



МЕМБРАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ Le^c НА КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Я.А. Удалова¹, Н.В. Бовин², П.С. Обухова², Н.В. Шилова²,
А.М. Ковригина¹, А.А. Субботина¹, В.В. Тимошенко¹, О.Е. Галанина²,
З.Г. Кадагидзе¹, В.П. Летагин¹, Н.Н. Тупицын¹

¹ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; ²Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

MEMBRANE LE^c EXPRESSION IN BREAST CANCER CELLS

Yu.A. Udalova¹, N.V. Bovin², P.S. Obukhova², N.V. Shilova², A.M. Kovrigina¹, A.A. Subbotina¹,
V.V. Timoshenko¹, O.E. Galanina², Z.G. Kadagidze¹, V.P. Letyagin¹, N.N. Tupitsyn¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences;

²M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Affine chromatography was used to isolate Lec antibodies from the sera of a healthy female donor with the high titers of these antibodies, which were labeled with biotin. The study enrolled 51 patients with primary breast cancer (BC). Antigen expression was found by immunohistochemistry and flow cytometry. With these two techniques being used, the detection rate of Le^c expression in BC cells was 65% (33/51); the antigen was most frequently found by flow cytometry as compared with immunohistochemistry: 72 and 58% of cases, respectively.

Key words: breast cancer, membrane expression, antibodies, Le^c.

Введение

В последнее время все большее внимание исследователей в области клинической иммунологии опухолей привлекает естественный гуморальный иммунитет. О том, что он был незаслуженно забыт, свидетельствуют уже сами названия статей в зарубежных научных журналах, где естественные антитела иммуноглобулинов М (IgM) называют отверженными, игнорируемыми, сиротскими и, наконец, лучшими средствами противораковой защиты [1–4].

Естественные антитела — это один из компонентов врожденного иммунитета.

Десятивалентные пентамерные IgM способны эффективно связывать и уничтожать не только патогены, с которыми данный вид встречался в ходе эволюции, но и трансформированные клетки. Отличие их от обычных антител состоит в том, что естественные антитела используют ограниченный набор генов, направлены, как правило, к углеводным детерминантам и продуцируются особыми В1-клетками, не способными к переключению классов. В1-клетки преобладают у плода и новорожденных, а у взрослых — малочисленны [5–8]. По структуре это обычные антитела, субъединицы которых, как и все Ig, кодируются четырьмя (VDJC) генными сегментами. Однако за счет использования ограниченного набора генов может образовываться не 200 000 специфичностей, а значительно меньше.

Точные доказательства роли естественных IgM-антител в противоопухолевом надзоре дос-

тигнуты на основе триомной гибридомной технологии создания человеческих антител против антигенов раковых клеток. Получены уже сотни таких антител, которые реагируют с опухолеспецифическими гликанами и не реагируют с нормальными тканями. Клетки-продуценты этих антител обнаружены в селезенке онкологических больных и здоровых людей. При взаимодействии с опухолевыми клетками значительная часть моноклональных (естественных) IgM-антител вызывает клеточную гибель вследствие апоптоза [9] или липоптоза [10].

В 1994 г. P.D. Rye и R.A. Walker [11] получили моноклональные IgM-антитела LU-BCRU-G7 к опухолеассоциированному гликану, имеющему прогностическое значение при раке молочной железы (РМЖ) ранних стадий [11]. Антитела распознавали дисахарид изолактозамин (Galβ1—3GlcNAc), или Lewis C (Le^c), являющийся предшественником H (тип 1) [12]. В последующем нами была подтверждена прогностическая роль маркера [13] и доказано, что уровни антител к Le^c у больных РМЖ достоверно более низкие, чем у здоровых женщин [14]. Это открывает перспективы иммунокоррекции, адоптивной иммунотерапии специфическими естественными антителами к Le^c, что может быть полезным для эрадикации костномозговых микрометастазов РМЖ. Поскольку подобный подход продуктивен лишь в случаях мембранной экспрессии гликана на опухолевых клетках, мы оценили возможности использования человеческих сывороточных антител к Le^c для этих целей.

Материалы и методы

В исследование включена 51 больная первичным РМЖ. Пациентки проходили обследование и хирургическое лечение в НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН в период с 2007 по 2009 г. Возраст больных варьировал от 25 до 75 лет. Из них 37% ($n=19$) находились в репродуктивном периоде, 63% ($n=32$) — в периоде менопаузы.

Пациенткам было выполнено стандартное обследование, включающее осмотр, маммографическое исследование, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза. На I этапе всем больным проведена хирургическая операция в объеме радикальной резекции или мастэктомии молочной железы. У всех пациенток при плановом гистологическом исследовании диагностирован РМЖ: инфильтрирующий дольковый — в 15%, инфильтрирующий протоковый — в 85%.

