

2

ВЕСТНИК

3 **ТОМ 23**
—
2012

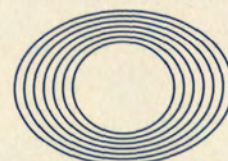
РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

JOURNAL

of N. N. BLOKHIN RUSSIAN

CANCER RESEARCH CENTER RAMS

 **uicc**
member organisation



Учреждение Российской академии медицинских наук
РОССИЙСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ Н. Н. БЛОХИНА РАМН

Учреждение Российской академии медицинских наук
Российский онкологический научный центр
имени Н. Н. Блохина РАМН

ВЕСТНИК

РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

УДК 616
Ежеквартальный научно-практический журнал по онкологии
Основан в ноябре 1990 г.

Том 23, №3 (89)
Июль — сентябрь 2012 г.

Учредитель:
Учреждение Российской академии медицинских наук
Российский онкологический научный центр
имени Н. Н. Блохина РАМН

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:
М. И. Давыдов, академик РАН и РАМН, проф., г. м. н.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:
В. Ю. Сельчук, проф., г. м. н. (зам. главного редактора)
В. М. Нечушкина, к. м. н. (отв. секретарь)
М. Д. Алиев, академик РАН и РАМН, проф., г. м. н.
А. Ю. Барышников, проф., г. м. н.
В. Н. Богатырев, проф., г. м. н.
Л. В. Демидов, проф., г. м. н.
Б. И. Долгушин, чл.-корр. РАМН, проф., г. м. н.
Д. Г. Заридзе, чл.-корр. РАМН, проф., г. м. н.
И. Б. Зборовская, к. б. н.
А. И. Карселадзе, проф., г. м. н.
Б. П. Копнин, проф., г. б. н.
В. В. Кузнецов, проф., г. м. н.
В. П. Лetyagin, проф., г. м. н.
В. Б. Матвеев, проф., г. м. н.
М. И. Нечушкин, проф., г. м. н.
Б. К. Поддубный, проф., г. м. н.
В. Г. Поляков, академик РАМН, проф., г. м. н.
С. Субраманиан
Н. Н. Тупицын, проф., г. м. н.
С. А. Тюляндин, проф., г. м. н.
Ю. В. Шишкин, проф., г. м. н.

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере
связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
Свидетельство ПИ № ФС77-36649 18.06.2009

Подписной индекс в каталоге агентства «Роспечать» 46782

Цена договорная

За публикацию журнала отвечает отдел международных связей
РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН

Редакторы: М. Н. Соловова, А. Я. Подольская, О. Б. Одинцева (англ. яз.)
Технический редактор: М. Г. Петров
Корректор: Н. Н. Юдина

Адрес редакции: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24
Тел.: +7-499-324-5537. E-mail: vestnikronc@mail.ru

Подписано в печать 28.09.2012. Формат 60 × 90/8. Усл. печ. л. 4,0.
Тираж 3000 экз. Заказ № 72

АНО «Усия», 125581, РФ, г. Москва, ул. Фестивальная, д. 22, к. 6

© РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, 2012

При перепечатке материалов ссылка на «Вестник РОНЦ
им. Н. Н. Блохина РАМН» обязательна

Russian Academy of Medical Sciences
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center

JOURNAL

of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS

A quarterly journal of oncological science and practice
Founded in November 1990

Volume 23, N 3 (89)
July – September 2012

Founder:
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS

EDITOR-IN-CHIEF
M. I. Davydov, MD, PhD, DSc, Academician of RAS and RAMS, Professor

EDITORIAL BOARD:
V. Y. Selchuk, MD, PhD, DSc, Professor (Deputy Editor-in-Chief)
V. M. Nechushkina, MD, PhD (Executive Editor)
M. D. Aliev, MD, PhD, DSc, Academician of RAS and RAMS, Professor
A. Y. Baryshnikov, MD, PhD, DSc, Professor
V. N. Bogatyrev, MD, PhD, DSc, Professor
L. V. Demidov, MD, PhD, DSc, Professor
B. I. Dolgushin, MD, PhD, DSc, Associate Member of RAMS, Professor
A. I. Karseladze, MD, PhD, DSc, Professor
B. P. Kopnin, MD, PhD, DSc, Professor
V. V. Kuznetsov, MD, PhD, DSc, Professor
V. P. Letyagin, MD, PhD, DSc, Professor
V. B. Matveev, MD, PhD, DSc, Professor
M. I. Nechushkin, MD, PhD, DSc, Professor
B. K. Poddubniy, MD, PhD, DSc, Professor
V. G. Polyakov, MD, PhD, DSc, Academician of RAMS, Professor
Y. V. Shishkin, MD, PhD, DSc, Professor
S. Subramanian, MD
S. A. Tjulandin, MD, PhD, DSc, Professor
N. N. Tupitsyn, MD, PhD, DSc, Professor
D. G. Zaridze, MD, PhD, DSc, Associate Member of RAMS, Professor
I. B. Zborovskaya, MSc, PhD

The journal is registered with the Russian Federal Service for Supervision
in the Spheres of Telecommunications, Information Technologies and Mass
Communication. License ПИ N ФС77-36649 18.06.2009

Subscription index in catalogue of Rospechat Agency 46782

Price as per contract

Publishing in-charge: Office of International Affairs N. N. Blokhin Russian
Cancer Research Center RAMS

Editors: M. N. Solovova, A. Y. Podolskaya, O. B. Odintseva (English version)
Technical editor: M. G. Petrov
Proof-reader: N. N. Yudina

Address of the Editorial Office: 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478.
Tel.: +7-499-324-5537. E-mail: vestnikronc@mail.ru

Permitted for print 28.09.2012. Format 60 × 90/8. Bulk 4.0 printed sheets.
Circulation 3000 copies. Order N 72

АНО «Усия», 22-6, Ulitsa Festivalnaya, Moscow, Russian Federation, 125581

© N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, 2012

No reproduction is permitted without reference to the Journal of
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS

СОДЕРЖАНИЕ

АКАДЕМИК РАН И РАМН М. И. ДАВЫДОВ (к 65-летию со дня рождения)	3
ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ	
<i>С. П. Свиридова, Ш. Р. Кашия, О. А. Обухова, Е. С. Чукуев</i> ВОЗМОЖНОСТИ ЭССЕНЦИАЛЬНОГО СЕЛЕНА В ОНКОЛОГИИ	6
КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
<i>М. А. Емельянова, Н. Н. Мазуренко, И. М. Гагарин, И. В. Цыганова, И. Б. Зборовская, К. А. Архипова, В. В. Мочальникова, Л. Н. Любченко, Т. В. Наседкина</i> ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ EGFR ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО С ПОМОЩЬЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ	15
<i>А. Ф. Лазарев, Д. К. Кенбаева, З. А. Манамбаева</i> КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ В ПРОЦЕССЕ ИММУНОТЕРАПИИ	24
<i>В. А. Уйманов, М. И. Нечушкин, А. В. Триголосов, А. В. Петровский, Я. В. Вишневская, А. А. Зайцева</i> ХИРУРГИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ПАРАСТЕРНАЛЬНОГО ЛИМФОКОЛЛЕКТОРА В СОСТАВЕ ОРГАНОСОХРАНЯЮЩЕГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	29

АКАДЕМИК РАН И РАМН М. И. ДАВЫДОВ (к 65-летию со дня рождения)



11 октября 2012 г. исполнилось 65 лет академику РАН и РАМН, Заслуженному деятелю науки РФ, директору ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН Михаилу Ивановичу Давыдову.

Михаил Иванович родился в г. Конотопе Сумской области Украинской ССР в семье служащего. В течение 7 лет учился в Киевском Суворовском училище, 11 класс средней школы окончил в г. Конотопе. Сразу после окончания школы в 1966 г. Михаил Иванович был призван в воздушно-десантные войска.

Михаил Иванович самостоятельно принял решение стать врачом и сразу после завершения срочной службы

в армии в 1969 г. поступил в I Московский медицинский институт им. И. М. Сеченова, который окончил в 1975 г.

С 1975 г. профессиональная деятельность Михаила Ивановича прочно связана с Российским онкологическим научным центром им. Н. Н. Блохина, в котором он прошел путь от ординатора до директора. С 1975 по 1977 г. он обучался в клинической ординатуре, затем с 1977 по 1980 г. — в аспирантуре. В 1980 г. после успешной защиты кандидатской диссертации «Комбинированные резекции и гастрэктомии при раке проксимального отдела желудка» Михаил Иванович был принят на должность младшего научного сотрудника торакального отделения. В 1984 г. он стал старшим, а в 1987 г. — ведущим научным сотрудником того же отделения.

Большой опыт научно-практической деятельности обобщен Михаилом Ивановичем в докторской диссертации «Одномоментные операции в хирургическом и комбинированном лечении рака пищевода», которую он защитил в 1988 г. В том же году он стал руководителем торакального отделения НИИ клинической онкологии ВОНЦ АМН СССР.

В 1992 г. Михаилу Ивановичу присвоено звание профессора. В 1993 г. он стал директором НИИ клинической онкологии ОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН и заместителем директора ОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН по науке, в 2001 г. — директором РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. В 1999 г. М. И. Давыдов избран членом-корреспондентом РАМН, в 2003 г. — академиком РАН, в 2004 г. — академиком РАМН. С 2006 по 2011 г. академик РАН и РАМН М. И. Давыдов был Президентом Российской академии медицинских наук.

Михаил Иванович — автор более 820 публикаций, 10 монографий, руководств и учебников, 20 изобретений и рационализаторских предложений. Под его руководством защищены 47 докторских и 50 кандидатских диссертаций. Являясь заведующим кафедрой онкологии Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова, Михаил Иванович наряду с научно-исследовательской ведет огромную научно-педагогическую работу.

Многолетняя плодотворная научная, клиническая и организационная работа Михаила Ивановича, его огромный вклад в российскую медицинскую науку отмечены высокими наградами. В 1997 г. ему присвоено звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации», в 2001 г. присуждена Государственная премия Российской Федерации за цикл работ «Хирургическое лечение сочетанных сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний» и премия им. Т. И. Ерошевского за лучшую медицинскую работу в области медицинской геронтологии и гериатрии, в 2003 г. — премия Правительства РФ в области науки и техники за цикл работ «Разработка и реализация современной стратегии и хирургического реабилитации больных в онкопроктологии», в 2008 г. — премия «Триумф-наука» в области наук о жизни и медицины.

В 2002 г. Михаил Иванович награжден Орденом Почета, в 2006 г. — Золотой медалью академика Б. В. Петровского «Выдающемуся хирургу мира» за большой вклад в развитие онкологии и памятной медалью «50 лет НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН» за большой личный вклад в развитие хирургии сердца и сосудов, в 2007 г. — орденом «За заслуги перед Республикой Башкортостан», в 2009 г. — орденом «За заслуги» III ст., в 2010 г. — орденом «За честь, доблесть, созидание, милосердие», дипломом международной премии «Профессия — жизнь» в номинации «За выдающийся вклад в развитие клинической медицины в области онкологии» и орденом «Звезда экономики России», в 2011 г. — Золотой медалью им. А. Н. Бакулева, дипломом и премией им. А. Н. Бакулева.

Михаил Иванович хорошо известен в России и за рубежом. Он член Международной коллегии хирургов, Американского и Европейского обществ хирургов, Нью-Йоркской академии наук, член правления Московского онкологического общества, почетный член Ассоциаций хирургов Греции, Испании, Германии. Его научные ин-

тересы разносторонни, однако основным из них была и остается хирургия.

Академик М. И. Давыдов — один из ведущих специалистов в области торакоабдоминальной онкологии. Основные направления проводимых им научных исследований — разработка новых и совершенствование имеющихся методов хирургического лечения рака легкого, пищевода, желудка, почки, опухолей средостения, пластическая и реконструктивная хирургия.

Михаила Ивановича отличает блестящая хирургическая техника. По его мнению, при выполнении любого хирургического вмешательства по поводу онкологической патологии следует неукоснительно соблюдать принципы онкологической адекватности, рациональной хирургической тактики, максимальной безопасности и высокой функциональности. Михаил Иванович — сторонник активного подхода к лечению онкохирургических больных. Михаилом Ивановичем выполнен ряд уникальных операций, в том числе одномоментная резекция пищевода и трахеи по поводу рака с формированием внутригрудного пищеводно-желудочного и межтрахеального анастомозов и две первые в мире аллотрансплантации трахеи по поводу аденокистозного рака.

Успешные результаты торакоабдоминальных операций во многом связаны с разработкой и внедрением в клиническую практику простых и надежных внутриплевральных пищеводно-желудочных и пищеводно-кишечных анастомозов, которые отличаются оригинальностью и универсальностью технического исполнения, абсолютная безопасность и высокая физиологичность. Многолетнее успешное применение этих анастомозов еще раз доказывает незаурядный талант и оригинальное хирургическое мышление Михаила Ивановича, который разработал их еще в ординатуре.

Принципиально важным направлением научно-практической деятельности Михаила Ивановича, ставшим прорывом в лечении целого ряда злокачественных опухолей, явились разработка, усовершенствование и внедрение в онкохирургическую практику нашей страны широкой регионарной лимфодиссекции при раке легкого, желудка и пищевода.

Одной из сложнейших проблем является хирургическое лечение онкологических больных с тяжелыми сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями. Разработки группы ученых во главе с М. И. Давыдовым в этой области удостоены Государственной премии Российской Федерации.

Новые тактические подходы в хирургии распространенных опухолей надпочечника и почки, осложненных высоким опухолевым тромбозом нижней полой вены, — еще одна яркая грань хирургического таланта Михаила Ивановича. Под руководством Михаила Ивановича отработываются технические подходы к удалению опухолевых тромбов с большим интракардиальным компонентом.

Расширяя, казалось бы, до невозможных пределов границы вмешательства, Михаил Иванович подчеркивает, что хирург обязан ясно понимать, насколько увеличение объема операции повысит ее радикальность и сможет ли больной перенести ее.

Михаил Иванович — инициатор развития ряда приоритетных направлений в фундаментальных меди-

цинских исследованиях. Они посвящены изучению механизмов распознавания злокачественно трансформированных клеток системами противоопухолевого иммунитета, а также генодиагностике наследственной предрасположенности к злокачественным опухолям.

Академик М. И. Давыдов считает, что борьба со злокачественными новообразованиями как с социально значимой патологией невозможна без построения Федеральной онкологической службы. Ее задачами должны стать: разработка стратегии и современного научного сопровождения онкологической помощи в Российской Федерации; подготовка, сертификация и реализация программ обучения специалистов по онкологии, лицензирование медицинской деятельности; создание единого популяционного канцер-регистра, разработка и внедрение скрининговых программ для раннего выявления онкологических заболеваний; обеспечение онкологических больных противоопухолевы-

ми и другими медицинскими препаратами; определение и внедрение стандартов лечения онкологических больных, внедрение высоких технологий в практику здравоохранения; организация консультирования больных в регионах, создание центров телемедицины; контроль за качеством медицинской помощи, разработка и внедрение программ восстановительного лечения и реабилитации.

Уделяя большое внимание условиям работы медицинского персонала и материально-техническому обеспечению ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, Михаил Иванович руководит проектом технического переоснащения центра.

Несмотря на колоссальную загруженность, Михаил Иванович продолжает много оперировать. Он называет себя одним из самых оперирующих директоров в стране: каждый день по несколько часов он проводит у операционного стола.

Свой юбилей Михаил Иванович встречает полным новыми замыслами. Блестящий талант — залог их претворения в жизнь. Коллектив ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, многочисленные друзья, коллеги и ученики сердечно поздравляют Михаила Ивановича с днем рождения, желают ему крепкого здоровья, счастья и удачи.

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

Светлана Петровна Свиридова¹, Шалва Робертович Кашия²,
Ольга Аркадьевна Обухова³, Евгений Станиславович Чучуев⁴

ВОЗМОЖНОСТИ ЭССЕНЦИАЛЬНОГО СЕЛЕНА В ОНКОЛОГИИ

¹ Профессор, д. м. н., ведущий научный сотрудник, отделение реанимации и интенсивной терапии № 1 НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

² К. м. н., заведующий, отделение реанимации и интенсивной терапии № 5 НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

³ К. м. н., старший научный сотрудник, отделение реанимации и интенсивной терапии № 5 НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁴ К. м. н., научный сотрудник, отделение опухолей печени и поджелудочной железы НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

Адрес для переписки: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, отделение реанимации и интенсивной терапии № 5, Обухова Ольга Аркадьевна; e-mail: obukhova.olga@rambler.ru

Селен был признан эссенциальным микроэлементом лишь 30 лет назад, и выполненные в последующие годы многочисленные научные исследования позволили выявить его важную роль для здоровья человека. В статье представлен обзор имеющихся научных данных о возможностях селена в профилактике и терапии онкологических заболеваний. Основной биологической ролью селена является его участие в синтезе и активности антиоксидантных содержащих селен ферментов и селенопротеинов, защищающих клетки от повреждающего воздействия свободных радикалов. При дефиците селена подавлен синтез селенопротеинов, нарушена антиоксидантная и антиканцерогенная защита. Выявлена обратная корреляция между уровнем селена в крови и частотой развития онкологических заболеваний и смертности. Доказано, что селен обладает эффективными профилактическими противоопухолевыми качествами. Дополнительный прием селена снижал частоту развития опухолей более чем на 35% у лиц с дефицитом селена. С действием содержащих селен ферментов связывают многообразные возможности противоракового воздействия: влияние на оксидантный стресс, детоксикацию и метаболизм канцерогенов, индукцию апоптоза и пролиферацию клеток, контроль клеточного деления и воспаления, метилирование и восстановление ДНК, продукцию гормонов, иммунную функцию. Селен проявляет не только антиоксидантную, но и прооксидантную активность. Выявлено значительное накопление селена в злокачественных опухолях и снижение его содержания в сыворотке крови. Прооксидантная активность с токсическим действием на клетки опухоли проявляется в условиях повышенных (фармакологических) концентраций селена. Клинические исследования подтверждают важность и эффективность применения селена в онкологии — повышение чувствительности к химио- и лучевой терапии при одновременном снижении побочных токсических влияний на нормальные клетки. Однако функции и механизмы регуляции многих селенопротеинов с вариантами селеновой диеты изучены недостаточно и нуждаются в дальнейших исследованиях и клинических испытаниях.

Ключевые слова: селен, рак, биохимические функции, профилактика, лечение.

Микроэлемент (МЭ) селен (Se) открыт шведским ученым Йонсом Якобом Берцелиусом в 1817 г. Селен очень

долго считался одним из самых токсичных МЭ для животных и человека. В 1957 г. в экспериментах выявлена защитная роль Se в развитии некрозов печени при дефиците витамина E, и Se был признан эссенциальным МЭ [1]. Большое значение Se для здоровья человека было под-

тверждено в 1979 г., когда обнаружили, что, назначая Se, можно предотвратить развитие эндемической кардиомиопатии (болезнь Кешана) [2].

По современным представлениям, этот МЭ, обладая уникальными биологическими свойствами, обеспечивает нормальную функцию клеток, органов и организма в целом. Он участвует в метаболизме тиреоидных гормонов, глюкозы, во внутри- и внеклеточной антиоксидантной защите, в регуляции окислительно-восстановительных процессов [3—5]. Недостаток Se в пище приводит к повышению риска развития сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных, вирусных заболеваний, нарушению иммунитета [6—8].

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Впервые в 1949 г. была установлена защитная роль Se в отношении химически индуцированных опухолевых клеток [9].

