–316.
8. Westphal, S. Apoptosis: targets in pancreatic cancer / S. Westphal, H. Kalthoff // *Molecular cancer.* 2003 Vol. 2,6. P. 1–14.
9. Bardessi, N. Pancreatic cancer biology and genetics / N. Bardessi, A. DePinho // *Cancer.* 2002. Vol. 2. P. 897–909.
10. Missiaglia, E. Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidate markers for pancreatic tumorigenesis and metastasis / E. Missiaglia, E. Blaveri, B. Terris et al. // *Int J Cancer.* 2004. Vol. 112, P. 100–112
11. Yamada, M. The neurotropic action and signaling of epidermal growth factor / M. Yamada, T. Ikeuchi, H. Hatanaka // *Prog Neurobiol.* 1997. Vol. 51. P. 19–37.
12. Vogel, C. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer / C. Vogel, M. Cobleigh, D. Tripathy et al. // *J Clin Oncol.* 2002 Vol. 20 P. 719–726.
13. Salty, L. // Single agent IMC-C225 has activity in CPT-11 refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor (EGFR) / L. Salty, N. Meropal, P. Loeher et al. // *Proc Am Soc Clin Onco.* 2002. Vol. 21. — 504 p.
14. Neoptolemos, J. Adjuvant therapy in pancreatic cancer: historical and current perspectives / J. Neoptolemos, D. Cunningham, H. Friess et al. // *Annals of Oncol.* 2003. Vol. 14. P. 675–692.
15. Michael, G.T. New techniques and agents in the adjuvant therapy of pancreatic cancer / G.T. Michael, C.M. Connor, P.J. Neoptolemos // *Acta Oncologica.* 2002. Vol. 41. P. 582–595.
16. Ghaneh, P. Adjuvant therapy in pancreatic cancer / P. Ghaneh, M. Hartley, P. Neoptolemos et al. // *World J Gastroenterol.* 2001. Vol. 7(4). P. 482–489.
17. Mendelsohn, J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy / J. Mendelsohn // *Endocr Rel Cancer* 2001. Vol. 8. P. 3–9
18. Ganeh, P. Topics: Pancreatic cancer new-horizons in diagnosis and treatment: molecularly prognostic markers in pancreatic cancer / P. Ganeh, A. Kawesha, J. Evans et al. // *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002. Vol. 9. P. 1–11.
19. Friess, H. Enhanced expression transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival / H. Friess, Y. Yamanaka, M. Buchler et al. // *Gastroenterology.* 1993. Vol. 105. P. 1846–1856
20. Friess, H. Moderate activation of the apoptosis inhibitor bcl-xL worsens the prognosis in pancreatic cancer / Friess, Lu, Andren-Sandberg et al. // *Ann Surg.* 1998. Vol. 228. P. 780–787
21. Arteaga, C.L. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia / C.L. Arteaga // *Semin Oncol* 2002. Vol. 29. №14. P. 3–9.
22. Vogel, C. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer / C. Vogel, M. Cobleigh, D. Tripathy et al. // *J Clin Oncol* 2002. Vol. 20. P. 719–726.
23. Salty, L. Single agent IMC-C225 has activity in CPT-11 refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor (EGFR) / L. Salty, N. Meropal, P. Loeher et al. // *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002. Vol. 2. — 504 p.
24. Hidalgo, M. Phase 1 and pharmacologic study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies / M. Hidalgo, L. Siu, J. Nemunaitis et al. // *J Clin Oncol* 2001. Vol. 19. P. 3267–3279.
25. Hager, J. Tumor cells utilize multiple pathways to down-modulate apoptosis. Lessons from a mouse model of islet cell carcinogenesis // J. Hager, D. Hanahan // *Ann NY Acad Sci.* 1999. Vol. 887. P. 150–163.
26. Allen, G. Application of molecular biology studies to gene therapy treatment strategies / G. Allen, P. Lee, M. Ryan et al. // *World J Surg.* 2002. Vol. 26. P. 854–860.
27. Greenlee, R. Cancer statistics, 2001 / R. Greenlee, M. Hill-Harmon, T. Murray et al. // *CA Cancer J Clin.* 2001. Vol. 51 P. 15–36.
28. Coleman, M. Cancer survival trends in England and Wales, 1971-1995: deprivation and NHS region / M. Coleman, P. Babb, P. Damielki. — London: Her Majesty's Stationery Office, 1999.
29. Shon, T.A. Resected adenocarcinoma of the pancreas- 616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators / T.A. Shon, C.J. Yeo, J.L. Cameron et al. // *J Gastrointest Surg.* 2000. Vol. 4. P. 567–579.
30. Allen, G. Application of molecular biology studies to gene therapy treatment strategies / G. Allen, P. Lee, M. Ryan et al. // *World J Surg.* 2002. Vol. 26. P. 854–860.
31. Mimeault, M. Recent advances on the molecular mechanisms involved in pancreatic cancer progression and therapies / M. Mimeault, E. Brand, A. Sasson et al. // *Pancreas* 2005. Vol. 31 P. 301–316.
32. Westphal, S. Apoptosis: targets in pancreatic cancer / S. Westphal, H. Kalthoff // *Molecular cancer.* 2003 Vol. 2,6. P. 1–14.
33. Bardessi, N. Pancreatic cancer biology and genetics / N. Bardessi, A. DePinho // *Cancer.* 2002. Vol. 2. P. 897–909.
34. Missiaglia, E. Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidate markers for pancreatic tumorigenesis and metastasis // E. Missiaglia, E. Blaveri, B. Terris et al. // *Int J Cancer.* 2004. Vol. 112. P. 100–112.
35. Yamada, M. The neurotropic action and signaling of epidermal growth factor // M. Yamada, T. Ikeuchi, H. Hatanaka // *Prog Neurobiol.* 1997. Vol. 51. P. 19–37.
36. Vogel, C. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer / C. Vogel, M. Cobleigh, D. Tripathy et al. // *J Clin Oncol.* 2002. Vol. 20. P. 719–726.
37. Salty, L. Single agent IMC-C225 has activity in CPT-11 refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor (EGFR) // L. Salty, N. Meropal, P. Loeher et al. // *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2002. Vol. 21. — 504 p.