Определение уровней антител к Le^c в сыворотке крови

Полистирольные иммунопланшеты («MaxiSorp», «Nunc», Дания) сенсibilизировали полиакриламидным гликоконъюгатом, содержащим дисахарид Le^c (Le^c—PAA, 30 кДа, 20 мол % Le^c), и полиакриламидом без углеводного лиганда в качестве отрицательного контроля (PAA), концентрация 10 мкг/мл в натрий-карбонатном буфере (Na₂CO₃/NaHCO₃: 0,05 М, pH 9,6) в течение ночи (16 ч) при температуре 4°C. Между всеми этапами планшеты промывали 4 раза 0,1% Твин-20 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ: 0,15 М, pH 7,4). Оставшиеся потенциальные места связывания на полистироле блокировали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в ФСБ в течение 40 мин при температуре 37°C. Затем планшеты инкубировали с донорской сывороткой крови в последовательных двукратных разведениях в ФСБ, содержащем 0,3% БСА, начиная с 1:20 в течение 60 мин при температуре 37°C. После этого в планшеты добавляли меченные пероксидазой хрена антитела козла против IgG, IgM и IgA человека («Southern Biotech», США) в разведении 1:4000 в ФСБ, содержащем 0,3% БСА, и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C. На заключительном этапе планшеты инкубировали с фосфатно-цитратным буфером (0,075 М, pH 5), содержащем 0,04% о-фенилендиамина и 0,03% H₂O₂, в течение 20 мин при комнатной температуре. Цветную реакцию останавливали 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность (OD) определяли при 492 нм на многопараметровом счетчике (Victor², «Perkin Elmer», США). OD окрашенного раствора пропорциональна уровню сывороточных анти-Le^c-антител, специфичных к иммобилизованному на пластик антигену Le^c. Каждый эксперимент дублировался.

Выделение естественных анти-Le^c-антител из сыворотки крови человека методом аффинной хроматографии

Сыворотку крови здорового донора II (A) группы (25 мл) инкубировали при температуре 56°C в течение 30 мин для инактивации системы комплемента, охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 4°C (13 000 g). Супернатант разводили 1:1 ФСБ / 0,02% NaN₃ (0,15 М, pH 7,4). Сыворотку наносили на колонку с адсорбентом Le^c-sepharose 6 FF (2 мл), уравновешенным ФСБ / 0,02% NaN₃, со скоростью потока 80—300 мкл/мин при комнатной температуре. Сыворотку, прошедшую через колонку, собирали для дальнейшего сравнительного анализа с исходной сывороткой методом иммуноферментного анализа (ИФА). Адсорбент промывали по 15 объемов колонки сначала ФСБ / 0,02% NaN₃/0,5% Твин-20 под контролем проточного ультрафиолетового (УФ) детектора («Bio-Rad», США) до исчезновения белков в смыве и затем ФСБ / 0,02% NaN₃. Элюцию связавшихся с адсорбентом антител проводили Tris-ОН/0,02% NaN₃ (0,2 М, pH 10,4) со скоростью потока элюирующего буфера 60—90 мкл/мин. Появление антител в элюате определяли проточным УФ-детектором. Фракции, содержащие антитела, немедленно нейтрализовали буфером Gly-HCl / 0,02% NaN₃ (2 М, pH 2,5). Концентрацию антител во фракциях определяли методом поглощения при $\gamma=280$ нм с помощью спектрофотометра Ultrospec 3100 pro («Amersham», «Pharmacia by Biosciences», Великобритания). Для расчета концентрации белка во фракциях принимали следующее соотношение: раствору с концентрацией Ig (для IgG, IgM, IgA) 1 мг/мл соответствует 1,4 оптической единицы.

Специфичность выделенных антител анализировали методом ИФА с использованием полиакриламидных гликоконъюгатов. Антитела хранили при температуре 4°C в течение недели или замораживали при -20°C на длительное хранение.

После элюции специфических антител колонку с аффинным адсорбентом промывали дистиллированной водой (5 объемов колонки), затем адсорбент регенерировали 0,1 Н NaOH (5 объемов колонки) и опять промывали дистиллированной водой (5 объемов колонки). После полноценной регенерации аффинный адсорбент либо снова уравновешивали ФСБ / 0,02% NaN₃ (0,15 М, pH 7,4) для следующей аффинной хроматографии сыворотки крови, либо оставляли его на хранение при температуре 4°C в 25% водном растворе этанола.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование было проведено по стандартной методике [15] на криостатных срезах опухолей с использованием мышиных моноклональных антител к общелейкоцитарному антигену CD45 и панцитокератинам KL-1, а также человеческих антител к Le^c, мечен-

ных биотином. Проявление мышинных антител осуществляли с помощью меченой флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) антисыворотки против Ig мыши («BDB», США). Проявление взаимодействия человеческих анти-Le^c-антител с опухолевыми клетками осуществляли с помощью стрептавидина, меченого FITC или фикоэритрином (PE).