Через 20 лет появилось первое сообщение о связи между содержанием Se в растениях и смертностью от некоторых злокачественных опухолей [10]. Выявлено, что смертность от онкологических заболеваний у лиц, проживающих в районах США с высокой концентрацией Se в кормовых культурах, значительно ниже, чем в районах с низким содержанием этого МЭ [11; 12]. В эпидемиологических исследованиях, проведенных в 27 странах Европы, США и Японии, выявлена обратная связь между уровнем потребления Se и смертностью от лейкемии, колоректального рака, рака молочной железы, яичников [13]. Аналогичные результаты получены в Китае, где содержание этого МЭ в почвах различных районов колеблется от недостаточного до токсичного [14].

Вскоре установлено, что уровень Se, определенный у пациентов за предшествующие 5 лет до постановки диагноза злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта, легкого, предстательной железы, лимфом, был значительно ниже, чем у оставшихся здоровыми [15]. Многочисленные исследования в различных странах подтвердили увеличение частоты развития рака предстательной, щитовидной, молочной железы, шейки матки, легкого, полости рта, пищеварительного тракта, прямой кишки при дефиците Se в организме [16—23].

Однако, по данным некоторых авторов, не выявлено значительной связи между риском развития рака легкого, желудка, прямой кишки и уровнем Se в плазме или содержанием его в ногтях [24—27]. Исключение составляет рак мочевого пузыря, риск развития которого был в 2 раза выше при низком уровне Se в плазме [28]. По мнению G. N. Schrauzer, отсутствие связи могло быть вызвано потреблением Se, достаточным для противоопухолевой защиты [29]. Кроме того, наблюдения показали, что многие факторы следует принимать во внимание, в том числе исследование содержания Se в плазме или ногтях, а также пол участников исследований. В Голландии средний уровень Se у онкологических больных мужского пола был значительно ниже, чем в контрольной группе, но у женщин такие различия не выявлены [30].

Высказано предположение, что повышение содержания Se в рационе животных может стимулировать репарацию поврежденных ДНК, вызываемую канцерогеном [31; 32]. Установлено, что Se может обладать эф-

фективными профилактическими противоопухолевыми качествами. По данным ряда авторов, дополнительный прием Se снижал частоту развития опухолей более чем на 35% [33]. Клинические испытания в США показали, что у пожилых людей потребление Se уменьшало риск развития онкологических заболеваний на 65% [34].

Наиболее значительными были результаты эпидемиологического исследования NPC (Nutritional Prevention of Cancer), проведенного в 1983—1993 гг. в регионах США с низким уровнем Se в почве. На протяжении 4,5 года 1312 человек, ранее перенесшие рак кожи, ежедневно принимали по 200 мкг Se (в виде дрожжей) либо плацебо. При этом не отмечено снижения частоты развития рака кожи, но выявлено снижение риска развития рака легкого на 48%, колоректального — на 58%, предстательной железы — на 63%, общей заболеваемости — на 37% и смертности от рака — на 50% [35]. В группе лиц, продолжавших принимать Se в течение 7,4 года, по сравнению с группой плацебо отмечено на 52% меньше новых случаев рака предстательной железы (РПЖ), на 54% колоректального рака и на 26% рака легкого [36]. Установлен крайне важный факт: в случае если содержание Se в плазме крови не превышало 105,2 мкг/л, то общий риск развития рака был снижен на 49%, при концентрации Se в диапазоне от 105,2 до 121,6 мкг/л этот риск был снижен на 30%, а при содержании Se более 121,6 мкг/л — только на 20% [35]. У мужчин с концентрацией в плазме простатоспецифического антигена менее 4 мкг/мл применение препаратов, содержащих Se, сопровождалось снижением частоты развития РПЖ на 65% [37; 38]. Более мощный защитный эффект Se в профилактике РПЖ наблюдали при низком содержании МЭ в крови. При содержании Se в плазме более 121,6 мкг/л выявлено статистически незначимое увеличение риска развития рака легкого [39].

Полученные данные послужили поводом к проведению исследования SELECT с участием 35 533 человек. Пищевые добавки содержали 200 мкг/сут Se в виде L-селенометионина и витамина E (400 МЕ/сут альфа-токоферола) — отдельно или вместе либо плацебо. Через 5,5 года у лиц, получавших Se отдельно либо в сочетании с витамином E, по сравнению с теми, кто получал плацебо, не выявлено различий по заболеваемости раком легкого, предстательной железы, колоректальным раком либо по частоте развития других заболеваний. При тщательном анализе отсутствие положительного эффекта связали с использованием различных форм селена: обогащенные Se дрожжи в исследовании NPC и L-селенометионин в исследовании SELECT. Выявлено также существенное различие в популяциях: у участников исследования SELECT содержание Se в плазме исходно было значительно выше, чем у пациентов в исследовании NPC (135 и 113 мкг/л соответственно); кроме того, в исследовании NPC было 75% курящих мужчин, что не учитывали в исследовании SELECT [40—42].

В то же время повышение обеспеченности населения Финляндии Se в результате ввода Государственной программы по коррекции дефицита МЭ привело к снижению смертности от рака почти в 2 раза [43]. В последующие годы были опубликованы результаты 7 эпидемиологических исследований, включивших 2000 человек с различным содержанием Se в популяциях: низким,

средним и высоким. При низком уровне Se в плазме наблюдали повышение частоты развития рака не только предстательной железы, но и других локализаций: языка, пищевода, желудка, толстой кишки, печени, легкого, молочной, поджелудочной железы, матки, почек, мочевого пузыря, кожи, системы крови. Огромная защитная роль высокого содержания в плазме Se в профилактике РПЖ подтверждена в 6 эпидемиологических контролируемых двойных слепых рандомизированных исследованиях [8; 42; 44—47].

Крупные клинические исследования были проведены в дефицитных по Se провинциях Китая Qidong и Luxian, где хронический гепатит В является эндемическим заболеванием и наблюдается высокая заболеваемость раком печени (РП). Ежедневно в течение 8 лет 20 847 человек получали 30—50 мкг селенита натрия, в результате чего риск развития РП был снижен почти на 50% [48]. В этих же провинциях 2474 семей получали по 200 мкг селена в форме дрожжей или плацебо. Через 2 года заболеваемость РП у лиц, получавших селен, была снижена на 35% [48]. Кроме того, 2065 человек с наличием антигена вируса гепатита В в крови принимали селенит натрия по 500 мкг/сут в течение 3 лет, что привело к уменьшению числа новых случаев РП на 50% по сравнению с аналогичным показателем в группе плацебо [49]. Исследования с участием 3698 лиц проведены с 1984 по 1991 г. в провинции Linxian (где наблюдается самая высокая в мире смертность от рака пищевода), у которых среднее содержание Se в сыворотке не превышало 73 мкг/л [50]. Использование Se по 50 мкг/сут в виде Se-дрожжей в комплексе с витамином Е и бета-каротином в течение 5,3 года привело к снижению частоты развития рака пищевода на 42% и смертности от него [51].

Полученные результаты вызвали интерес к интенсивному изучению механизмов включения Se в процессы, связанные с предотвращением и подавлением опухолевой трансформации клеток, нарушением механизмов контроля пролиферации и дифференцировки клеток. К тому же многие исследования, проведенные на животных, показали, что ежедневное потребление Se как в неорганической, так и в органической форме в дозах, превышающих содержание этого МЭ в пище, позволяет подавить рост опухоли [52—54].

ДОЗЫ, ХИМИЧЕСКИЕ ФОРМЫ СЕЛЕНА

Se поступает в организм человека с продуктами растениеводства, в виде содержащих Se аминокислот — селенометионина (SeM) и селеноцистеина (SeC), что определяет зависимость уровня обеспеченности МЭ от геохимических условий проживания [3]. При больших количествах Se в почве и селенометионина растения также синтезируют Se-метилселеноцистеин (SeMC). Искусственное снабжение организма Se при его алиментарном дефиците может осуществляться в форме селенита или селената натрия. Основным критерием, по которому судят об обеспеченности организма Se, служит его концентрация в плазме крови. Данный показатель у жителей европейских стран составляет 140—160 мкг/л, у населения Канады и Америки близко к оптимальному — 140—180 мкг/л, а у жителей России содержание Se в плазме крови в большинстве регионов находится в

пределах 60—91 мкг/л и лишь на нескольких территориях достигает 111 мкг/л [55; 56].

Безопасный и достаточный уровень суточного потребления Se составляет 50—200 мкг. Проблемы дефицита Se возникают при дозе менее 11 мкг/сут [57]. Для организма жителей Европы считается приемлемым поступление Se в количестве 50 мкг/сут [58], в США — 70 мкг/сут для взрослых мужчин и 55 мкг/сут для взрослых женщин [59], такие же дозы рекомендованы Институтом питания РАМН [56]. Фармакологическая доза Se в 200—300 мкг/сут, по мнению многих авторов, обеспечивает профилактику некоторых видов рака, включая колоректальный рак, рак легкого и РПЖ [35; 36; 60]. Не отмечено токсических осложнений при использовании Se в дозе 600—800 мкг/сут [8]. Клинические проявления селеноза (токсические эффекты) выявлены при использовании Se в дозах от 1540—1600 мкг/сут, а повреждение ДНК — в дозах 3200—5000 мкг/сут [61].

МЕТАБОЛИЗМ

Клеточные процессы, индуцированные поступлением содержащих Se соединений, разнообразны и зависят от формы и дозы МЭ [62]. В организме при участии глутатиона (GSH) неорганические формы Se восстанавливаются до селенида (H_2Se). Этот путь тесно связан с продукцией супероксидных радикалов. При поступлении в организм избыточного количества неорганического Se селенид может накапливаться в тканях, вызывая токсический эффект. SeM не является окислителем, но его метаболиты обладают свойствами сильных оксидантов. Он трансформируется сначала в SeC путем трансселенации и далее при воздействии фермента β -лиазы в селенид либо γ -лиазой — в SeM с последующей реакцией деметилирования также до селенида. SeMC сначала β -лиазой преобразуется в SeC, а затем путем диметилирования — в селенид. Предполагается, что SeC является основным активным метаболитом Se в механизмах предупреждения рака [63]. Равновесие между SeM и SeC влияет на процессы метилирования и деметилирования, а также на поступление Se в селенопротеины (СП) [62]. Согласно современным представлениям общей регулируемой формой Se в организме является селенид. Избыточные количества селенида медленно подвергаются ферментативному метилированию с последовательным образованием метилгидроселенида, диметилселенида и катиона триметилселениониа, которые экскретируются с мочой, а диметилселенид — в большом количестве также с потом.

Биохимические функции Se определяют СП [6; 64]. Механизм синтеза СП и их функции описаны во многих работах [65; 66].

В современной классификации все СП разделены на 3 группы [67].

1. Неспецифические тканевые белки, содержащие Se. К ним относятся селеногемоглобин и многие другие, в которые включается радиоактивная метка $[^{75}Se]$ -Met при введении ее в организм.

2. Селенсвязывающие белки, активно соединяющиеся с Se при его поступлении в неорганической форме. Количество включаемого Se на 1 моль белка произвольно, но не может превосходить некоторого предела.

Биологическая роль селенсвязывающих белков, помимо того что они могут служить депо неорганического Se в тканях, точно не установлена. Предполагается, что 17 кД белок ответственен за поддержание жизнеспособности сперматозоидов, а 56 кД белок печени участвует в предотвращении развития опухолей под действием химических канцерогенов.

3. Селенспецифические, или истинные, СП — в процесс биосинтеза данных белков кроме 20 α-аминокислот (называемых протеиногенными или стандартными), кодируемых генетическим кодом, причисляют трансляционно включаемый селеноцистеин (Sec, U), так называемую нестандартную 21-ю аминокислоту. Сравнительно недавно обнаружено, что селеноцистеин — редкая, но функционально очень важная аминокислота. К настоящему времени выявлено 25 различных СП [68]. Их общей особенностью является строго стехиометрическое ковалентное включение селена (т. е. доля элемента является постоянной и характерной для каждого соединения, всегда в виде селеноцистеина) в строго определенные места в полипептидной цепи.

СП включают глутатионпероксидазы (GPX), тиоредоксин-редуктазы, йодотирониндейодиназы, селенофосфатсинтетазы 2, а также Sel P, H, K, S, R, W и др. [53; 68].

Биохимическая роль СП в организме определяется главным образом участием в окислительно-восстановительных реакциях и стабилизации клеточных мембран, в том числе в фазе как повреждения генетического аппарата клетки (инициации), так и опухолевой трансформации (промоции) некоторых видов рака, причем основная роль отводится именно селеноцистеину [69]. При дефиците селена (менее 0,02 мг/кг/сут) синтез этих белков глубоко подавлен. При недостатке Se в питании снижается не только активность GPX I, но и концентрация фермента в сыворотке крови, что позволяет использовать активность этого фермента в качестве маркера селенового статуса организма [70]. Уменьшение уровня GPX снижает устойчивость организма к окислительному стрессу [71], так как от содержания Se зависит не только активность GPX и тиоредоксина (Trx), но и их воздействие на синтез других природных антиоксидантных ферментов, в том числе супероксиддисмутазы [72].

Se входит в состав фермента йодотиронин-5-дейодиназы, участвующей в конверсии тироксина (T_4) в трийодтиронин (T_3), что указывает на тесную связь Se с метаболизмом тиреоидных гормонов и йода. Сравнительно недавно [73] выделены и идентифицированы изоформы селензависимой тиоредоксин-редуктазы (TrxR 1—3), главной биологической функцией которых является катализ окисления/восстановления SH-группы в специфическом белке тиоредоксине, ответственного за поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза в клетке. Рост содержания TrxR в тканях и сыворотке вызывается индукцией ее синтеза в условиях повышенного образования активированных метаболитов кислорода и может служить показателем окислительного стресса в тканях. TrxR1 участвует в регуляции «редокс-чувствительных» факторов транскрипции, таких, как опухолевый супрессор p53, индуцируемый гипоксией фактор (HIF) и фактор транскрипции AP-1 (активирующий протеин-1), отвечающих за изменение окислитель-

но-восстановительного баланса, что определяет участие этого фермента в предполагаемом механизме противоопухолевого действия Se [74]. Высказывается предположение, что именно функция TrxR лежит в основе эффектов, оказываемых препаратами Se в фармакологических дозировках. СП-Р выполняет функцию транспорта Se к различным тканям и является маркером обеспеченности организма Se, обладает антиоксидантными функциями. СП-S регулирует внутриклеточное окислительно-восстановительное равновесие. Известно, что СП-H играет роль редокс-зависимого регулятора транскрипции для генов глутатиона и детоксикации. СП-K выступает антиоксидантом преимущественно в кардиомиоцитах. СП-W участвует в окислительно-восстановительных реакциях, является важным буфером против отравления метилртутью. Показано протективное значение Se в нейтритализации канцерогенного и токсического действия тяжелых металлов и мышьяка [75].

РОЛЬ СЕЛЕНА В МЕХАНИЗМАХ ПРОФИЛАКТИКИ РАКА

На основании результатов биохимических, генетических и экспериментальных исследований выявлена значительная роль СП в профилактике рака [76; 77]. В здоровом организме ДНК защищены от воздействия канцерогенов метильными группами, но при дефиците Se снижено защитное метилирование ДНК, повышены повреждение и мутация [78]. Более чем у 50% больных раком выявляют нарушения функции белка p53, который называют хранителем генома. При повреждении ДНК белок p53 либо стимулирует восстановление ДНК, либо при необратимых нарушениях активирует апоптоз. Система ферментов Trx способствует индукции p53 и репарации ДНК [77]. С действием содержащих Se ферментов связывают многообразные возможности противоракового воздействия: влияние на оксидантный стресс, детоксикацию и метаболизм канцерогенов, индукцию апоптоза и пролиферацию клеток, метилирование и восстановление ДНК, контроль клеточного деления и воспаления, продукцию гормонов, иммунную функцию [78; 79]. Se оказывает антимутагенное действие, подавляет экспрессию онкогенов, ингибирует активность протеинкиназы C, тормозит ангиогенез, повышает активность противоопухолевых клонов естественных киллеров, стимулируя продукцию интерлейкина-1 и интерлейкина-2 [80; 81].

Специфической особенностью обмена Se в организме онкологического больного являются накопление значительного количества МЭ в опухоли и снижение его в крови [17; 82]. В жизнеспособной опухолевой ткани концентрация Se в 5—10 раз больше, чем в некротизированной [83]. Se обладает выраженным токсическим действием на клетки опухоли [29]. В опытах *in vitro* на лимфоцитах человека авторы продемонстрировали, что для оптимальной функции естественных киллеров необходимо, по крайней мере, 5 мкмоль Se (394 мкг/л) в виде селенита натрия или селенометионина [84].

ПРИМЕНЕНИЕ СЕЛЕНА В ОНКОЛОГИИ

Хотя крупные исследования действия Se не завершены, в последние годы появились клинические данные, подтверждающие важность и эффективность терапев-

тического применения Se в онкологии. По мнению ряда авторов, терапия Se должна проводиться у онкологических больных из-за существующего у них дефицита этого микроэлемента [85]. Смертность больных лимфомой в 3—5 раз выше при крайне низкой концентрации Se в крови [86].

Химио- и лучевая терапия усугубляет дефицит Se, что повышает тяжесть побочных токсических эффектов. Se изменяет функции системы глутатиона в злокачественных клетках, повышает их чувствительность к химио- и лучевой терапии, одновременно снижает побочное токсическое влияние на нормальные клетки [87]. Исследователи выявили положительную корреляцию между исходным уровнем Se, его дозой и результатами химиотерапии лимфомы (продолжительность жизни, ответ на химиотерапию). Авторы полагают, что дополнительное введение Se может дать новые возможности при лечении данного заболевания [88].

В случае использования адъювантной терапии селенитом натрия в дозе 0,2 мкг/кг/сут в течение 7-дневной химиотерапии отмечено усиление апоптоза в клетках лимфомы и выявлен эффект синергизма — уменьшение размеров надключичных и шейных лимфатических узлов, селезенки, инфильтрации костного мозга [87].

Для оценки эффекта Se и цинка при химиотерапии рака желудочно-кишечного тракта проведено рандомизированное исследование [89]. У 70% больных, получавших Se 200 мкг/сут и цинк Zn 21 мг/сут в таблетках в течение 50 дней, не отмечено ухудшение статуса питания, значительно уменьшилась слабость и появился аппетит, в то время как в группе плацебо у 80% больных констатируется значительное снижение уровня общего белка, альбумина, преальбумина и массы тела. В другом клиническом исследовании ($n = 62$) использование Se в форме дрожжей (200 мкг/сут) или плацебо в течение 2—3 мес у больных раком яичников привело к уменьшению выраженности побочных эффектов химиотерапии (цисплатин 100 мг/м² и циклофосфамид 600 мг/м² каждые 3 нед), таких, как выпадение волос, боли в животе, слабость и потеря аппетита [90].

При использовании селенита натрия в дозе 200 мкг/сут при облучении области головы и шеи у больных плоскоклеточным раком в 65% случаев удалось избежать трахеотомии и развития отека гортани III и IV степени (классификация Földi и Miller), кроме того, нормализовались показатели иммунитета [91; 92].