Методом трехцветной проточной цитометрии (ПЦ) на приборе FACScan оценена мембранная экспрессия Le^c на опухолевых клетках и интратуморальных лимфоцитах. Из фрагмента хирургически удаленной опухоли получали суспензию опухолевых клеток и интратуморальных лимфоцитов с использованием аппарата Medimashin («BDB», США). Клетки окрашивали флуоресцентно мечеными антителами к общелейкоцитарному антигену CD45-PE/Cy5, общеэпителиальному антигену HEA-125 или EpCAM-1-PE и биотинилированными человеческими антителами к Le^c. Проявление связывания человеческих антител осуществляли с помощью стрептавидин-FITC. Субпопуляции интратуморальных Т- и В-лимфоцитов, связывающих анти-Le^c, изучали с помощью напрямую меченных флуорохромами антител CD3-PE/Cy5 и CD19-PE.

Результаты и обсуждение

В ранних работах по ИГХ-изучению экспрессии Le^c на клетках РМЖ указывалось на цитоплазматическую экспрессию антигена [11], однако в дальнейшем была доказана его мембранная экспрессия [16]. Это свидетельствует о непригодности ИГХ-метода для разграничения мембранной и цитоплазматической экспрессии Le^c на клетках РМЖ.

По нашим сведениям, LU-BCRU-G7 — единственные моноклональные антитела IgM класса с доказанной специфичностью к Le^c. К сожалению, работа с ними не могла быть продолжена, так как соответствующая гибридома была утрачена (P.D. Rye — личное сообщение).

Из сыворотки крови здоровой женщины-донора с высокими титрами антител к Le^c (рис. 1) эти антитела были выделены методом аффинной хроматографии и помечены биотином.

Выявление экспрессии антигена проводили методами ИГХ и ПЦ. При использовании двух этих методов частота экспрессии Le^c на клетках РМЖ составила 65% (33 из 51).

Выявление экспрессии Le^c на клетках РМЖ ИГХ (флуоресцентным)-методом на свежемороженых (криостатных) срезах опухолевой ткани

Для оценки возможности изучения экспрессии Le^c на опухолевых клетках нами использован Le^c-положительный РМЖ. Экспрессия гликана на опухолевых клетках доказана благодаря применению моноклональных антител LU-BCRU-G7 (материалы предоставлены P.D. Rye, Норвегия).

Изучены различные разведения биотинилированных иммуноаффинно выделенных человеческих антител — 1/10, 1/100, 1/1000. Использовали конъюгаты стрептавидина с FITC и PE в разведениях 1/10, 1/100 и 1/1000. Антитела выявляли антиген при разведении 1/10 (более яркая реакция) и 1/100 (отчетливая реакция), причем при разведении биотинилированных человеческих антител в 100 раз реакция полностью блокировалась предварительной обработкой срезов мышинными немечеными антителами LU-BCRU-G7 (50 мкг/мл). Из числа стрептавидиновых конъюгатов предпочтительным оказался PE. Положительная реакция отмечена нами в 58% случаев РМЖ (18 из 31), причем, как видно на рис. 2, цитоплазматическая реакция была отчетливой, а однозначно оценить экспрессию антигена на мембране опухолевых клеток не представлялось возможным. Антиген выявлялся в различной пропорции опухолевых клеток, вплоть до мноморфной реакции, представленной на рис. 2.

При сопоставлении экспрессии Le^c с уровнями лимфоидной инфильтрации опухоли (по CD45⁺-лимфоцитам) взаимосвязи между этими признаками не отмечено.

Выявление мембранной экспрессии Le^c на клетках РМЖ методом многоцветной ПЦ

Поскольку ИГХ-метод не позволяет однозначно определить мембранную экспрессию Le^c в случае наличия антигена в цитоплазме опухолевых клеток, нами апробирован ПЦ-метод. Исследование проведено у 29 больных РМЖ на материале хирургически удаленной опухоли. Суспензию опухолевых клеток получали на аппарате Medimashin («BDB», США). С целью разграничения экспрессии антигена на эпителиальных клетках и лимфоцитах использовали 3-цветную ПЦ.