Многоцентровое рандомизированное исследование проведено у больных раком шейки и тела матки ($n = 81$). Больные исследуемой группы получали селенит натрия в дозе 500 мкг в день лучевой терапии и 300 мкг в день без облучения в течение 5 нед. Суммарная доза облучения составила 45—50 Гр (разовая доза 1,8—2,0 Гр), общая доза селена 15,9—18 мг. Содержание селена в крови повысилось с 62,8 до 86 мкг/л. Достигнуто достоверное различие с контрольной группой по частоте развития осложнений (диарея, изменение анализов крови, массы тела): 20,5% против 44,5% в контрольной группе, 5-летняя выживаемость составила 92 и 83% соответственно [93]. Однако в случае применения Se в дозе 20 мкг/сут при проведении химио- и лучевой терапии рака молочной железы эффекта не было [94]. Это объясняется тем, что в такой концен-

трации Se ведет себя как антиоксидант, а не прооксидант и, снижая уровень реактивных кислородных радикалов в тканях опухоли, негативно влияет на апоптоз клеток. Показано, что эффективность противоопухолевых препаратов зависит от уровня реактивных кислородных радикалов в ткани опухоли и снижение определенного порога при лечении антиоксидантами может способствовать росту опухолевых клеток [95].

В некоторых исследованиях показано, что дополнительное использование селенита натрия в повышенных дозах (до 2000 мкг/сут) самостоятельно или в комбинации с витаминами повышает качество жизни [96]. Дозу селенита натрия 3000 мкг внутривенно автор использовал при обширных иссечениях опухолей полости рта с двусторонней шейной лимфодиссекцией и последующим ежедневным введением по 1000 мкг в течение 21 дня [97]. Отмечено значительное уменьшение отека тканей лица и послеоперационной области по сравнению с таковым в группе контроля.

По нашим собственным данным [98; 99], использование «Селеназы» (пентагидрат селенита натрия) в дозе 2000 мкг/сут в 1-е сутки и по 1000 мкг в последующие 4 дня после операции у больных с пострезекционной печеночной недостаточностью приводит к увеличению уровня Se в крови, снижению содержания токсических метаболитов окислительного стресса и более раннему восстановлению детоксикационной и синтетической функции печени.

В представленных клинических исследованиях авторы не наблюдали неблагоприятных эффектов Se в использованных дозах и сроках применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее десятилетие в зарубежных изданиях опубликованы многочисленные обзоры, посвященные оценке значимости Se для здоровья человека. На основании эпидемиологических исследований установлена высокая степень корреляции между увеличением частоты развития онкологических заболеваний и низким уровнем Se в крови. Достоверно доказано, что длительный прием Se в повышенной дозе (200—300 мкг/сут) обеспечивает профилактику онкологических заболеваний и снижение смертности от них у лиц с дефицитом этого МЭ.

Se проявляет двойственные свойства — антиоксидантную и прооксидантную активность. Прооксидантная активность, сопровождающаяся токсическим действием на клетки опухоли, проявляется в условиях повышенных (фармакологических) концентраций Se. Результаты экспериментальных работ подтверждают воздействие Se на ранние стадии канцерогенеза, угнетение пролиферации злокачественных клеток, индукцию апоптоза. Выявлено значительное накопление Se в злокачественных опухолях и снижение в сыворотке крови. При дефиците Se подавлен синтез СП, нарушена антиоксидантная и антиканцерогенная защита. Клинические исследования подтверждают эффективность терапевтического применения Se в онкологии.

В то же время при достаточном обеспечении организма Se избыточное его поступление может приводить к токсическому эффекту. В настоящее время механизм биосинтеза и функция многих СП изучены недостаточ-

но, механизмы регуляции с вариантами селеновой диеты для конкретных категорий лиц и пациентов еще не решены. Для получения дополнительных данных требуются дальнейшие исследования и новые рандомизированные клинические испытания этого многообещающего эссенциального МЭ.

ЛИТЕРАТУРА

- Schwarz K., Moltz C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration // *J. Am. Chem. Soc.* — 1957. — Vol. 70. — P. 3292—3293.
- Studies on the relation of selenium and Keshan disease / Chen A., Yang F., Chen J., Chen X., Wen Z., Ge K. // *Biol. Tr. Elem. Res.* — 1980. — Vol. 2. — P. 91—107.
- Rayman M. P. The importance of selenium to human health // *Lancet.* — 2000. — Vol. 356. — P. 233—241.
- Patrick L. Selenium Biochemistry and Cancer: A Review of the Literature // *Alternative Med. Rev.* — 2004. — Vol. 9, N 3. — P. 239—258.
- Hatfield D. L., Berry M. J., Gladyshev V. N. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. — 3rd ed. — New York: Springer, 2012. — 598 p.
- Gladyshev V. N. Selenoproteins and selenoproteomes // Selenium: Its molecular biology and role in human health / Hatfield D. L., Berry M. J., Gladyshev V. N. (eds.). — 2nd ed. — New York: Springer, 2006. — P. 101—112.
- Association between toenail selenium and risk of acute myocardial infarction in European men. The EURAMIC Study. European Antioxidant Myocardial Infarction and Breast Cancer / Kardinaal A. F., Kok F. J., Kohlmeier L., Martin-Moreno J. M., Ringstad J., Comez-Aracena J., Mazaev V. P., Thamm M., Martin B. C., Aro A., Kark L. D., Riemersma R. A., Hutten J. K. // *Am. J. Epidemiol.* — 1997. — Vol. 145, N 4. — P. 373—379.
- Whanger P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update dagger // *Br. J. Nutr.* — 2004. — Vol. 91. — P. 11—28.
- Clayton C. C., Baumann C. A. Diet and azo dye tumors: effect of diet during a period when the drug is not fed // *Cancer Res.* — 1949. — Vol. 9. — P. 575.
- Shamberger R. J., Frost D. V. Possible protective effect of selenium against human cancer // *Can. Med. Assoc. J.* — 1969. — Vol. 100. — P. 682.
- Shamberger R. J., Willis C. E. Selenium distribution and human cancer mortality // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* — 1971. — Vol. 2. — P. 211—221.
- Clark L. C., Cantor K. P., Allaway W. H. Selenium in forage crops and cancer mortality in U.S. Counties // *Arch. Environ. Health* — 1981. — Vol. 46. — P. 37—42.
- Schrauzer G. N., White D. A., Schneider C. J. Cancer mortality correlation studies. III. Statistical association with dietary selenium intakes // *Bioinorg. Chem.* — 1977. — Vol. 7, N 1. — P. 23—31.
- Regional variation of cancer mortality incidence and its relation to selenium levels in China / Yu S. Y., Chu Y. J., Gong X. L., Hou C., Li W. G., Gong H. M., Xie J. R. // *Biol. Trace Elem. Res.* — 1985. — Vol. 7. — P. 21—29.
- Prediagnostic serum selenium and risk of cancer / Willett W. C., Polk B. F., Morris J. S., Stampfer M. J., Rosner B., Schneider K. // *Lancet.* — 1983. — Vol. 2. — P. 130—134.
- Association between serum selenium and the risk of cancer / Salonen J. T., Alfthan G., Huttunen J. K., Puska P. // *Am. J. Epidemiol.* — 1984. — Vol. 120, N 3. — P. 342—349.
- Combs G., Combs S. The role of selenium in nutrition. — New York: Acad. Press, 1986. — Vol. 38. — P. 179—199.
- Plasma selenium levels and the risk of colorectal adenomas / Russo M. W., Murray S. C., Wurzelmann J. L., Woosley J. T., Sandler R. S. // *Nutrition Cancer.* — 1997. — Vol. 28, N 2. — P. 125—129.
- Is low selenium status a risk factor for lung cancer? / Knekt P., Marniemi J., Teppo L., Heliövaara M., Aromaa A. // *Am. J. Epidemiol.* — 1998. — Vol. 148, N 10. — P. 975—82.
- Young K. J., Lee P. N. Intervention studies on cancer // *Eur. J. Cancer Prevent.* — 1999. — Vol. 8, N 2. — P. 91—103.
- Blood serum selenium in the province of Mérida, Venezuela, related to sex, cancer incidence and soil selenium content / Burguera J. L., Burguera M., Gallignani M., Alarcon O. M., Burguera J. A. // *J. Trace Element Electrolyt Health Dis.* — 1990. — Vol. 4, N 2. — P. 73—77.
- Correlation of cervical cancer mortality with reproductive and dietary factors, and serum markers in China / Guo W.-D., Hsing A. W., Li J.-Y., Chen J.-S., Chow W.-H., Blot W. J. // *Intern. J. Epidemiol.* — 1994. — Vol. 23. — P. 1127—1132.
- Prediagnostic serum selenium in a case-control study of thyroid cancer / Glatte E., Thomassen Y., Thoresen S., Haldorsen T., Lund-Larsen P. G., Theodorsen L., Aaseth J. // *Int. J. Epidemiol.* — 1989. — Vol. 18. — P. 45—49.
- Serum levels of selenium and retinol and the subsequent risk of cancer / Coates R. J., Weiss N. S., Daling J. R., Morris J. S., Labbe R. F. // *Am. J. Epidemiol.* — 1988. — Vol. 128. — P. 515—523.
- Prediagnostic serum selenium and zinc levels and subsequent risk of lung and stomach cancer in Japan / Kabuto M., Imai H., Yonezawa C., Neriishi K., Akiba S., Kato H., Suzuki T., Land C. E., Blot W. J. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* — 1994. — V. 1, N 3. — P. 465—469.
- A prospective study of selenium status and breast cancer risk. Hunter D. J., Morris J. S., Stampfer M. J., Colditz G. A., Speizer F. E., Willett W. C. // *J. Am. Med. Assoc.* — 1990. — Vol. 264. — P. 1128—1131.
- A case-control study of oral cancer and pre-diagnostic concentrations of selenium and zinc in nail tissue / Rogers M. A., Thomas D. B., Davis S., Weiss N. S., Vaughan T. L., Nevissi A. L. // *Int. J. Cancer Res.* — 1991. — Vol. 48. — P. 182—188.
- Helzlsouer K. J., Comstock G. W., Morris J. S. Selenium, lycopene, alpha-tocopherol, beta-carotene, retinol and subsequent bladder cancer // *Cancer Res.* — 1989. — Vol. 49. — P. 6144—6148.
- Schrauzer G. N. Anticarcinogenic effects of selenium // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2000. — Vol. 57. — P. 1864—1874.
- Is serum selenium a risk factor for cancer in men only? / Kok F. J., de Bruijn A. M., Hofman A., Vermeeren R., Valkenburg H. A. // *Am. J. Epidemiol.* — 1987. — Vol. 125. — P. 12—16.
- Rosin M. P. Inhibition of spontaneous mutagenesis in yeast cultures by selenite, selenate and selenide // *Cancer Lett.* — 1981. — Vol. 13. — P. 7—14.
- Antioxidants reduce the mutagenic effect of malonaldehyde and S-propylolactone / Shamberger R. J., Corlett C. L., Beaman K. D., Kasten B. L. // Antioxidants and cancer. Part IX. *Mutat. Res.* — 1979. — Vol. 66. — P. 349—355.
- Combs G. F. Jr., Gray W. P. Chemopreventive agents: selenium // *Pharmacol. Ther.* — 1998. — Vol. 79. — P. 179—192.
- Cancer mortality correlation studies. III. Statistical association with dietary selenium intakes / Schrauzer G. N., White D. A., Schneider C. J. // *Bioorg. Chem.* — 1977. — Vol. 7. — P. 23.
- Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group / Clark L. C., Combs G. F. Jr., Turnbull B. W., Slate E. H., Chalker D. K., Chow J., Davis L. S., Glover R. A., Graham G. F., Gross E. G., Krongrad A., Leshner J. L. Jr., Park H. K., Sanders B. B. Jr., Smith C. L., Taylor J. R. // *JAMA.* — 1996. — Vol. 276. — P. 1957—1963.
- Combs G. F., Lu J. Selenium as a cancer preventive agent // Selenium: Its molecular biology and role in human health / Hatfield D., Berry M., Gladyshev V. (eds.) — 2nd ed. — New York: Springer, 2006. — P. 249—264.
- Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) / Lippman S. M., Klein E. A., Goodman P. J., Lucia M. S., Thompson I. M., Ford L. G., Parnes H. L., Minasian L. M., Gaziano J. M., Hartline J. A., Parsons J. K., Bearden J. D. 3rd, Crawford E. D., Goodman G. E., Claudio J., Winquist E., Cook E. D., Karp D. D., Walther P., Lieber M. M., Kristal A. R., Darke A. K., Arnold K. B., Ganz P. A., Santella R. M., Albanes D., Taylor P. R., Probstfield J. L., Jagpal T. J., Crowley J. J., Meyskens F. L. Jr., Baker L. H., Coltman C. A. Jr. // *JAMA.* — 2009. — Vol. 301, N 1. — P. 39—51.
- Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial / Duffield-Lillico A. J., Dalkin B. L., Reid M. E., Turnbull B. W., Slate E. H., Jacobs E. T., Marshall J. R., Clark L. C. // *BJU Int.* — 2003. — Vol. 91. — P. 608—612.
- Selenium supplementation and lung cancer incidence: an update of the nutritional prevention of cancer trial / Reid M. E., Duffield-Lillico A. J., Garland L., Turnbull B. W., Clark L. C., Marshall J. R. // *Cancer*

Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2002. — Vol. 11. — P. 1285—1291.

40. Hurst R., Fairweather-Tait S. Selenium and vitamin E supplementation for cancer prevention // JAMA. — 2009. — Vol. 301. — P. 1876—1877.

41. Platz E. A., Lippman S. M. Selenium, genetic variation, and prostate cancer risk: epidemiology reflects back on selenium and vitamin E cancer prevention trial // J. Clin. Oncol. — 2009. — Vol. 27. — P. 3569—3572.

42. Rayman M. P., Combs G. F. Jr., Waters D. J. Selenium and vitamin E supplementation for cancer prevention // JAMA. — 2009. — Vol. 301, N 18. — P. 1876.

43. Aro A., Alfthan G. Effects of supplementation of fertilizers on human selenium status in Finland // Analyst. — 1995. — Vol. 120. — P. 841—843.

44. Plasma selenium level before diagnosis and the risk of prostate cancer development / Brooks J. D., Metter E. J., Chan D. W., Sokoll L. J., Landis P., Nelson W. G., Muller D., Andres R., Carter H. B. // J. Urol. — 2001. — Vol. 166, N 6. — P. 2034—2038.

45. Toenail selenium levels and the subsequent risk of prostate cancer: a prospective cohort study / Van den Brandt P. A., Zeegers M. P., Bode P., Goldbohm R. A. // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2003. — Vol. 12. — P. 866—871.

46. Taylor P. R., Parnes H. L., Lippman S. M. Science Peels the Onion of Selenium Effects on Prostate Carcinogenesis // J. Natl. Cancer Inst. — 2004. — Vol. 96, N 9. — P. 645—647.

47. A prospective study of plasma selenium levels and prostate cancer risk / Li H., Stampfer M. J., Giovannucci E. L., Morris J. S., Willett W. C., Gaziano J. M., Ma J. // J. Natl. Cancer Inst. — 2004. — Vol. 96, N 9. — P. 696—703.

48. Yu S. Y., Zhu Y. J., Li W. G. Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong // Biol. Trace Elem. Res. — 1997. — Vol. 56. — P. 117—124.

49. Tsao A. S., Kim E. S., Hong W. K. Chemoprevention of cancer // CA Cancer J. Clin. — 2004. — Vol. 54. — P. 150—180.

50. Abnet C. C., Qiao Y. L., Dawsey S. M. Prospective study of serum retinol, beta-carotene, beta-cryptoxanthin, and lutein/zeaxanthin and esophageal and gastric cancers in China // Cancer Causes Control. — 2003. — Vol. 14, N 7. — P. 645—655.

51. Prevention of esophageal cancer: the nutrition intervention trials in Linxian, China / Taylor P. R., Li B., Dawsey S. M., Li J.-Y., Yan C. S., Guo W. D., Blot W. J., Weng W., Liu B. Q., Zheng S. F., Yang Q., Yu Y., Sun Y., Li G. Y., Liu S. F. // Cancer Res. — 1994. — Vol. 54. — P. 2029—2031.

52. Hatfield D. L., Berry M. J., Gladyshev V. N. Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health. Springer Science + Business Media, LLC, New York, 2006. — 420 p.

53. Reeves M. A., Hoffmann P. R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation // Cell Mol. Life Sci. — 2009. — Vol. 66, N 15. — P. 2457—2478.

54. Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression / Irons R., Carlson B. A., Hatfield D. L., Davis C. D. // J. Nutr. — 2006. — Vol. 136. — P. 1311—1317.

55. Голубкина Н. А., Папазян Т. Т. Селен в питании. Растения, животные, человек. — М., 2006.

56. Селен в организме человека / Тутельян В. А., Княжев В. А., Хотимченко С. А., Голубкина Н. А., Кушлинский Н. Е., Соколов Я. А. — М.: РАМН, 2002. — 224 с.

57. Leavander O. A. Selenium. // W. Mertz (ed.). Trace Elements in Human and Animal Nutrition. — 5th ed. — Orlando: Academic Press Inc, 1987. — P. 209—279.

58. Селен. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Женева: ВОЗ, 1989. — С. 270.

59. National Research Council: Recommended Dietary Allowances. 10th ed. Washington, DC: National Academy Press, 1989. — 302 p.

60. Rayman M. P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action // Proc. Nutr. Soc. — 2005. — Vol. 64. — P. 527—542.

61. A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities / Reid M. E., Stratton M. S., Lillico A. J., Fakih M., Nataraajan R., Clark L. C., Marshall J. R. // J. Trace Elem. Med. Biol. — 2004. — Vol. 18. — P. 69—74.

62. Suzuki K. T., Kurasaki K., Suzuki N. Selenocysteine beta-lyase and methylselenol demethylase in the metabolism of Se-methylated selenocompounds into selenide // Biochim. Biophys. Acta — 2007. — Vol. 1770. — P. 1053—1061.

63. Ip C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention // J. Nutr. — 1998. — Vol. 128. — P. 1845—1854.

64. Behne D., Kyriakopoulos A. Mammalian selenium-containing proteins // Ann. Rev. Nutr. — 2001. — Vol. 21. — P. 453—473.

65. Hoffmann P. R., Berry M. J. Selenoprotein synthesis: a unique translational mechanism used by a diverse family of proteins // Thyroid. — 2005. — Vol. 15. — P. 769—775.

66. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health / Papp L. V., Lu J., Holmgren A., Khanna K. K. // Antioxid. Redox Signal. — 2007. — Vol. 9, N 7. — P. 775—806.

67. Sunde R. A. Molecular biology of selenoproteins // Ann. Rev. Nutr. — 1990. — Vol. 10. — P. 451—474.

68. Genetic Code Supports Targeted Insertion of Two Amino Acids by One Codon / Turanov A. A., Lobanov A. V., Fomenko D. E., Morrison H. G., Sogin M. L., Klobutcher L. A., Hatfield D. L., Gladyshev V. N. // Science. — 2008. — Vol. 323. — P. 259—261.

69. Combs G. F. Jr. Impact of selenium and cancer prevention findings on the nutrition-health paradigm // Nutr. Cancer. — 2001. — Vol. 40. — P. 6—11.

70. Arthur J. R. Functional indicators of iodine and selenium status // Proc. Nutr. Soc. — 1999. — Vol. 58, N 2. — P. 507—512.

71. Forman H. J. Oxidant Radical Production and Lung Injury // Oxidant Radicals: Systemic Events and Disease Processes. — Basel: Karger, 1990. — P. 71—96.

72. Das K. C., Lewis-Molock Y., White C. W. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. — 1997. — Vol. 17, N 6. — P. 713—726.

73. Tamura T., Stadtman T. C. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1996. — Vol. 93, N 3. — P. 1006—1011.

74. Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF-kappaB and AP-1 / Gius D., Botero A., Shan S., Curry H. A. // Toxicol. Lett. — 1999. — Vol. 106. — P. 93—106.

75. Andersen O., Nielsen J. B. Effect of simultaneous low level dietary supplementation with inorganic selenium in whole-body, blood and organ levels of toxic metals in mice // Environ. Health Perspect. — 1994. — Vol. 102. — P. 321—324.

76. Jackson M. I., Combs G. F. Jr. Selenium as a Cancer Preventive Agent // Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health / Hatfield D. L., Berry M. J., Gladyshev V. N. (eds.). — 3rd ed. — New York: Springer, 2012. — P. 313—323.

77. Diwadkar-Navsariwala V., Diamond A. M. The link between selenium and chemoprevention: a case for selenoproteins // J. Nutr. — 2004. — Vol. 134. — P. 2899—2902.

78. El-Bayoumy K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer // Mutat. Res. — 2001. — Vol. 475. — P. 123—139.

79. Davis C. D., Irons R. Are selenoproteins important for the cancer protective effects of selenium? // Curr. Nutr. Food Sci. — 2005. — Vol. 1. — P. 201—214.

80. Seo Y. R., Kelley M. R., Smith M. L. Selenomethionine regulation of p53 by a ref-1-dependent redox mechanism // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99. — P. 14 548—14 553.

81. Gladyshev V. N. Selenoproteins and selenoproteomes // Selenium: Its molecular biology and role in human health / Hatfield D. L., Berry M. J., Gladyshev V. N. (eds.). — 2nd ed. — New York: Springer. — 2006. — P. 99—114.

82. Никитина А. П., Иванов В. Н. Селен в жизни человека и животных. М., 1995. — 242 с.

83. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органоопатология // Авцын А. П., Жаворонков А. А., Риш М. А., Строчкова Л. С. — М.: Медицина, 1991. — 496 с.

84. Borella P., Bargellini A., Solfrini V. Selenium interaction with human immune cell function with human immune cell functions // Metal Ions in Biology and Medicine / Collier Ph., Bratter P., Negretti de Bratter V., Khassanova L., Etienne J. C. (eds.). — Paris: John Libbey Eurotext, 1998. — Vol. 5. — P. 429—434.

85. Schrauser G. Selen zur Prevention und Therapie von Krebserkrankungen // Biol. Med. — 2004. — Vol. 3. — P. 167—170.

86. Serum selenium concentration at diagnosis and outcome in patients with haematological malignancies / Stevens J., Waters R., Siemawska C., Kassam S., Montoto S., Fitzgibbon J., Rohatiner A., Lister A., Joel S. // Br. J. Haematol. — 2011. — Vol. 154. — P. 448—456.

87. Presentation serum selenium predicts for overall survival, dose delivery, and first treatment response in aggressive non-Hodgkin's lymphoma / Last K. W., Cornelius V., Delves T., Sieniawska C. H., Fitzgibbon J., Norton A., Amess J., Wilson A., Rohatiner A., Lister A. T. // *J. Clin. Oncol.* — 2003. — Vol. 21. — P. 2335—2341.

88. High-dose sodium selenite can induce apoptosis of lymphoma cells in adult patients with non-Hodgkin's lymphoma / Asfour I. A., El-Tehewi M. M., Ahmed M. H., Abdel-Sattar M. A., Moustafa N. N., Hegab H. M., Fathey O. M. // *Biol. Trace Elem. Res.* — 2008. — Vol. 127. — P. 200—210.

89. Effects of selenium and zinc supplementation on nutritional status in patients with cancer of digestive tract / Federico A., Iodice P., Federico P., Del Rio A., Mellone M. C., Catalano G., Federico P. // *Eur. J. Clin. Nutr.* — 2001. — Vol. 55, N 4. — P. 293—297.

90. Sieja K., Talerzyk M. Selenium as an element in the treatment of ovarian cancer in women receiving chemotherapy // *Gynecol. Oncol.* — 2004. — Vol. 93. — P. 320—327.

91. Selenium in the treatment of radiation-associated secondary lymphedema / Micke O., Bruns F., Mücke R., Schäfer U., Glatzel M., DeVries A. F., Schönekaes K., Kisters K., Buntzel J. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* — 2003. — Vol. 56. — P. 40—49.

92. Selenium and immunocompetence in patients with head and neck cancer / Kiremidjian-Schumacher L., Roy M., Glickman R., Schneider K., Rothstein S., Cooper J., Hochster H., Kim M., Newman R. // *Biol. Trace Elem. Res.* — 2000. — Vol. 73. — P. 97—111.

93. Selenium in Oncology: From Chemistry to Clinics / Micke O.,

Schomburg L., Buntzel J., Kisters K., Muecke R. // *Molecules.* — 2009. — Vol. 14. — P. 3975—3988.

94. Prevalence and predictors of antioxidant supplement use during breast cancer treatment: the Long Island breast cancer study project / Greenlee H., Gammon M. D., Abrahamson P. E., Gaudet M. M., Terry M. B., Hershman D. L., Desai M., Teitelbaum S. L., Neugut A. I., Jacobson J. S. // *Cancer.* — 2009. — Vol. 115. — P. 3271—3282.

95. Kong Q., Beel J. A., Lillehei K. O. A threshold concept for cancer therapy // *Med. Hypotheses.* — 2000. — Vol. 55. — P. 29—35.

96. Selenium supplementation in head and neck surgery / Buntzel J., Glatzel M., Bruns F., Kisters K., Micke O., Mücke R. // *Trace Elem. Electrolytes.* — 2008. — Vol. 25. — P. 221.

97. Reduction of postoperative lymphedema after oral tumor surgery with sodium selenite / Zimmermann T., Leonardt H., Kersting S., Albrecht S., Range U., Eckelt U. // *Biol. Trace Element Res.* — 2005. — Vol. 106, N 3. — P. 193—203.

98. Возможности селенита натрия в интенсивной терапии пострезекционной печеночной недостаточности / Свиридова С. П., Пятютко Ю. И., Горожанская Э. Г., Соменова О. В., Чухнов С. А. // *Вестн. интенсивн. тер.* — 2011. — № 1. — С. 35—39.

99. Effects of high doses of selenium on the antioxidant status after liver resection / Obukhova O., Kashiya S., Gorojanskaya E., Chekini J., Sviridova S. // *Critical Care.* — 2011. — Vol. 15. — P. 132—133.

Поступила 14.06.2012

*Svetlana Petrovna Sviridova¹, Shalva Robertovich Kashiya²,
Olga Arkadiyevna Obukhova³, Evgeniy Stanislavovich Chuchuyev⁴*

PROSPECTS FOR ESSENTIAL SELENIUM IN ONCOLOGY

¹ MD, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher, Resuscitation and Intensive Care Department No. 1, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

² MD, PhD, Head, Resuscitation and Intensive Care Department No. 1, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

³ MD, PhD, Senior Researcher, Resuscitation and Intensive Care Department No. 1, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁴ MD, PhD, Researcher, Hepatic and Pancreatic Tumor Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

Address for correspondence: Obukhova Olga Arkadiyevna, Resuscitation and Intensive Care Department No. 1, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478;
e-mail: obukhova.olga@rambler.ru

Selenium was recognized as an essential element only 30 years ago, and multiple recent studies demonstrated selenium to play an important role in human health. This is an overview of scientific findings on prospects for use of selenium in prevention and therapy of cancer. Selenium principal biological role is involvement in synthesis and activity of selenium-containing antioxidant enzymes and selenoproteins that protect cells from damage by free radicals. Selenium deficiency is associated with low selenoprotein synthesis, impaired antioxidant and anticancer defense. Blood selenium levels correlate reversely with the risk of cancer incidence and mortality. Selenium demonstrates effective cancer prevention activity. Selenium supplementation is associated with a more than 35% reduction in cancer risk in patients with selenium deficiency. Selenium-containing enzymes are thought to possess multiple anticancer activities such as effect on oxidant stress, carcinogen detoxication and metabolism, induction of cell apoptosis and proliferation, control of cell division and inflammation, DNA methylation and recovery, hormone production, immune function. Selenium demonstrates both anti- and prooxydant activities. Selenium is found at considerable levels in malignant tumors and at low levels in serum. Selenium at increased (pharmacological) concentrations exerts prooxydant activity with toxic effects on tumor cells. Clinical trials confirm the important and effective role of selenium in oncology as a chemo- / radiotherapy sensitizing agent that also reduces toxic side effects on normal cells. However, functions and regulation mechanisms of many selenoproteins and selenium diets have not been studied adequately and need further assessment in clinical trials.

Key words: selenium, cancer, biochemical functions, prevention, treatment.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Марина Александровна Емельянова¹, Наталья Николаевна Мазуренко²,
Илья Михайлович Гагарин³, Ирина Викторовна Цыганова⁴,
Ирина Борисовна Зборовская⁵, Ксения Анатольевна Архипова⁶,
Валерия Васильевна Мочальникова⁷, Людмила Николаевна Любченко⁸,
Татьяна Васильевна Наседкина⁹

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *EGFR* ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО С ПОМОЩЬЮ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРОЧИПОВ

¹ Младший научный сотрудник, лаборатория биологических микрочипов
ФГБУ науки «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН
(119991, РФ, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32)

² Профессор, д. б. н., заведующая, лаборатория онкогеномики НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

³ К. м. н., лаборант-исследователь, лаборатория онкогеномики НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁴ К. б. н., научный сотрудник, лаборатория онкогеномики НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁵ К. б. н., заведующая, лаборатория регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁶ К. б. н., научный сотрудник, лаборатория регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁷ Патологоанатом, патологоанатомическое отделение НИИ клинической онкологии
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁸ Д. м. н., заведующая, лаборатория клинической онкогенетики НИИ клинической онкологии
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁹ Д. б. н., ведущий научный сотрудник, лаборатория биологических микрочипов
ФГБУ науки «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта» РАН
(119991, РФ, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32)

Адрес для переписки: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, НИИ канцерогенеза
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, лаборатория онкогеномики,
Мазуренко Наталья Николаевна; e-mail: nnmazurenko@mail.ru

Соматические мутации в гене *EGFR* у больных немелкоклеточным раком легкого предопределяют чувствительность опухоли к таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназ — гефитинибом (иресса) или эрлотинибом. Нами разработан метод, позволяющий выявлять 13 наиболее часто встречающихся мутаций в гене *EGFR*: 9 вариантов делеций в 19-м экзоне и точковые мутации в 21-м (Leu858Arg) и 18-м (Gly719Cys, Gly719Ala, Gly719Ser) экзонах. Для повышения чувствительности метода и выявления минорных фракций опухолевых клеток в клинических образцах использован способ подавления амплификации последовательностей «дикого» типа в ходе полимеразной цепной реакции с помощью LNA-олигонуклеотидов. Продукт LNA-блокирующей полимеразной цепной реакции гибридизовали с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными в геле на поверхности биочипа. Биочип протестирован на 127 образцах ДНК больных немелкоклеточным раком легкого, в основном аденокарциномой. В качестве референс-метода использовали секвенирование продуктов полимеразной цепной реакции. Разработанный метод с использованием биочипов позволяет с высокой достоверностью обнаруживать мутации в гене *EGFR*, независимо от метода получения ДНК, даже если доля клеток, несущих мутацию, незначительна.

Ключевые слова: соматические мутации, рак легкого, ген *EGFR*, биочипы, диагностика.

В последние годы при лечении больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) активно используют нацеленные на определенный вид молекул (таргетные) препараты гефитиниб и эрлотиниб [1]. Они избирательно связываются с тирозинкиназным доменом рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), тем самым блокируя рост и пролиферацию клеток опухоли [2]. В ряде исследований показано, что данные препараты эффективны исключительно у пациентов, несущих соматические мутации в гене *EGFR* [3–6]. Большинство мутаций локализуется в 18–21-м экзонах гена *EGFR*, кодирующих тирозинкиназный домен рецептора [4; 5]. Это приводит к увеличению киназной активности рецептора, способствующей увеличению клеточной пролиферации, выживаемости, инвазии [7].

Наиболее распространенными мутациями в гене *EGFR*, составляющими 51–56% тестируемых нарушений, являются делеции в 19-м экзоне, которые могут иметь различный размер, но наиболее часто приводят к делеции с 746-й по 750-ю аминокислоту. Кроме того, часто наблюдаются точковые мутации Leu858Arg (36–44%) в 21-м экзоне и Gly719X (5–6%) в 18-м [8–10]. Мутации, наличие которых ассоциировано с эффективностью анти-EGFR-терапии, также различаются по своей клинической значимости. Например, у пациентов с делециями в 19-м экзоне гена *EGFR* общая выживаемость выше, чем у пациентов с мутацией Leu858Arg [11; 12].

При исследовании опухолевого материала доля клеток с соматическими мутациями может быть невелика, что в ряде случаев не позволяет выявить анализируемую мутацию. Наиболее распространенный подход к решению этой проблемы состоит в избирательном выявлении мутантного аллеля [13; 14] или в подавлении амплификации последовательностей дикого типа при проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) [15; 16]. В частности, для обогащения образца последовательностью определенного типа используют LNA-блокирующую ПЦР [17].

LNA (locked nucleic acid) — синтетический аналог РНК, имеющий дополнительную связь между 2'-О и 4'-С, которая блокирует рибозу в N-конформации, подобно А-форме РНК. Такая «закрытая» конформация способствует увеличению термодинамической стабильности совершенного дуплекса ДНК-LNA и нестабильности несовершенного [18]. В результате присутствия в ПЦР-смеси LNA-олигонуклеотида, который специфически узнает последовательность дикого типа и связывается с ней, препятствуя ее амплификации, происходит преимущественное увеличение числа копий мутантного аллеля [17].

В нашем исследовании предложен высокочувствительный метод, совмещающий LNA-блокирующую мультиплексную ПЦР с гибридизацией на биочипе. Это сделало возможным проведение одновременного анализа 13 соматических мутаций в гене *EGFR*. В результате разработана высокоэффективная тест-система, которую в

дальнейшем можно использовать для скрининга больных НМРЛ на наличие мутаций в гене *EGFR*. Достоверное определение мутаций позволяет индивидуально подбирать противоопухолевую терапию, основываясь на генетическом портрете опухоли.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследование включены 123 больных НМРЛ, прооперированных и/или получавших химиотерапевтическое лечение в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН. Выборка опухолей представлена 109 аденокарциномами (у 65 мужчин и у 44 женщин) и 14 образцами плоскоклеточного рака легких (у 12 мужчин и у 2 женщин). Средний возраст больных аденокарциномой составил 60,3 года (от 28 до 82 лет), а больных плоскоклеточным раком — 59,2 года (от 30 до 76 лет). В 81 случае исследовали свежемороженый опухолевый материал, полученный в результате хирургического вмешательства и хранившийся в жидком азоте, а в 65 случаях — архивные парафиновые блоки опухолевых биопсий. У 23 пациентов образцы были представлены одновременно и свежемороженой, и фиксированной в парафиновых блоках опухолевой тканью.

Выделение ДНК. Для выделения ДНК из свежемороженого операционного материала использовали набор QIAamp DNA Micro Kit («Qiagen», Германия).

При выделении ДНК из архивных образцов операционного материала, фиксированного в парафине, проводили ручную макродиссекцию опухолевых клеток со срезов под контролем серийного среза, окрашенного гематоксилином и эозином, что позволяет обогатить препарат опухолевой ДНК. Геномную ДНК выделяли с помощью протеиназы К, как описано ранее [19].

Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit («Life Technologies Corporation», США).

Сайт-направленный мутагенез. Для тестирования биологического микрочипа мутантные последовательности гена *EGFR*, несущие точковые мутации Leu858Arg, Gly719Cys, Gly719Ala и Gly719Ser, получены посредством сайт-направленного мутагенеза [20; 21]. Фрагменты 19-го экзона гена *EGFR*, содержащие все варианты анализируемых на чипе делеций, синтезированы в коммерческой фирме «Евроген» (Москва, Россия).

Мутации. В ячейках биочипа были иммобилизованы олигонуклеотиды, позволяющие определять точковые мутации Gly719Ala, Gly719Cys, Gly719Ser, Leu858Arg и делеции в 19-м экзоне гена *EGFR*: 2235–2249del (E746–A750del), 2236–2250del (E746–A750del), 2237–2251del (E746–T751 del insA), 2237–2252del insT (E746–T751del insV), 2237–2255del insT (E746–S752del insV), 2239–2248del insC (L747–A750del insP), 2239–2251del insC (L747–T751del insP), 2240–2254del (L747–T751del), 2240–2257del (L747–P753del insS).

Олигонуклеотидные пробы представляют собой последовательность гена *EGFR* длиной 15–20 п. о., несущую вариабельный участок в центральном положении. Фрагменты гена *EGFR* с анализируемыми мутациями приведены в табл. 1.

Синтез олигонуклеотидов и изготовление биочипов. Олигонуклеотиды для иммобилизации на биочипе синте-

Таблица 1

Мутации в гене *EGFR*, идентифицируемые на биологическом микрочипе

Сайт	Мутация	Нуклеотидная последовательность
19-й экзон	WT	ATTAAGAGA
	2235—2249del (E746—A750del)	TCAAAACAT
	2236—2250del (E746—A750del)	TCAAGACAT
	2237—2251del (E746—T751del insA)	CAAGGCATC
	2237—2252del insT (E746—T751del insV)	AAGGTATCT
	2237—2255del insT (E746—S752del insV)	AAGGTTCCG
	2239—2248del insC (L747—A750del insP)	GGAACCAAC
	2239—2251del insC (L747—T751del insP)	GGAACCATC
	2240—2254del (L747—T751del)	GGAATCTCC
	2240—2257del (L747—P753del insS)	GGAATCGAA
719-й кодон	Gly (WT)	GCTGGGCTC
	Ala	CTGGCCTCC
	Cys	GCTGTGCTC
	Ser	GCTGAGCTC
858-й кодон	Leu (WT)	GGGCTGGCC
	Arg	GGGCGGGCC

зировали на автоматическом синтезаторе 394 DNA/RNA Synthesizer («Applied Biosystems», США) с использованием стандартной фосфоамидитной процедуры. На 3'-конце олигонуклеотидов находился спейсер со свободной аминогруппой, который вводили при синтезе с помощью 3'-Amino-Modifier C7 CPG 500 («Glen Research», США).

Биочипы изготовлены с помощью фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов полиакриламидного геля, как описано ранее [22].

Подбор LNA-олигонуклеотидов. LNA-олигонуклеотиды моделировали с помощью on-line приложения (<http://www.exiqon.com/oligo-tools>). В их состав входили как LNA, так и ДНК-нуклеотиды, 3'-конец молекулы был фосфорилирован для препятствия удлинению олигону-

клеотида Taq-полимеразой. Последовательности LNA-олигонуклеотидов могут быть предоставлены авторами по запросу.

ПЦР. Амплификацию интересующих нас участков гена *EGFR* проводили с помощью двухэтапной мультиплексной ПЦР. Для каждого фрагмента гена были подобраны и синтезированы две пары праймеров. Нуклеотидные последовательности праймеров можно получить у авторов по запросу.

Мультиплексную ПЦР проводили на приборе Dyad («Bio-Rad», США). ПЦР-смесь первого этапа общим объемом 25 мкл включала 67 мМ Трис-НСl (pH 8,6), 166 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01% Тритон X-100, 1,5 мМ MgCl_2 , 0,2 мМ каждого из дНТФ («Силекс», Россия), 2,5 U Taq-полимеразы («Силекс», Россия), по 0,2 мкМ каждого из праймеров, 0,02—0,1 мкМ каждого из LNA-олигонуклеотидов и 20 нг ДНК. Амплификацию проводили по следующей схеме: денатурация при 94 °C (3 мин 30 с), затем 35 циклов: 94 °C (30 с), 62 °C (20 с), 72 °C (10 с), после этого — элонгация при 72 °C в течение 3 мин.

На втором этапе в качестве матрицы использовали продукт первого этапа ПЦР (2 мкл). Состав ПЦР-смеси был таким же, за исключением того, что в ней отсутствовали LNA-олигонуклеотиды, а содержались праймеры второго этапа в концентрации 0,2 мкМ для прямых и 2 мкМ для обратных праймеров. Кроме того, в ПЦР-смесь добавляли 0,2 нМ флуоресцентно меченного дУТФ-Су5, который встраивался в цепь в процессе амплификации. Таким образом, в результате ПЦР получали одноцепочечный флуоресцентно меченный ПЦР-продукт.

Гибридизация меченного продукта на биочипе. Полученный на втором этапе мультиплексной ПЦР флуоресцентно меченный продукт использовали для гибридизации на биочипе. Гибридизационная смесь общим объемом 40 мкл содержала 10 мкл формамида («Serva», США), 10 мкл 20 × SSPE («Promega», США) и 20 мкл амплификата. Гибридизационную смесь денатурировали при 95 °C (5 мин), охлаждали на льду (2 мин), наносили на биочип и оставляли на 12—18 ч при температуре 37 °C. После этого биочип отмывали в растворе 1 × SSPE в течение 15 мин при комнатной температуре, споласкивали дистиллированной водой и высушивали.

Регистрация изображения. Флуоресцентный сигнал от ячейки микрочипа регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов, снабженного камерой ПЗС и программным обеспечением Imageware («Биочип-ИМБ», Россия), по описанной ранее методике с экспозицией 100—500 мс [23]. Поскольку все ячейки на биочипе дублированы, в расчетах использовали среднее значение сигнала по двум ячейкам. Считали, что сигнал свидетельствует об образовании дуплекса, если интенсивность флуоресценции от соответствующей ячейки минимум в 5 раз превышала интенсивность флуоресценции фона. В зависимости от локализации сигнала на биочипе можно судить о наличии той или иной мутации в исследуемом образце. При амплификации интересующего нас фрагмента ДНК использовали LNA-блокирующую ПЦР. Поэтому ячейка, содержащая зонд с последовательностью дикого типа, могла иметь очень низкий уровень флуоресцентного сигнала.

Секвенирование. Выделенные из срезов парафиновых блоков образцы опухолевой ДНК ($n = 65$) анализи-

ровали секвенированием параллельно с анализом на биочипах. Для выявления мутаций в гене *EGFR* использовали ПЦР с праймерами к 18, 19 и 21-му экзонам гена *EGFR*, выбранными в результате биоинформационного анализа [19]. В случаях, если ДНК со срезов была сильно фрагментирована и имела низкую концентрацию, использовали полугнездовую ПЦР с праймерами, позволяющими получить более короткие ПЦР-продукты, перекрывающие друг друга [19]. После очистки ПЦР-продуктов проводили секвенирование с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (ЦКП «Геном», Москва, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ мутаций в гене *EGFR* с помощью биочипа

На рис. 1 приведена схема биологического микрочипа. Для повышения надежности и точности анализа каждая проба на биочипе дублирована.

Разработанный биочип позволяет анализировать 13 наиболее часто встречающихся мутаций в гене *EGFR*: 9 вариантов делеций в 19-м экзоне, мутации в 719-м кодоне Gly719Ala, Gly719Cys и Gly719Ser, мутацию Leu858Arg. На рис. 2 представлены гибридизационные картины, которые получены при анализе ДНК, выделенной как из свежзамороженных биопсий, так и из парафинового среза. Один образец представлен последовательностью гена *EGFR* «дикого» типа (см. рис. 2, А), другие образцы содержат мутации: 2235—2249del (E746—A750del) в 19-м экзоне (см. рис. 2, Б), Gly719Ala (см. рис. 2, В) и Leu858Arg (см. рис. 2, Г).

Биологический микрочип протестирован на способность определения всех 13 мутаций. Для этого использовали образцы опухолевой ДНК с известными генотипами. В ряде случаев ввиду отсутствия клинических образцов с данной мутацией использованы мутантные последовательности, полученные с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Генотипирование пациентов с НМРЛ

Разработанный нами протокол генотипирования на биочипах использован при анализе 127 образцов ДНК от 123 больных НМРЛ. Результаты генотипирования суммированы в табл. 2.

Выборка опухолей состояла из 2 групп. В 1-ю группу входили образцы ДНК из свежзамороженных образцов НМРЛ ($n = 81$), во вторую — образцы ДНК, полученные из парафиновых блоков опухолевой ткани ($n = 46$). Для 4 случаев НМРЛ получены образцы ДНК двух типов.

В результате генотипирования образцов ДНК, выделенных из свежзамороженных опухолевых биопсий, мутации в гене *EGFR* обнаружены у 11 (15%) из 72 пациентов с аденокарциномой легкого. Мутации в 19-м экзоне выявлены в 6 случаях: в 5 зафиксированы делеции 2235—2249 del (E746—A750del) и в одном — 2240—2254 del (L747—T751del). В 5 случаях выявлена миссенс-мутация Leu858Arg в 21-м экзоне. Для 9 случаев НМРЛ получено по два препарата ДНК из разных участков опухоли. При анализе на микрочипах результаты с разными препаратами ДНК от одного больного совпали. Мутации у



Рисунок 1. Схема расположения олигонуклеотидных проб на биочипе. Олигонуклеотиды, расположенные в верхнем ряду, соответствуют последовательностям «дикого» типа. В двух первых столбцах нанесены олигонуклеотиды, соответствующие наиболее часто встречающимся делециям в 19-м экзоне: Del 1 (2235—2249del (E746—A750del)), Del 2 (2236—2250del (E746—A750del)), Del 3 (2237—2251del (E746—T751 del insA)), Del 4 (2237—2252del insT (E746—T751del insV)), Del 5 (2237—2255del insT (E746—S752del insV)), Del 6 (2239—2248del insC (L747—A750del insP)), Del 7 (2239—2251del insC (L747—T751del insP)), Del 8 (2240—2254del (L747—T751del)), Del 9 (2240—2257del (L747—P753del insS)). В третьем и четвертом столбцах нанесены олигонуклеотиды, соответствующие мутациям Gly719Ala, Gly719Cys и Gly719Ser, в двух последних — мутации Leu858Arg гена *EGFR*. В угловых позициях нанесены ячейки, содержащие флуоресцентный краситель Cy5 и permanently светящиеся, для ориентировки и контроля интенсивности свечения.

пациентов с плоскоклеточным раком легких не обнаружены.

Необходимо отметить, что для 23 случаев аденокарциномы легкого, исследованных на биочипах, проведен параллельный анализ мутаций секвенированием в препаратах ДНК, полученных из парафиновых срезов. Несмотря на то что ДНК получали разными методами и из разных участков опухоли, результаты совпали в 95,6% случаев. Только в одном случае мутация Leu858Arg была обнаружена с помощью биочипа в препаратах ДНК из свежей ткани и парафинового среза, но не выявилась при секвенировании ДНК из среза. Этот спорный случай был проверен с помощью ПЦР в реальном времени: мутация была выявлена в новом препарате ДНК от этой больной.

В результате генотипирования образцов ДНК, выделенных из парафиновых срезов, мутации в гене *EGFR*



Рисунок 2. Гибридационные картины, полученные при анализе образцов НМРЛ с различным генотипом. Образцы А, Б, Г выделены из свежемороженых биопсий, образец В — из биопсии, фиксированной в парафиновом блоке.

А. Образец ДНК, не содержащий исследуемых мутаций (Wt). **Б.** Образец ДНК, содержащий мутацию 2235—2249del (E746—A750del) в 19-м экзоне. **В.** Образец ДНК, содержащий мутацию Gly719Ala. **Г.** Образец ДНК, содержащий мутацию Leu858Arg.

обнаружены только у пациентов с аденокарциномой, в 13 (32%) случаях из 41. В 7 аденокарциномах выявлена миссенс-мутация Leu858Arg в 21-м экзоне. У 5 больных обнаружены делеции в 19-м экзоне, преимущественно E746-A750del. Причем в одном образце присутствовала делеция E746-A750, одновременно выявленная при гибридизации

на биочипе двумя пробами: 2235—2249 del и 2236—2250 del. Кроме того, в одном образце обнаружена делеция 2240—2257del (L747—P753del insS). У одного пациента обнаружена редкая мутация Gly719Ala в 18-м экзоне.

При анализе мутаций секвенированием в тех же препаратах ДНК из парафиновых срезов мутации вы-

явлены в аденокарциномах у 16 (38%) пациентов из 41. Таким образом, результаты генотипирования двумя различными методами совпали в 43 (93,5%) случаях из 46. В 3 случаях мутации в гене *EGFR* выявлены секвенированием, но не обнаружены с помощью биочипов. В 2 случаях это были делеции в 19-м экзоне (E746—T751del и E746—K754del), которые не могут быть выявлены с помощью гибридизации на биочипе, т. к. олигонуклеотиды, комплементарные им, на биочипе не присутствуют. В одном образце только секвенированием обнаружена замена Leu858Arg. Стоит отметить, что в 2 случаях секвенирования ДНК со срезов мутации в 21-м экзоне вызывали сомнение, но подтвердились при анализе этой же ДНК на биочипах.

Очевидно, что различия по частоте мутаций в аденокарциномах в 1-й (15%) и во 2-й (38%) группах обусловлены составом пациентов: 1-я группа представляла собой рандомизированную выборку больных, прооперированных в ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН в 2007—2010 гг., тогда как во 2-ю группу вошли больные НМРЛ,

которые получали ранее химиотерапию и которым анализ мутаций был необходим при назначении таргетной терапии.

Суммируя результаты генотипирования, заключаем, что всего у пациентов с аденокарциномой легкого мутации в гене *EGFR* были обнаружены в 23 случаях (21%) из 109. Точечные замены Leu858Arg и делеции в 19-м экзоне встречались с равной частотой — в 11 случаях (48%) из 23, мутация Gly719Ala присутствовала только в одном (4%) образце. Наиболее частой была делеция 2235—2249 del (E746—A750del). В одном образце присутствовала делеция E746—A750, одновременно выявленная на биочипе двумя пробами 2235—2249 del и 2236—2250 del. В одном случае обнаружена делеция 2240—2254 del (L747—T751del) и еще в одном — 2240—2257del (L747—P753del insS).

Анализ мутационного статуса гена *EGFR* у пациентов с аденокарциномой в зависимости от пола показал, что мутации чаще встречаются у женщин — 15 (34%) из 44 (у мужчин — 8 (12%) из 65) ($p = 0,0085$). В опухолевых об-

Таблица 2

Результаты генотипирования образцов НМРЛ методом гибридизации на биологическом микрочипе^a

Гистологический тип НМРЛ	Образцы НМРЛ свежемороженые ткани (n = 81)		Образцы НМРЛ парафиновые срезы (n = 46)		Образцы НМРЛ (n = 123) ^b
	мутации <i>EGFR</i>	число случаев	мутации <i>EGFR</i>	число случаев	Мутации, всего
Плоскоклеточный рак (n = 14)	0	0/9 (0)	0	0/5 (0)	0/14 (0)
Аденокарцинома (n = 109, 113 образцов ДНК) ^b	11	11/72 (15)	13	13/41 (32)	23/109 (21)
	Делеции в 19-м экзоне	6/11 (55)	Делеции в 19-м экзоне	5/13 (38)	11/23 (48)
	2235—2249 del (E746—A750del)	5	2235—2249 del (E746—A750del)	4 ^c	9 ^c
	2240—2254 del (L747—T751del)	2		—	1
	—	—	2236—2250 del (E746—A750del)	1 ^c	1 ^c
	—	—	2240—2257 del (L747—P753del insS)	1	1
	Leu858Arg в 21-м экзоне	5/11 (45)	Leu858Arg в 21-м экзоне	7/13 (54)	11/23 (48)
	—	—	Gly719Ala в 18-м экзоне	1/13 (8)	1/23 (4)

^a В скобках указаны проценты.

^b Всего исследовано 127 образцов ДНК от 123 больных, для 4 аденокарцином исследована ДНК свежемороженой опухоли и из среза. При этом в одной аденокарциноме мутация Leu858Arg выявлена в обоих препаратах ДНК.

^c В одном образце присутствовала делеция E746—A750, одновременно выявленная при гибридизации на биочипе двумя пробами: 2235—2249 del и 2236—2250 del.

разцах 14 пациентов с диагнозом плоскоклеточный рак легкого мутации не обнаружены.

Таким образом, при анализе на биочипах мутаций гена *EGFR* в опухолевой ДНК 123 больных НМРЛ получены результаты, подтверждающие данные литературы: мутации выявлены в 21% случаев аденокарцином легкого, при этом чаще у женщин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование посвящено разработке высокочувствительного метода скрининга образцов опухолевой ДНК на наличие соматических мутаций гена *EGFR*.

В настоящее время в крупных клиниках России при назначении противоопухолевой терапии уже используется определение мутационного статуса гена *EGFR* [24; 25]. Существует широкий спектр молекулярно-генетических методов, позволяющих выявлять мутантные последовательности в присутствии большого количества последовательностей «дикого» типа. Однако наибольшее распространение в клинической диагностике получили секвенирование, иногда сопряженное с предварительным обогащением ПЦР-продукта мутантной последовательностью, и аллель-специфичная ПЦР в реальном времени. Эти методы обладают высокой достоверностью, но достаточно трудоемки, так как обуславливают необходимость постановки отдельной реакции для каждой анализируемой мутации. Секвенирование без предварительного обогащения мутантной последовательностью обладает еще и низкой аналитической чувствительностью, позволяя определять не менее 10% мутантной ДНК на фоне ДНК «дикого» типа.

Разработанный нами метод генотипирования мутаций в гене *EGFR* с использованием LNA-блокирующей ПЦР и гибридизации на биологическом гидрогелевом микрочипе не имеет перечисленных выше недостатков. Мультиплексная ПЦР проходит в одной пробирке, при этом биочип позволяет одновременно выявлять 13 различных мутаций в гене *EGFR*. Для анализа с помощью биочипов используется недорогое детектирующее устройство — портативный анализатор биочипов (ООО «Биочип-ИМБ», Россия). Разработанный метод обладает высокой аналитической чувствительностью, позволяя выявлять мутации при низком содержании в образце мутантной ДНК. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что разработанная методика анализа мутаций не уступает по достоверности секвенированию препаратов ДНК, полученных из парафиновых срезов при обогащении их опухолевыми клетками с помощью микродиссекции. Последний метод широко используется в ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН. Стоит также отметить, что при анализе с помощью биочипа с одинаковой эффективностью может быть использована ДНК, выделенная как из свежемороженой ткани, так и из ткани, фиксированной в парафиновых блоках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Новая диагностическая тест-система на основе гидрогелевых биочипов для одновременного определения 13 вариантов мутаций в 3 экзонах гена *EGFR* позволяет проводить анализ быстро и с высокой достоверностью. Поскольку в настоящее время при назначении ряда про-

тивоопухолевых препаратов онкологам необходимо проведение молекулярно-генетического анализа гена *EGFR*, разработанный биочип может быть рекомендован для широкого использования в целях клинической диагностики в системе практического здравоохранения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы Минобрнауки (ГК № 16.512.11.2238) и гранта РФФИ 11-04-12097.

ЛИТЕРАТУРА

1. Erlotinib in non-small cell lung cancer treatment: current status and future development / Gridelli C., Bareschino M. A., Schettino C., Rossi A., Maione P., Ciardiello F. // *Oncologist*. — 2007. — Vol. 12, N 7. — P. 840—849.
2. Ciardiello F., Tortora G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment // *N. Engl. J. Med.* — 2008. — Vol. 358. — P. 1160—1174.
3. Clinicopathologic Significance of the Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer / Tomizawa Y., Iijima H., Sunaga N., Sato K., Takise A., Otani Y., Tanaka S., Suga T., Saito R., Ishizuka T., Dobashi K., Minna J. D., Nakajima T., Mori M. // *Clin. Cancer Res.* — 2005. — Vol. 11. — P. 6816—6822.
4. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy / Paez J. G., Janne P. A., Lee J. C., Tracy S., Greulich H., Gabriel S., Herman P., Kaye F. J., Lindeman N., Boggon T. J., Naoki K., Sasaki H., Fujii Y., Eck M. J., Sellers W. R., Johnson B. E., Meyerson M. // *Science*. — 2004. — Vol. 304. — P. 1497—1500.
5. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib / Lynch T. J., Bell D. W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R. A., Brannigan B. W., Harris P. L., Haserlat S. M., Supko J. G., Haluska F. G., Louis D. N., Christiani D. C., Settleman J., Haber D. A. // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 350. — P. 2129—2139.
6. Pao W., Miller V., Zakowski M. F. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from «never smokers» and correlate with sensitivity of tumors to gefitinib (Iressa) and erlotinib (Tarceva) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2004. — Vol. 101. — P. 13 306—13 311.
7. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways / Sordella R., Bell D. W., Haber D. A., Settleman J. // *Science*. — 2004. — Vol. 305. — P. 1163—1167.
8. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence / Mitsudomi T., Kosaka T., Endoh H., Horio Y., Hida T., Mori S., Hatooka S., Shinoda M., Takahashi T., Yatabe Y. // *J. Clin. Oncol.* — 2005. — Vol. 23. — P. 2513—2520.
9. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer / Takano T., Ohe Y., Sakamoto H., Tsuta K., Matsuno Y., Tateishi U., Yamamoto S., Nokihiro H., Yamamoto N., Sekine I., Kunitoh H., Shibata T., Sakiyama T., Yoshida T., Tamura T. // *J. Clin. Oncol.* — 2005. — Vol. 23. — P. 6829—6837.
10. Prospective phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations / Inoue A., Suzuki T., Fukuhara T., Maemondo M., Kimura Y., Morikawa N., Watanabe H., Saijo Y., Nukiwa T. // *J. Clin. Oncol.* — 2006. — Vol. 24. — P. 3340—3346.
11. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib / Riely G. J., Pao W., Pham D., Rizvi N., Venkatraman E. S., Zakowski M. F., Kris M. G., Ladanyi M., Miller V. A. // *Clin. Cancer Res.* — 2006. — Vol. 12. — P. 839—844.
12. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib / Jackman D. M., Yeap B. Y., Sequist L. V., Lindeman N., Holmes A. J., Joshi V. A., Bell D. W., Huberman M. S., Halmos B., Rabin M. S., Haber D. A., Lynch T. J., Meyerson M., Johnson B. E., Janne P. A. // *Clin. Cancer Res.* — 2006. — Vol. 12. — P. 3908—3914.
13. Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 and K-ras genes in patients with colorectal cancer / Iinuma H., Okinaka K.,

Adachi M., Suda K., Sekine T., Sakagawa K., Baba Y., Tamura J., Kumagai H., Ida A. // *Int. J. Cancer*. — 2000. — Vol. 89. — P. 337—344.

14. A simple method of detecting K-ras point mutations in stool samples for colorectal cancer screening using one-step polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism analysis / Nishikawa T., Maemura K., Hirata I., Matsuse R., Morikawa H., Toshina K., Murano M., Hashimoto K., Nakagawa Y., Saitoh O., Uchida K., Katsu K. // *Clin. Chim. Acta*. — 2002. — Vol. 318. — P. 107—112.

15. Milbury C. A., Li J., Makrigiorgos G. M. PCR-based methods for the enrichment of minority alleles and mutations // *Clin. Chem*. — 2009. — Vol. 55. — P. 632—640.

16. Detection of tumor mutations in the presence of excess amounts of normal DNA / Sun X., Hung K., Wu L., Sidransky D., Guo B. // *Nat. Biotechnol.* — 2002. — Vol. 20. — P. 186—189.

17. LNA clamped PCR: A specific method for detection of Ki-ras gene mutations in patients with sporadic colorectal carcinomas / Beranek M., Jandik P., Sacha M., Rajman M., Sakra L., Stumr F., Soudkova E., Zivny P., Havlicek K. // *Klin Biochem. Metab.* — 2006. — Vol. 14. — P. 217—220.

18. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition / Sanjay K., Singh S. K., Nielsen P., Koshkin A. A., Wengel J. // *Chem. Commun.* — 1998. — Vol. 4. — P. 455—456.

19. Гагарин И. М. Молекулярные маркеры эффективности ингибиторов EGFR при немелкоклеточном раке легкого и колоректальном раке: Автореф. дис... канд. мед. наук. — М., 2011. — 34 с.

20. Ke S.-H., Madison E.L. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube «megaprimer» PCR method // *Nucleic Acids Res.* — 1997. — Vol. 25, N 16. — P. 3371—3372.

21. Detection of rare mutant K-ras DNA in a single-tube reaction using peptide nucleic acid as both PCR clamp and sensor probe / Luo J.-D., Chan E.-C., Shih C.-L., Chen T.-L., Ying Liang Y., Hwang T.-L., Chiou C.-C. // *Nucleic Acids Res.* — 2006. — Vol. 34, N 2. — P. 12.

22. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production / Rubina A. Y., Pan'kov S. V., Dementieva E. I., Pen'kov D. N., Butygin A. V., Vasiliskov V. A., Chudinov A. V., Mikheikin A. L., Mikhailovich V. M., Mirzabekov A. D. // *Anal. Biochem.* — 2004. — Vol. 325. — P. 92—106.

23. Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации / Глотов А. С., Наседкина Т. В., Иващенко Т. Э., Юрасов Р. А., Суржиков С. А., Паньков С. В., Чудинов А. В., Баранов В. С., Заседателев А. С. // *Мол. биол.* — 2005. — № 39. — С. 403—412.

24. Применение Ирессы (гефитиниба) в качестве терапии первой линии для лечения неоперабельных аденокарцином легкого, содержащих мутацию в гене EGFR / Моисеенко В. М., Проценко С. А., Семенов И. И., Моисеенко Ф. В., Левченко Е. В., Мацко Д. Е., Иванцов А. О., Иевлева А. Г., Митюшкина Н. В., Того А. В., Имянитов Е. Н. // *Современ. онкол.* — 2010. — Т. 12, № 1. — С. 60—66.

25. Эффективность ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) у больных распространенным немелкоклеточным раком легкого / Коломейцева А. А., Гагарин И. М., Мочальникова В. В., Мазуренко Н. Н., Горбунова В. А. // *Вестн. РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН*. — 2011. — Т. 22, № 1. — С. 42—49.

Поступила 21.09.2012

*Marina Alexandrovna Emelyanova¹, Natalia Nikolayevna Mazurenko²,
Ilya Mikhailovich Gagarin³, Irina Victorovna Tsyganova⁴,
Irina Borisovna Zborovskaya⁵, Ksenia Anatolievna Arkhipova⁶,
Valeria Vasilievna Mochalnikova⁷, Lyudmila Nikolayevna Lyubchenko⁸,
Tatiana Vasilievna Nasedkina⁹*

EGFR MUTATION DETECTION USING BIOLOGICAL MICROCHIPS IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

¹ MD, Junior Researcher, Biological Microchip Laboratory, V. A. Engelgardt Molecular Biology Institute, RAS (32, ul. Vavilova, Moscow, RF, 119991)

² MSc, PhD, DSc, Professor, Head, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

³ MD, PhD, Laboratory Researcher, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁴ MSc, PhD, Researcher, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁵ MSc, PhD, Head, Cellular and Viral Oncogene Regulation Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁶ MSc, PhD, Researcher, Cellular and Viral Oncogene Regulation Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁷ MD, Pathologist, Pathological Anatomy Department, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁸ MD, PhD, DSc, Head, Clinical Oncogenetics Laboratory, Clinical Oncology Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁹ MSc, PhD, DSc, Senior Researcher, Biological Microchip Laboratory, V. A. Engelgardt Molecular Biology Institute, RAS (32, ul. Vavilova, Moscow, RF, 119991)

Address for correspondence: Mazurenko Natalia Nikolayevna, Oncogenomics Laboratory, Carcinogenesis Research Institute, N. N. Blokhin RCRC, RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478; e-mail: nnmazurenko@mail.ru

EGFR somatic mutations predict sensitivity to targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors, gefitinib (Iressa) and erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. We have developed a method able to detect 13 most common EGFR mutations including 9 deletions in exon 19 and point mutations in exons 21 (Leu858Arg) and 18 (Gly719Cys, Gly719Ala, Gly719Ser). Wild-type sequence amplification was inhibited using LNA oligonucleotides during polymerase chain reaction to increase test sensitivity and to detect minor tumor cell fractions in clinical specimens. Product of the LNA blocking polymerase chain reaction was hybridized with oligonucleotide probes immobilized in gel on biochip surface. The biochip was tested on 127 DNA samples from patients with non-small cell lung cancer, mainly adenocarcinoma. Sequencing of polymerase chain reaction products was used as reference. The developed biochip test can reliably detect EGFR mutations irrespective of DNA sampling procedure even in small fractions of mutation-carrying cells.

Key words: somatic mutations, lung cancer, EGFR, biochip, diagnosis.

Александр Федорович Лазарев¹, Динара Кумаровна Кенбаева²,
Зухра Алпысбаевна Манамбаева³

КЛЕТОЧНЫЙ ИММУНИТЕТ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ В ПРОЦЕССЕ ИММУНОТЕРАПИИ

¹ Профессор, д. м. н., директор, Алтайский филиал РОНЦ им. Н. Н. Блохина
(656000, РФ, г. Барнаул, ул. Никитина, д. 77)

² К. м. н., заведующая, отделение гинекологии, Городской онкологический диспансер г. Астана
(010000, Республика Казахстан, г. Астана, ул. Махтумкули, д. 3)

³ Профессор, д. м. н., заведующая, кафедра онкологии, Государственный медицинский университет г. Семей
(014700, Республика Казахстан, г. Семей, ул. Абая Кунанбаева, д. 103)

Адрес для переписки: 010000, Республика Казахстан, г. Астана, ул. Махтумкули, д. 3,
Городской онкологический диспансер г. Астана, отделение гинекологии,
Кенбаева Динара Кумаровна, e-mail: dikenb@mail.ru

Для определения особенностей содержания иммунокомпетентных клеток в крови и ткани опухоли у больных раком шейки матки, подвергавшихся иммунотерапии, обследованы 37 больных раком шейки матки III клинической стадии. Женщины были распределены на 2 группы: сочетанной лучевой терапии и ее комбинации с иммунотерапией, осуществляемой путем реинфузии активированных *in vitro* аутолимфоцитов в сочетании с препаратом рекомбинантного интерлейкина-2 и Флогэнзимом. Исследовано содержание лимфоцитов некоторых кластеров дифференцировки в крови и биоптатах опухоли в динамике лечения. В результате лечения в группе применения иммунотерапии выявлено статистически значимое повышение содержания лимфоцитов и их субпопуляций в крови и ткани опухоли. В наибольшей степени было выражено повышение количества лимфоцитов цитотоксического действия, что, по нашему мнению, отражает активацию противоопухолевых иммунных механизмов.

Ключевые слова: рак шейки матки, иммунотерапия, клеточный иммунитет, интерлейкин-2, системная энзимотерапия.

Иммунотерапия злокачественных новообразований все чаще применяется и становится стандартным методом лечения больных, особенно в экономически развитых странах мира. За несколько десятилетий своего существования она прошла путь от первых экспериментов до включения в число основных и наиболее эффективных способов лечения таких опухолей, как рак почек, легких, яичников, мочевого пузыря [1; 2].

Продолжаются исследования, направленные на создание методов иммунотерапии злокачественных новообразований других локализаций и совершенствование имеющихся подходов с доказанной клинической эффективностью.

Существует обширный спектр методов иммунотерапии опухолей, включающий применение вакцин, сывороток, способов стимуляции клеточного иммунитета как *in vivo*, так и *in vitro*, неспецифические воздействия (иммуностимуляция, иммуномодуляция, иммунокоррекция) на различных уровнях регуляции и эффекторного действия иммунитета [3].

Наиболее разработанным и эффективным направлением до настоящего времени считается вакциноотерапия, чаще всего применяемая при новообразованиях соматических органов. На втором месте находятся методы клеточной иммунотерапии (TIL-терапия, LAK-терапия). В последние годы работы в этой области часто направлены на лечение новообразований, не поддающихся иммунотерапии существующими способами [4; 5].

Проблема иммунотерапии опухолей шейки матки до настоящего времени остается нерешенной. В то же время нет оснований считать данную локализацию не иммуногенной и не подлежащей лечению с применением соответствующих методов. Потенциальной причиной практического отсутствия разработок в области иммунотерапии рака шейки матки (РШМ) представляется преимущественный интерес исследователей к другим аспектам иммунопатогенеза данной опухоли, а именно — ее профилактике за счет вакцинации и лечения вирусных инфекций [6; 7].

Цель исследования — определение особенностей содержания иммунокомпетентных клеток в крови и ткани опухоли у больных РШМ, подвергавшихся иммунотерапии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В рамках клинико-иммунологического исследования обследованы 37 больных РШМ III клинической стадии (T1—2N1M0, T3N0—1M0), подвергшихся противоопухолевой терапии (сочетанной лучевой терапии — СЛТ). Все больные были в возрасте от 30 до 70 лет.

Критерии включения: злокачественное образование шейки матки; возраст (30—70 лет); информированное согласие на участие в исследовании, проведение исследований и дополнительных методов лечения.

Критерии исключения: отказ от участия в исследовании на любом этапе; неполнота обследования; злокачественные новообразования других локализаций, выявленные в ходе исследования; соматические заболевания, хронические инфекционные заболевания либо системные заболевания соединительной ткани.

Дистанционную гамма-терапию в статическом или подвижном режиме проводили на область первичной опухоли и зоны возможного параметрального и лимфогенного распространения опухоли, чередуя с сеансами внутримолостной гамма-терапии. Суммарная очаговая доза в точке В от дистанционного облучения составила 40 Гр. Внутримолостное облучение осуществляли методом введения метроксипостатов и радиоактивных источников низкой активности до суммарной очаговой дозы 50—60 Гр в точке А или источников высокой активности (последовательное автоматизированное введение на аппарате «Агат-В» с фракционированием по 5 Гр; всего 10 сеансов).

Все больные были распределены на 2 группы в зависимости от проводимой терапии. В 1-ю группу (основную, или группу иммунотерапии) включены пациентки, получавшие только СЛТ, во 2-ю группу (сравнения) — получавшие СЛТ в сочетании со специфической иммунотерапией (СИТ). Методика СИТ включает инкубацию аутолимфоцитов с опухолевыми антигенами и стимулятором роста Т-лимфоцитов и хелперным фактором для киллеров (интерлейкин-2). Кроме того, применяли адоптивную иммунотерапию (АИТ), заключающуюся в курсе системной энзимотерапии (Флогэнзим, 3 таблетки 3 раза в день в течение 4 нед) в сочетании с препаратом интерлейкина-2, 200 000—250 000 МЕ/кг через 2 сут внутривенно капельно в течение 4 нед. Иммунотерапию начинали одновременно с лучевым лечением.

В крови и предварительно подготовленной взвеси биоптата опухоли определяли число общих Т-лимфоцитов и в зависимости от кластеров дифференцировки методом иммуноферментного анализа на проточном цитометре «Beckman Coulter».

Определяли следующие кластеры лимфоцитов:

- CD3+ — зрелые Т-лимфоциты («Beckman Coulter», № A07746);
- CD3+CD4+ — Т-хелперы («Beckman Coulter», № A07750);
- CD3-CD56+CD16+ — натуральные киллеры («Beckman Coulter», № A07735);
- CD3+CD56+CD16+ — НКТ-клетки («Beckman Coulter», № A07415);
- CD3+CD25+ — активированные Т-лимфоциты на ранней стадии активации («Beckman Coulter», № IM3486U);

- CD95+ — преапоптотические активированные лейкоциты всех кластеров дифференцировки («Beckman Coulter», № IM1504).

По завершении АИТ (1 мес) в крови и тканях опухоли повторно исследовали содержание иммуноцитов указанных выше кластеров дифференцировки. Для решения последней задачи проводили повторную биопсию опухоли под контролем УЗИ.

При анализе клинических данных использованы параметрические и непараметрические методы. Сравнение количественных признаков проводили с помощью критерия Стьюдента, для непрерывных переменных — с использованием парного критерия Стьюдента. Ограничения применения параметрических методов включали анализ распределения по критерию Колмогорова—Смирнова, а также равенства дисперсий. При несоблюдении критериев применимости параметрических методов использован метод анализа значимости различий по критерию Манна—Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основные результаты, характеризующие содержание иммунокомпетентных клеток исследованных кластеров дифференцировки в крови обследованных больных, представлены в табл. 1.

В процессе применения обоих методов лечения зарегистрировано снижение содержания в крови общих лимфоцитов, а также клеток всех исследованных кластеров дифференцировки. Различия по абсолютному содержанию лимфоцитов были статистически значимыми только в группе сравнения, в которой иммунотерапия не проводилась. Абсолютное содержание клеток CD3+ было статистически значимо выше в группе иммунотерапии на 38,2% ($p < 0,05$), хотя процентные показатели статистически значимо не различались между группами. В несколько меньшей степени различалось абсолютное содержание клеток CD3+CD4+ (27,5%; $p < 0,05$).

Динамика содержания клеток субпопуляций киллеров в исследуемых группах была разнонаправленной. Отмечалось снижение данного показателя в группе сравнения и значимое повышение (на 87,5% по абсолютному и на 48,1% по относительному показателям) в группе иммунотерапии. В еще большей степени различалось содержание клеток CD3+CD56+CD16+ (НКТ-клетки). Абсолютное содержание этих клеток в группе иммунотерапии превышало таковое в группе сравнения в 2,5 раза, а относительное — в 2 раза ($p < 0,01$ во всех случаях).

Выявлены статистически значимое снижение абсолютного содержания и тенденция к уменьшению относительного содержания клеток CD3+CD25+ в крови у пациентов группы сравнения. Напротив, в основной группе как абсолютное, так и относительное содержание клеток данного кластера увеличивалось, причем относительное число указанных клеток было статистически значимо больше, чем в группе сравнения. Отмечено также значимое увеличение числа клеток CD95+ у больных группы сравнения на фоне лечения. В основной группе такая динамика отсутствовала.

Однако содержание Т-лимфоцитов различных кластеров дифференцировки в крови не отражает функ-

Таблица 1

Особенности показателей клеточного звена иммунитета у больных РШМ III стадии в ходе лечения

Показатель	Группа сравнения		Группа иммунотерапии	
	исходно	лечение	исходно	лечение
Лимфоциты общие, $\times 10^9/\text{л}$	$2,26 \pm 0,11$	$1,53 \pm 0,10^a$	$2,19 \pm 0,13$	$1,95 \pm 0,09^b$
CD3+, $\times 10^9/\text{л}$	$1,75 \pm 0,08$	$1,02 \pm 0,06^a$	$1,69 \pm 0,07$	$1,41 \pm 0,06^{a,b}$
CD3+, %	$77,4 \pm 3,0$	$66,7 \pm 3,4^a$	$77,1 \pm 4,0$	$72,3 \pm 2,9$
CD3+CD4+, $\times 10^9/\text{л}$	$0,97 \pm 0,06$	$0,69 \pm 0,06^a$	$0,95 \pm 0,04$	$0,88 \pm 0,05^b$
CD3+CD4+, %	$42,9 \pm 2,3$	$45,1 \pm 3,0$	$43,2 \pm 2,8$	$45,1 \pm 2,4$
CD3–CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	$0,13 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01^a$	$0,12 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01^{a,b}$
CD3–CD56+CD16+, %	$5,8 \pm 0,5$	$5,2 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,3$	$7,7 \pm 0,4^{a,b}$
CD3+CD56+CD16+, $\times 10^9/\text{л}$	$0,05 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01^{a,b}$
CD3+CD56+CD16+, %	$2,6 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$	$5,1 \pm 0,3^{a,b}$
CD3+CD25+, $\times 10^9/\text{л}$	$0,17 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01^a$	$0,16 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,01$
CD3+CD25+, %	$7,5 \pm 0,7$	$7,2 \pm 0,6$	$7,4 \pm 0,5$	$10,3 \pm 0,5^{a,b}$
CD95+, $\times 10^9/\text{л}$	$1,29 \pm 0,08$	$1,15 \pm 0,07$	$1,27 \pm 0,11$	$1,12 \pm 0,06$
CD95+, %	$57,7 \pm 3,3$	$75,4 \pm 4,3^a$	$58,5 \pm 3,9$	$57,4 \pm 3,0^b$

^a Статистически значимые различия по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,05$).^b Статистически значимые различия между группами в процессе лечения ($p < 0,05$).

циональные способности клеток в плане формирования противоопухолевого ответа.

Некоторые исследователи считают существенными содержание иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих опухоль [8], и их состав. Соответствующее исследование проведено нами в отношении лимфоцитов тех же кластеров (табл. 2).

Следует отметить, что число лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, в ходе лечения увеличивалось, однако в разной степени в зависимости от применявшихся методов терапии. Превышение над исходным показателем в группе сравнения составило 46,9% ($p < 0,05$), а в группе иммунотерапии — 163,3% ($p < 0,01$); различия между группами достигали 68,3% ($p < 0,05$). В определенной степени различался и состав лимфоцитов, выделенных из биопсийного материала РШМ. По относительному числу клеток CD3+ и лимфоцитов CD3+CD4+ существенных различий между группами не было, тогда как содержание лимфоцитов киллерных субпопуляций значительно увеличивалось только в группе иммунотерапии. Различия с исходным уровнем по относительному числу клеток CD3–CD56+CD16+ составили 40,8%, с группой сравнения — 43,6% ($p < 0,05$ в обоих случаях). Для клеток

CD3+CD56+CD16+ соответствующие относительные значения составляли 43,4 и 26,6% ($p < 0,05$).

Таким образом, увеличение числа клеток, оказывающих известный цитотоксический эффект, по сравнению с исходным уровнем было характерно только для группы, в которой применяли сочетание СИТ и АИТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные подходы к клеточной иммунотерапии злокачественных новообразований чаще всего предполагают использование полученных от больного активированных лимфокинами киллеров (ЛАК-терапия), реинфузию лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL-терапия) [9].

«Классические» формы TIL- и ЛАК-терапии, как мы полагаем, могут быть совмещены, что будет способствовать достижению большего эффекта. Так, стимуляция иммунокомпетентных клеток *in vitro* позволяет исключить подавляющее влияние на них специфической противоопухолевой терапии. Получение значительного количества клеток без хирургического вмешательства возможно только из крови. Однако представляется вполне адекватным помещением их в условия, сходные с

Таблица 2

Сравнительная характеристика содержания иммуноцитов различных кластеров дифференцировки в тканях опухоли

Показатель	Группа сравнения		Группа иммунотерапии	
	исходно	после лечения	исходно	после лечения
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	$3,2 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,3^a$	$3,0 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,4^{a,b}$
CD3+, %	$61,4 \pm 3,2$	$64,9 \pm 3,4$	$59,2 \pm 2,9$	$68,0 \pm 3,5$
CD3+CD4+, %	$43,5 \pm 2,8$	$48,2 \pm 3,0$	$42,1 \pm 2,2$	$50,3 \pm 2,5^a$
CD3–CD56+CD16+, %	$15,5 \pm 1,1$	$14,9 \pm 0,9$	$15,2 \pm 1,2$	$21,4 \pm 1,7^{a,b}$
CD3+CD56+CD16+, %	$11,7 \pm 0,7$	$12,8 \pm 0,9$	$11,3 \pm 0,6$	$16,2 \pm 1,0^{a,b}$

^a Статистически значимые различия по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,05$).^b Статистически значимые различия между группами в процессе лечения ($p < 0,05$).

теми, в которых находятся клетки, инфильтрирующие опухоль, путем добавления в среду гомогената ткани новообразования. На этом фоне стимуляция дифференцировки цитокинами является «последним штрихом», способствующим значительному потенцированию эффекта. Наличие в инкубационной среде комплекса различных иммунокомпетентных клеток крови также может способствовать повышению эффективности относительно ЛАК-терапии ввиду возможности межклеточной кооперации и взаимной стимуляции.

Доказательством активации клеточного противоопухолевого иммунитета, по нашему мнению, служит одновременное повышение содержания цитотоксических клеток в крови (вероятно, за счет стимуляции их дифференцировки в результате воздействия клеточных факторов, выработанных при инкубации *in vitro*), а в еще большей степени — значимое превышение их в структуре клеток, инфильтрирующих опухоль.

ЛИТЕРАТУРА

1. Perez C. A., Santos E. S., Racz L. E. Active immunotherapy for non-small-cell lung cancer: moving toward a reality // *Expert. Rev. Anti-cancer Ther.* — 2011. — Vol. 11, N 10. — P. 1599–1605.
2. Seremet T., Brasseur F., Coulie P. G. Tumor-specific antigens and immunologic adjuvants in cancer immunotherapy // *Cancer J.* — 2011. — Vol. 17, N 5. — P. 325–330.

3. Козлов В. К., Молчанов О. Е., Жаринов Г. М. Иммуноterapia рекомбинантными цитокинами в лечении онкологических больных // *Успехи клинической иммунологии и аллергологии. Том III* / Под ред. А. В. Караулова. — М.: Изд-во регионального отделения РАЕН, 2002. — С. 263–279.

4. Immunotherapy of prostate cancer: identification of new treatments and targets for therapy, and role of WAP domain-containing proteins / Galustian C., Vyakarnam A., Elhage O., Hickman O., Dasgupta P., Smith R. A. // *Biochem. Soc. Trans.* — 2011. — Vol. 39, N 5. — P. 1433–1436.

5. Thibodeaux S. R., Curiel T. J. Immune therapy for ovarian cancer: promise and pitfalls // *Int. Rev. Immunol.* — 2011. — Vol. 30, N 2–3. — P. 102–119.

6. Human papillomavirus vaccines: new tools for accelerating cervical cancer prevention in developing countries / Luciani S., Jauregui B., Kieny C., Andrus J. K. // *Immunotherapy.* — 2009. — Vol. 1, N 5. — P. 795–807.

7. Tay S. K. Cervical cancer in the human papillomavirus vaccination era // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* — 2012. — Vol. 24, N 1. — P. 3–7.

8. Субпопуляции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов серозной аденокарциномы яичников / Каирбаева М. Ж., Зуева Е. В., Моженкова А. В., Кокосадзе Н. В., Никогосян С. О., Тупицын Н. Н. // *Тез. докл. Академии наук.* — 2009. — Т. 429, № 1. — С. 115–119.

9. Yannelli J. R., Wroblewski J. M. On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy // *Vaccine.* — 2004. — Vol. 23, N 1. — P. 97–113.

Поступила 16.07.2012

*Alexander Fedorovich Lazarev¹, Dinara Kumarovna Kenbayeva²,
Zukhra Alpysbayevna Manambayeva³*

CELL-MEDIATED IMMUNITY IN PATIENTS WITH CERVICAL CANCER ON IMMUNOTHERAPY

¹ MD, PhD, DSc, Professor, Director, Altai Affiliation, N. N. Blokhin RCRC, RAMS
(77, ul. Nikitina, Barnaul, RF, 656000)

² MD, PhD, Head, Gynecology Department, Astana City Cancer Clinic
(3, ul. Makhmutkuli, Astana, Republic of Kazakhstan, 010000)

³ MD, PhD, DSc, Head, Oncology Chair, Semey State Medical University
(103, ul. Abaya Kunanbayeva, Semey, Republic of Kazakhstan, 014700)

Address for correspondence: Kenbayeva Dinara Kumarovna, Gynecology Department,
Astana City Cancer Clinic, 3, ul. Makhmutkuli, Astana, Republic of Kazakhstan, 010000;
e-mail: dikenb@mail.ru

A total of 37 patients with stage III cervical cancer were examined to determine specific features in contents of blood and tumor tissue immunocompetent cells in cervical cancer patients receiving immunotherapy. The females were divided into 2 groups depending on receiving radiotherapy or combined radio- and immunotherapy by reinfusion of *in vitro* activated autolymphocytes plus recombinant interleukin-2 and Flogenzyme. Changes in contents of some lymphocyte differentiation clusters in blood and tumor biopsies were studied during treatment. After treatment completion the immunotherapy group demonstrated a statistically significant increase in levels of lymphocytes and their populations in blood and tumor tissue. Increase in cytotoxic lymphocyte levels was most marked which was suggestive of activation of antitumor immunity mechanisms.

Key words: cervical cancer, immunotherapy, cellular immunity, interleukin-2, systemic enzyme therapy.

Виктор Алексеевич Уйманов¹, Михаил Иванович Нечушкин²,
Аркадий Вячеславович Триголосо³, Александр Валерьевич Петровский⁴,
Яна Владимировна Вишневская⁵, Анна Александровна Зайцева⁶

ХИРУРГИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ПАРАСТЕРНАЛЬНОГО ЛИМФОКОЛЛЕКТОРА В СОСТАВЕ ОРГАНОСОХРАНЯЮЩЕГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ К. м. н., старший научный сотрудник, отделение радиохирургии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

² Д. м. н., профессор, заведующий отделением радиохирургии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

³ К. м. н., старший научный сотрудник, отделение радиохирургии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁴ К. м. н., доцент, кафедра онкологии лечебного факультета ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (119991, РФ, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2)

⁵ К. м. н., старший научный сотрудник, отделение патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН (115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24)

⁶ Аспирант, кафедра онкологии лечебного факультета ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова (119991, РФ, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2)

Адрес для переписки: 115478, РФ, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24,
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН, отделение радиохирургии,
Уйманов Виктор Алексеевич; e-mail: v.uimanov@mail.ru

Цель исследования: сравнение диагностических возможностей видеоторакоскопической парастеральной лимфаденэктомии и открытой биопсии лимфатических узлов в выявлении метастатического поражения парастерального лимфоколлектора, а также частоты развития осложнений при использовании указанных методик. Данные для анализа представляют собой результаты наблюдения за 884 пациентками с клиническим диагнозом рака молочной железы I—III стадий, получавшими органосохраняющее лечение на базе отделения радиохирургии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН с 1990 по 2005 г. Из 884 больных открытая биопсия парастеральных лимфатических узлов на стороне поражения выполнена у 125 женщин, видеоторакоскопическая парастеральная лимфаденэктомия — у 759. По данным логистического регрессионного анализа шансы выявления метастазов в парастеральном лимфоколлекторе при выполнении видеоторакоскопической парастеральной лимфаденэктомии в 2,6 раза выше, чем при открытой биопсии ($p = 0,018$). Частота развития осложнений биопсии составила 1,6%, видеоторакоскопической парастеральной лимфаденэктомии — 1,2% ($p = 0,1$). По сравнению с биопсией видеоторакоскопическая парастеральная лимфаденэктомия является хирургическим вмешательством выбора, представляющим более объективную информацию о состоянии рассматриваемого лимфоколлектора и характеризующимся низкой частотой развития осложнений.

Ключевые слова: рак молочной железы, видеоторакоскопия, парастеральная лимфаденэктомия.

Согласно классическим представлениям парастеральные лимфатические узлы являются одним из важнейших барьеров на пути оттока лимфы из ткани молочной железы, особенно из ее медиальных и центральных отделов. К общепринятым неблагоприятным прогностическим факторам метастатического поражения этого

коллектора относятся упомянутая локализация первичной опухоли, поражение лимфатических узлов подмышечной области. Метастазы в парастеральном лимфоколлекторе выявляются при наружной локализации у 4—6% пациенток без метастазов и у 22—48% пациенток с метастазами в лимфатических узлах подмышечной области, а при внутренней и центральной локализациях — у 8—20% и у 29—65% соответственно [1—5]. Некоторые исследователи относят к неблагоприятным факторам лимфоваскулярную опухолевую инвазию ткани молочной

железы и степень злокачественности первичной опухоли [5; 6].

Известные неинвазивные методы исследования парастеральных лимфоузлов (ультразвуковое исследование, непрямая лимфосцинтиграфия, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, позитронно-эмиссионная томография) малоинформативны ввиду труднодоступности этой зоны и недостаточно разработанной семиотики поражения. В целом чувствительность и специфичность современных методов диагностики не превышают 95 и 85% соответственно. Даже комплекс диагностических мероприятий не позволяет достичь стопроцентной идентификации поражения загрудных лимфатических узлов. Кроме того, дороговизна аппаратуры не позволяет использовать многие из этих процедур в качестве скрининговых методов [7].

В последние годы все большее распространение приобретает методика биопсии «сторожевых» лимфатических узлов в парастеральном лимфоколлекторе [8—12]. Чувствительность, специфичность и точность биопсии «сторожевого» лимфатического узла после лимфосцинтиграфии с интраоперационной локализацией гамма-датчиком составляют 92,9, 100 и 97,4% соответственно [8]. В то же время при опухолях молочной железы T1 частота ложноотрицательных результатов и точность составляют 6 и 98%, в то время как при опухолях T2 — 24 и 86% соответственно [13].

Открытая биопсия «сторожевого» парастерального лимфатического узла дает такие осложнения, как вторичный пневмоторакс, кровотечение, размождение реберного хряща, а также образование дополнительного рубца в случае радикальной резекции молочной железы при опухоли наружных локализаций [14].

В 1996 г. Е. И. Сигал и соавт. впервые представили видеоторакоскопическую парастеральную лимфаденэктомию (ВТПЛ) как результат симбиоза идеи о необходимости достоверной диагностики поражения и санации этой регионарной зоны с широким развитием и внедрением эндоскопического операционного оборудования в онкологическую практику [15].

Данная методика получила дальнейшее развитие в условиях ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН и зарекомендовала себя как малотравматичное вмешательство, позволяющее удалить все парастеральные лимфатические узлы на протяжении первых четырех межреберий и не ухудшающее косметический результат [5]. О незначительном опыте использования этой операции сообщают и ряд других отечественных и зарубежных исследователей [16—18].

В статье рассмотрены вопросы диагностических возможностей ВТПЛ и открытой биопсии лимфатических узлов в выявлении метастатического поражения парастерального лимфоколлектора, а также уровня интраоперационных и послеоперационных осложнений при использовании данных вмешательств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные для анализа представляют собой результаты наблюдения за 884 пациентками, получавшими органосохраняющее лечение на базе отделения радиохирургии ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» РАМН с 1990 по 2005 г.

Из 884 больных открытая биопсия парастеральных лимфатических узлов на стороне поражения была выполнена у 125, ВТПЛ — у 759.

Всем пациенткам, включенным в исследование, был выставлен клинический диагноз рака молочной железы I—IIb стадий (по TNM классификации злокачественных опухолей Международного противоракового союза VII редакции от 2009 г.) и проведено комбинированное или комплексное органосохраняющее лечение.

Биопсию выполняли только в группе больных с внутренними или пограничными с внутренними локализациями первичной опухоли, что позволяло использовать доступ из раны молочной железы и не производить дополнительные разрезы кожи. При этом исследовали от 1 до 5 лимфатических узлов с первого по третье межреберья, которые наиболее пригодны для этой операции ввиду их достаточной ширины, или даже одного из них, если существовали технические трудности для выполнения этой процедуры (при наличии узких межреберных промежутков).

Использование эндоскопической техники позволило применять ВТПЛ при любой локализации первичной опухоли, при этом удалению подлежал моноблочный препарат, представляющий собой парастеральные лимфатические узлы первого — четвертого межреберий в фасциальном футляре вокруг сосудистого пучка.

Анализ данных проводили с использованием программы SPSS 13.0, критический уровень статистической значимости принимали равным 0,05. Для оценки шансов метастазирования в парастеральные лимфатические узлы в зависимости от клинических, патологоанатомических факторов, а также от характера хирургического вмешательства на парастеральном коллекторе проведен мультифакторный логистический регрессионный анализ. В подгруппе прогностического фактора с предполагаемым наиболее благоприятным прогнозом, известным из литературы или предварительного сравнительного анализа, шансы метастазирования в парастеральные лимфатические узлы принимали за референсное значение (реф., т. е. единица). По отношению к нему определяли шансы метастазирования в другой подгруппе данного прогностического фактора, что и составляет отношение шансов. Оценены отношения шансов метастазирования между подгруппами каждого фактора с их 95% доверительным интервалом (ДИ) и уровень статистической значимости (p).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В модель включены как известные, так и предполагаемые нами прогностические факторы:

- локализация первичной опухоли;
- количество пораженных подмышечных лимфатических узлов. Соответственно классификации злокачественных опухолей Международного противоракового союза VI издания от 2002 г. мы разделили пациенток на 3 подгруппы: без поражения, с поражением от 1 до 3 лимфатических узлов, с поражением 4 лимфатических узлов и более;
- возраст пациенток (моложе 35 лет; 35 лет и старше);
- патологоанатомический критерий первичной опухоли рТ;

- сосудистая опухолевая инвазия ткани молочной железы;
- объем хирургического вмешательства на парастеральных лимфатических узлах, биопсия или ВТПЛ.

Значение p для модели логистического регрессионного анализа (см. таблицу) составило менее 0,001.

Результаты анализа (см. таблицу) подтверждают данные литературы о том, что статистически значимыми факторами, влияющими на частоту метастазирования в парастеральный лимфатический коллектор, являются следующие.

1. Локализация первичной опухоли в целом ($p < 0,001$). Частота метастазирования при наружной локализации — 7,5%, при внутренней — 16,0%, при локализации на границе верхних квадрантов — 19,4%, на границе нижних квадрантов — 22,2%, в центральных отделах — 12,1%. По сравнению с локализацией в наружных квадрантах шансы метастазирования повышаются при локализации во внутренних квадрантах в 7 раз ($p < 0,001$), при локализации на границе верхних квадрантов — в 3,9 раза ($p < 0,001$), при локализации на границе нижних квадрантов — в 5,3 раза ($p < 0,001$). Повышение шансов метаста-

Таблица
Результаты логистического регрессионного анализа по выявлению метастазов в парастеральных лимфатических узлах в зависимости от изучаемых прогностических факторов

Фактор	Подгруппа	Число больных		Число метастазов, %	Реф.	ОШ	95% ДИ	p
		всего	с метастазами					
Возраст, годы	≥ 35	824	97	11,8	Реф.	–	–	–
	< 35	60	9	15	–	1,2	0,5–2,7	0,756
Локализация первичной опухоли	Статистическая значимость влияния фактора в целом							< 0,001
	Наружная	401	30	7,5	Реф.	–	–	–
	Внутренняя	243	39	16	–	7,0	3,7–13,0	< 0,001
	Граница верхних квадрантов	162	23	19,4	–	3,9	2,1–7,5	< 0,001
	Граница нижних квадрантов	45	10	22,2	–	5,3	2,2–13,0	< 0,001
	Центр	33	4	12,1	–	2,1	0,6–7,3	0,239
Критерий pT	T1	513	47	9,2	Реф.	–	–	–
	T2	371	59	15,9	–	1,4	0,9–2,2	0,152
Число подмышечных лимфатических узлов с метастазами	Статистическая значимость влияния фактора в целом							< 0,001
	0	505	27	5,3	Реф.	–	–	–
	1–3	258	41	15,9	–	3,3	1,8–5,8	< 0,001
	≥ 4	121	38	31,4	–	8,7	4,5–17,0	< 0,001
Сосудистая опухолевая инвазия	Нет	609	41	6,7	Реф.	–	–	–
	Есть	275	65	31	–	2,7	1,7–4,3	< 0,001
Объем операции	Биопсия	125	9	7,2	Реф.	–	–	–
	ВТПЛ	759	97	12,8	–	2,6	1,2–5,9	0,018

зирования в 2,1 раза при центральной локализации статистически незначимо ($p = 0,239$); причиной, вероятнее всего, служит небольшое число пациенток в подгруппе центральной локализации.

2. Число метастатически пораженных подмышечных лимфатических узлов в целом ($p < 0,001$). Частота метастазирования в парастеральные лимфатические узлы на стороне пораженной молочной железы в отсутствие метастазов в подмышечных лимфатических узлах составляет 5,3%, при поражении до 3 подмышечных лимфатических узлов — 15,9%, при поражении 4 лимфатических узлов и более — 31,4%. По сравнению с отсутствием метастазов в подмышечном лимфоколлекторе шансы метастазирования в парастеральный лимфоколлектор повышаются при метастатическом поражении от 1 до 3 лимфатических узлов в 3,3 раза ($p < 0,001$), при метастазах в 4 лимфатических узлах и более — в 8,7 раза ($p < 0,001$).

3. Наличие опухолевой инвазии молочной железы с увеличением шансов метастазирования по сравнению с отсутствием опухолевой инвазии в 2,7 раза ($p < 0,001$). Частота метастазирования в отсутствие инвазии — 6,7%, при наличии инвазии — 31%.

Возраст пациенток, размер первичной опухоли статистически значимо не влияли на частоту метастазирования в парастеральные лимфатические узлы.

Объем хирургического вмешательства на парастеральном коллекторе явился статистически значимым фактором ($p = 0,018$). Шансы выявления метастазов в парастеральном лимфоколлекторе при выполнении ВТПЛ в 2,6 раза выше, чем при открытой биопсии. Разумеется, это обусловлено качеством забора материала (полный визуальный контроль) и большим объемом удаляемого для исследования препарата.

Можно предположить, что диагностическая ценность биопсии недостаточна для того, чтобы на основании ее делать вывод об отсутствии метастазов в парастеральных лимфатических узлах. В нашем исследовании биопсия парастеральных узлов проводилась без использования радионуклидной трассировки и маркировки красителем, что, возможно, снижает и без того недостаточную диагностическую ценность метода. Однако зарубежные исследователи, использующие эти вспомогательные способы визуализации, также говорят о недостаточной эффективности биопсии парастеральных лимфатических узлов. Эти исследователи сообщают об особенностях радионуклидной разметки опухолей медиальной локализации, которая заключается в наложении фонового излучения от первичного очага, что затрудняет использование интраоперационного гамма-датчика в парастеральном коллекторе [8; 13].

Клинически значимые интраоперационные осложнения биопсии отмечены у 2 (1,6%) пациенток из 125. В одном случае для остановки кровотечения из внутренней грудной артерии потребовалась резекция ребра для ее выделения и лигирования, в другом для ликвидации пневмоторакса в результате интраоперационного дефекта плевры установлен дренаж плевральной полости в течение 4 сут послеоперационного периода. Послеоперационные осложнения не отмечены.

Общая частота развития осложнений ВТПЛ составила 1,2% (у 9 пациенток из 759), интраоперационные ос-

ложения возникли в 0,4% случаев (у 3 из 759), послеоперационные — в 0,8% (у 6 из 759). Интраоперационные осложнения представляли собой микротравму восходящего отдела аорты, травму легкого, кровотечение из внутренних грудных сосудов. В первом случае выполнены экстренная торакотомия и ушивание травматического отверстия аорты. Во втором случае произведена эндоскопическая краевая резекция участка легкого с помощью ушивающего аппарата EndoGIA-30. Кровотечение из внутренних грудных сосудов удалось остановить эндоскопическими инструментами путем наложения клипс проксимальнее места рассечения.

Послеоперационные осложнения представлены 2 случаями пневмонии. Разница между частотой интраоперационных осложнений обеих методик статистически незначима ($p = 0,1$; двухсторонний точный критерий Фишера).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВТПЛ — хирургическое вмешательство выбора, предоставляющее более объективную информацию о состоянии рассматриваемого лимфоколлектора по сравнению с биопсией и характеризующееся низкой частотой развития интра- и послеоперационных осложнений. Немаловажным аспектом, демонстрирующим несомненное преимущество ВТПЛ, является полное удаление парастерального коллектора, что несет санирующую функцию, обеспечивая надлежащий радикализм операции. При обнаружении метастазов в парастеральной зоне эта методика сравнима по своей значимости с подмышечной лимфаденэктомией, однако анализ лечебной составляющей ВТПЛ выходит за рамки данной публикации.

Эта высокотехнологичная малоинвазивная методика как нельзя лучше соответствует тактике лечения рака молочной железы ранних стадий — «от максимально возможного к минимально необходимому», позволяя при минимальном риске получить максимум пользы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ходин С. А., Дымарский Л. Ю. Частота поражения и топография метастазов в парастеральных лимфатических узлах при раке грудной железы (анализ 80 расширенных подмышечно-грудных мастэктомий) // Хирургия. — 1962. — № 8. — С. 44—51.
2. Urban J. A., Marjani M. A. Significance of internal mammary lymph node metastases in breast cancer // Am. J. Roentgenol. Radium. Ther. Nucl. Med. — 1971. — Vol. 111. — P. 130—136.
3. Handley R. S. Carcinoma of the breast // Ann. R. Coll. Surg. Engl. — 1975. — Vol. 57. — P. 59—66.
4. Should internal mammary lymph nodes in breast cancer be a target for the radiation oncologist? / Freedman G. M., Fowble B. L., Nicolaou N., Sigurdson E. R., Torosian M. H., Boraas M. C., Hoffman J. P. // Int. J. Radiat. Oncol. Phys. — 2000. — Vol. 46. — P. 805—814.
5. Поражение внутренних грудных лимфатических узлов при раке молочной железы: результаты 1026 видеоторакоскопических парастеральных лимфаденэктомий / Триголосов А. В., Нечушкин М. И., Уйманов В. А., Барковская С. Н., Лукьянова Е. В. // Маммология. — 2007. — № 1. — P. 25—32.
6. Internal Mammary Sentinel Lymph Node Mapping for Invasive Breast Cancer: Implications for Staging and Treatment / Park C., Seid P., Morita E., Iwanaga K., Weinberg V., Quivey J., Hwang E. S., Esserman L. J., Leong S. P. // Breast J. — 2005. — Vol. 11, N 1. — P. 29—33.
7. Семглазов В. Ф., Нургазиев К. Ш., Арзуманов А. С. Опухоль молочной железы (лечение и профилактика). — Алматы, 2001. — 345 с.

8. Sentinel lymph nodes lymphoscintigraphy and biopsy in breast cancer // Xu M., Liu L., Sun Y., Chen S. // Chin. Med. J. (Engl.). — 2002. — Vol. 115. — P. 1137—1140.

9. Clinical relevance of sentinel lymph nodes in the internal mammary chain in breast cancer patients / Paredes P., Vidal-Sicart S., Zanon G., Pahisa J., Fernandez P. L., Velasco M., Santamaria G., Ortin J., Duch J., Pons F. // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. — 2005. — Vol. 32, N 11. — P. 1283—1287.

10. Clinical and therapeutic importance of sentinel node biopsy of the internal mammary chain in patients with breast cancer: a single-center study with long-term follow-up / Carcoforo P., Sortini D., Feggi L., Feo C. V., Soliani G., Panareo S., Corcione S., Querzoli P., Maravegias K., Lanzara S., Liboni A. // Ann. Surg. Oncol. — 2006. — Vol. 13, N 10. — P. 1338—1343.

11. The value of radiotherapy on metastatic internal mammary nodes in breast cancer. Results on a large series / Veronesi U., Arnone P., Veronesi P., Galimberti V., Luini A., Rotmensz N., Botteri E., Ivaldi G. B., Leonardi M. C., Viale G., Sagona A., Paganelli G., Panzeri R., Orecchia R. // Ann. Oncol. — 2008. — Vol. 19, N 9. — P. 1553—1560.

12. Internal mammary nodes in breast cancer: diagnosis and implications for patient management — a systematic review / Chen R. C., Lin N. U., Golshan M., Harris J. R., Bellon J. R. // J. Clin. Oncol. — 2008. — Vol. 26, N 30. — P. 4981—4989.

13. Feasibility and accuracy of the combined radioisotope and blue-dye guided sentinel lymph node biopsy in breast cancer / Peley G.,

Farkas E., Teglas M., Orosz Z., Andocs G. // Magy. Seb. — 2000. — Vol. 53. — P. 241—246.

14. Sentinel node biopsy and internal mammary lymphatic mapping in breast cancer / Johnson N., Soot L., Nelson J., Franzini M. D., Veal H., Gruner S., Kulawiak L., Young K. // Am. J. Surg. — 2000. — Vol. 179. — P. 386—388.

15. Видеоторакоскопическая парастернальная лимфаденэктомия как метод диагностики и лечения рака молочной железы / Сигал Е. И., Исмагилов А. Х., Хамидуллин Р. Г., Нагуманов Э. В., Губайдуллин Х. М. // Эндоскопическая хирургия. — 2000. — № 4. — С. 17—22.

16. Гвахария Н. В. Диагностика парастеральных «сторожевых» лимфатических узлов в повышении эффективности хирургического лечения рака молочной железы: Дис... канд. мед. наук. — М., 2004. — 101 с.

17. Thoracoscopic internal mammary sentinel node biopsy for breast cancer / Ogawa Y., Ishikawa T., Sawada T., Chung S. H., Osaka H., Takashima T., Onoda N., Kato Y., Ochi H., Hirakawa K. // Surg. Endosc. — 2003. — Vol. 17. — P. 315—319.

18. A pilot study on thoracoscopic internal mammary lymphatic chain dissection for breast cancer / He Q., Jiang J., Yang X., Fan L., Guo M., Zhang Y. // The Breast. — 2008. — Vol. 17. — P. 569—573.

Поступила 01.08.2012

Victor Alexeyevich Uymanov¹, Mikhail Ivanovich Nechushkin²,
Arkadiy Vyacheslavovich Trigolosov³, Alexander Valerievich Petrovskiy⁴,
Yana Vladimirovna Vishnevskaya⁵, Anna Alexandrovna Zaitseva⁶

SURGICAL METHODS FOR MORPHOLOGICAL ASSESSMENT OF PARASTERNAL LYMPH NODE STATUS AS A PART OF CONSERVATION TREATMENT IN BREAST CANCER PATIENTS

¹ MD, PhD, Senior Researcher, Radiosurgery Department, N. N. Blokhin RCRC, RAMS
(24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

² MD, PhD, DSc, Professor, Head, Radiosurgery Department, N. N. Blokhin RCRC, RAMS
(24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

³ MD, PhD, Senior Researcher, Radiosurgery Department, N. N. Blokhin RCRC, RAMS
(24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁴ MD, PhD, Associate Professor, Chair of Oncology, Treatment Faculty, I. M. Sechenov First MSMU
(8/2, ul. Trubetskaya, Moscow, 119991, RF)

⁵ MD, PhD, Senior Researcher, Human Tumor Pathological Anatomy Department,
N. N. Blokhin RCRC, RAMS (24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478)

⁶ Postgraduate Student, Chair of Oncology, Treatment Faculty, I. M. Sechenov First MSMU
(8/2, ul. Trubetskaya, Moscow, 119991, RF)

Address for correspondence: Uymanov Victor Alexeyevich, Radiosurgery Department,
N. N. Blokhin RCRC, RAMS, 24, Kashirskoye sh., Moscow, RF, 115478;
e-mail: v.uymanov@mail.ru

The purpose of this study was to compare diagnostic capacity of videothoroscopic parasternal lymphadenectomy and open lymph node biopsy in detection of parasternal lymph node involvement and frequency of complications after use of these approaches. The study was performed on a population of 884 women with stage I–IIB breast cancer receiving conservation treatment at the Radiosurgery Department, N. N. Blokhin RCRC, RAMS, during 1990 through 2005. Open biopsy of parasternal lymph nodes on the affected side was made in 125 and videothoroscopic parasternal lymphadenectomy was made in 759 of the 884 patients. By logistic regression analysis, videothoroscopic parasternal lymphadenectomy provides a 2.5-fold higher chance to detect parasternal lymph node metastases as compared to open biopsy ($p = 0.018$). Complications were reported in 1.6% of cases following open biopsy versus 1.2% after videothoroscopic parasternal lymphadenectomy ($p = 0.1$). As compared to biopsy, videothoroscopic parasternal lymphadenectomy is a surgical intervention of choice ensuring more objective information on the status of the lymph nodes in question and associated with a lower frequency of complications.

Key words: breast cancer, videothoracoscopy, parasternal lymphadenectomy.

ТРЕБОВАНИЯ К ПУБЛИКАЦИЯМ В ЖУРНАЛЕ «ВЕСТНИК РОНЦ ИМ. Н. Н. БЛОХИНА РАМН»

Журнал «Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН» состоит из следующих разделов: «Экспериментальные исследования», «Клинические исследования», «Клинические лекции», «Случай из практики», «Обзорные статьи», «Хроники», «Дискуссия».

Статьи для разделов «Экспериментальные исследования» и «Клинические исследования» должны состоять из реферата, введения, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения и списка литературы; статьи для раздела «Случай из практики» — из реферата, краткой исторической справки (по желанию авторов), описания клинического наблюдения, обсуждения (по желанию авторов), заключения и списка литературы; статьи для разделов «Обзорные статьи» и «Клинические лекции» — из реферата, отдельных разделов (по желанию авторов), заключения и списка литературы.

Статья должна быть представлена в виде файла формата RTF на дискете или CD и распечатана в 2 экземплярах. В основном файле должны содержаться текст статьи, таблицы, подписи и надписи к рисункам, список литературы. Кроме того, на дискете или CD должны быть записаны рисунки (каждый в виде отдельного файла). Штриховые и тоновые рисунки (фотографии, рентгенограммы и т. д.), т. е. растровая графика, должны быть сохранены в виде файлов формата TIF или JPEG, графики и диаграммы (векторная графика) — в виде файлов формата EPS. Если автор не работает с современными программными пакетами для создания векторной графики, можно присылать графики в виде файла Microsoft Excel с обязательным приложением в виде таблицы с данными, которые использованы для построения графика.

Обзорные статьи не должны превышать 24 страницы, оригинальные статьи и клинические лекции — 12 страниц, описания клинических наблюдений, рационализаторских предложений, хроникальных заметок, рецензий — 4 страницы текста.

Весь текст должен быть набран шрифтом Times New Roman 14, через полуторный интервал. Ширина полей: левое — 30 мм, верхнее — 20 мм, правое — 15 мм, нижнее — 20 мм. Текст должен быть выровнен по левому краю, не содержать переносов. Все страницы должны быть пронумерованы.

После названия статьи следует указать имена, отчества (полностью) и фамилии авторов, их ученые звания и должности, полное название учреждений (в том числе названия отделений, НИИ), в которых работают авторы, с указанием адреса, почтового индекса и e-mail. Кроме того, необходимо указать контактное лицо, адрес для переписки и e-mail (нужно иметь в виду, что все эти данные будут опубликованы). Затем должен следовать реферат, в котором кратко, без рубрикации должны быть указаны цель исследования, материалы и методы (количество больных, используемая методика), полученные автором результаты и основные выводы. Рекомендуемый объем

реферата — 500—1000 печатных знаков. В конце реферата автор приводит ключевые слова работы (не более 5).

Статья должна быть написана ясно, четко, лаконично, тщательно выверена авторами, не содержать повторов и исправлений. Наименования единиц (физических величин, результатов анализов) необходимо приводить по системе СИ. Сокращения допустимы только в отношении часто встречающихся в статье терминов. Они приводятся при первом вхождении в круглых скобках и в дальнейшем используются по всему тексту. Если сокращений больше 10, следует создать список сокращений. В тексте необходимо использовать международные названия лекарственных средств, которые пишутся с маленькой буквы. Торговые названия препаратов следует писать с большой буквы.

По тексту нужно дать ссылки на все таблицы и рисунки (например, табл. 1, рис. 1). Они должны быть размещены в соответствующих по смыслу абзацах и последовательно пронумерованы. Рисунки и таблицы нумеруются отдельно.

Таблицы должны быть компактными, иметь название, не повторять графики. Размерность величин следует указывать через запятую. Таблица не должна содержать пустых ячеек (отсутствие данных должно отмечаться тире, «нет данных» или специальным примечанием). Все уточнения и локальные сокращения выносятся в подтабличные примечания. Каждое примечание нужно располагать с новой строки, помечать надстрочной буквой (а, б, в и т. д.).

Размер каждого рисунка должен быть не менее 10 × 10 см при разрешении не менее 300 dpi. Если под одной подписью планируется несколько рисунков (фотографий, рентгенограмм), каждый должен быть прислан отдельно и соответствовать указанному выше требованию. Подпись к рисунку должна быть лаконичной, точно соответствовать его содержанию. Если несколько рисунков идут под общей подписью, то сначала приводят ее, а затем названия отдельных рисунков. В подписях к микрофотографиям следует указать методику микроскопии, увеличение, метод окраски материала.

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

Список литературы должен быть кратким и содержать не более 20 ссылок для статей из разделов «Экспериментальные исследования», «Клинические исследования», «Клинические лекции», «Случай из практики» и не более 100 ссылок для обзорных статей. Литературные источники перечисляют в списке литературы в порядке цитирования. В тексте статьи ссылки на номер источника представляют в квадратных скобках.

Ссылки должны быть пронумерованы в соответствии с их положением в списке литературы. Все литературные источники, перечисленные в списке литературы, должны иметь соответствующую ссылку в тексте. Фамилии иностранных авторов приводятся в оригинальной транскрипции. В список литературы не включают ссылки на неопубликованные работы. Ссылки должны быть тщательно выверены авторами, которые несут ответственность за правильность приведенных данных.

В каждой ссылке должны быть указаны все авторы. Если авторов не более трех, их фамилии и инициалы пишут в начале ссылки, затем следуют название работы и выходные данные издания, если авторов четыре и более, то сначала пишут название работы, затем фамилии и инициалы всех авторов, затем выходные данные издания. Это касается ссылок на любые издания: книги, журналы, сборники и т. д.

Иванов И. И. Хронические гастриты. — 3-е изд. — М.: Медицина, 1986. — 148 с.

Хронические гастриты / Иванов И. И., Петров П. П., Сидоров С. С., Федоров Ф. Ф. — 3-е изд. — М.: Медицина, 1986. — 148 с.

При ссылке на книгу следует указывать авторов, название книги, номер издания (может отсутствовать), место издания, издательство (может отсутствовать), год и страницы (если автор ссылается на всю книгу, то пишется 150 с., если — на ее часть, то указывается С. 145—150), например:

Бааде В. Ю. Биогаз: теория и практика. — 3-е изд. — М.: Колос, 1986. — 148 с.

Schrier R. Manual of nephrology. — 4th ed. — New York: Little, Brown and company, 1995. — P. 170—187.

При ссылке на главу из книги, написанной коллективом авторов, указывают авторов главы и ее название, затем название книги, ее редакторов, номер издания (может отсутствовать), место издания, издательство (может отсутствовать), год и страницы, например:

Кэйн Д. Этические и правовые основы медицинской помощи // Гинекология по Эмилю Новаку: Пер. с англ. / Под ред. Д. Берека, И. Адаши, П. Хиллард. — М.: Практика, 2002. — С. 14—18.

Cain J. Principles of patient care // Novak's Gynecology / Berek J., Adashi E., Hillard P. (eds.). — 12th ed. — Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. — P. 14—18.

При ссылке на журнал указывают авторов, название статьи, журнала (в традиционном сокращении), год, том, номер (может быть только том или номер) и страницы, например:

Заварзин Г. А. Трофические связи в метаногенном сообществе // Известия РАН. — 1996. — Т. 3, №6. — С. 34—36.

Хронические гастриты / Иванов И. И., Петров П. П., Сидоров С. С., Федоров Ф. Ф. // Гастроэнтерология. — 1996. — Т. 3, №6. — С. 34—36.

Fallowfield L. J. Psychological outcomes of different treatment policies in women with early breast cancer outside a clinical trial // BMJ. — 1990. — Vol. 3, N 5. — P. 575—580.

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

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

При ссылке на тезисы докладов указывают авторов, затем название тезисов, конференции, сроки ее проведения, страницы, например:

Кононенко Г. А. Решение уравнений движения однофазного вязкого закрученного потока в длинной трубе // Тез. докл. Всерос. науч.-тех. совещ., г. Иркутск, 19—21 апр. 1994 г. — С. 34—36.

Bailees M. D. The professional-client relationship // Proceedings of 17th International Cancer Congress, Rio de Janeiro, 23—28 Aug, 1998. — P. 596.

При ссылке на диссертации или авторефераты указывают автора, затем название диссертации, место и дату написания, страницы, например:

Бредикис Ю. И. Анатомическое и экспериментальное обоснование пункции сердца: Дис... канд. мед. наук. — М., 1957. — 157 с.

При этом используются следующие сокращения: «Дис... канд. мед. наук», «Дис... д-ра мед. наук», «Автореф. дис... канд. мед. наук», «Автореф. дис... д-ра мед. наук».

При ссылке на журналы, представленные в электронном доступе, следует указывать авторов и название статьи, название электронного журнала, год, номер, электронный адрес и дату обращения, например:

Иванова И. И. Развитие металлопроизводства в эпоху раннего металла [Электронный ресурс] // Вестн. РФФИ. — 1997. — №2. — URL: <http://www.rfbr.ru> (дата обращения: 01.01.2008).

Один из печатных вариантов работы должен быть обязательно подписан всеми авторами и руководителем подразделения, в нем должны содержаться контактные телефоны и e-mail.

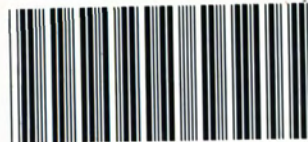
Все статьи, поступившие в редакцию, подлежат рецензированию. Рецензенты назначаются редакционной коллегией журнала, которая имеет право отклонить работу из-за несоответствия профилю и требованиям журнала. В случае отказа в публикации редакция высылает авторам письмо с объяснением его причин. Плата за публикацию не взимается.

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

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

Передача рукописи в редакцию журнала «Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН» означает, что авторы статьи дают согласие на ее размещение в свободном доступе на сайтах www.ronc.ru и www.elibrary.ru.

Адрес редакции: 115478, РФ, Москва, Каширское шоссе, д. 24,
редакция журнала «Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН».
Телефон редакции: +7-499-324-5537. E-mail: vestnikronc@mail.ru



00253079

Все выпуски журнала начиная с 1990 г. представлены по адресу:

www.elibrary.ru

Регистрация на сайте и доступ к полным текстам статей бесплатны

ISSN 1726-9806



9 771726 980006