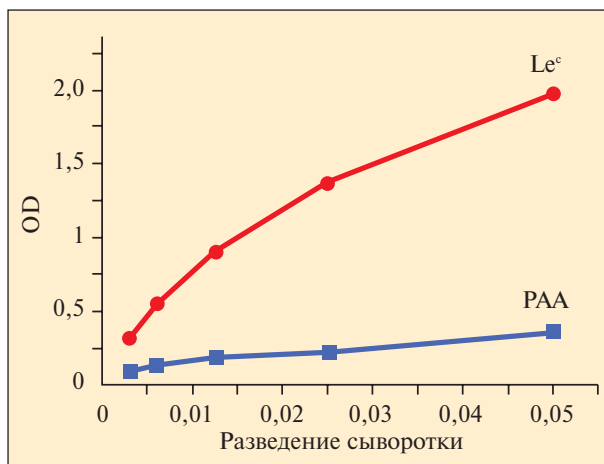


Рис. 1. Уровни анти-Le^c в донорской крови (красная кривая), использованной для иммуноаффинного выделения антител. Кривая черного цвета демонстрирует практически полное отсутствие неспецифического связывания сыворотки в контроле — РАА (полиакриламидные частицы, не нагруженные Le^c)

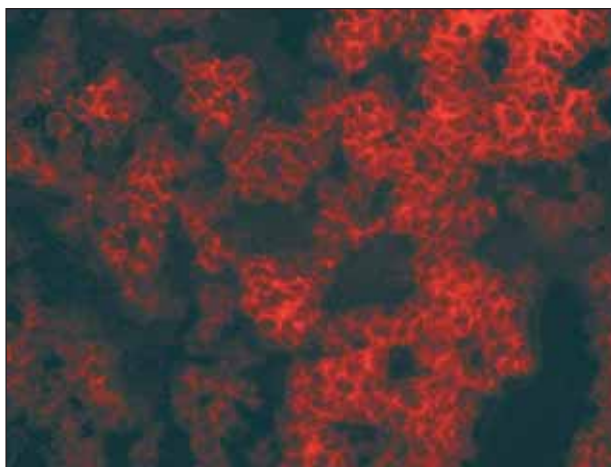


Рис. 2. Мономорфная экспрессия гликана Le^c клетками РМЖ ($\times 400$). Иммунофлуоресцентное окрашивание криостатных срезов биотинилированными человеческими антителами к Le^c , проявление реакции стрептавидином-РЕ. Четко видна цитоплазматическая экспрессия антигена, однозначно оценить мембранную реакцию не представляется возможным

Эпителиальные клетки окрашивали антителами HEA-125 или EpCAM-1 (CD326), меченными РЕ. Лейкоциты окрашивали антителами к CD45, меченными РЕ/Су5. Для проявления человеческого антител к Le^c с клетками использовали FITC-меченный стрептавидин. При выявлении опухолевых клеток в ПЦ-экспериментах нами отдано предпочтение оценке мембранной экспрессии EpCAM, а не панцитокератинам, которые использовались в ИГХ-исследованиях. Подобный выбор обусловлен тем, что EpCAM экспрессирован на

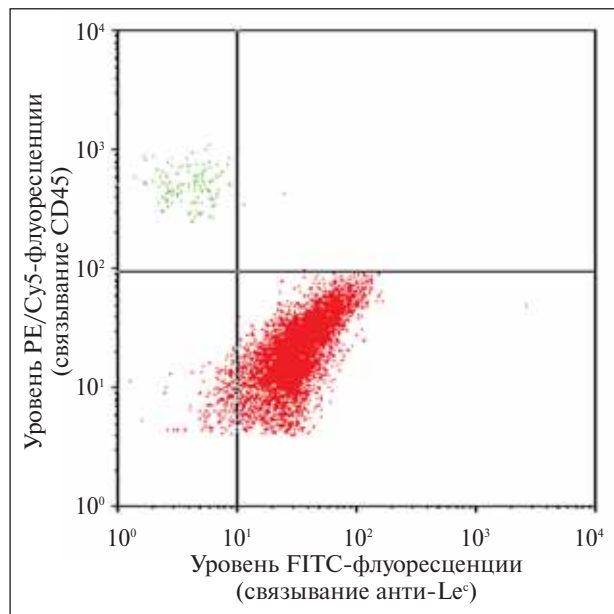


Рис. 3. Мономорфная экспрессия Le^c на EpCAM⁺-клетках РМЖ (окрашены красным) и отсутствие антигена на интратуморальных CD45⁺-лимфоцитах (окрашены зеленым)

мембране клеток, и для его обнаружения не требуется разрушения клеточной мембраны (пермеабилзации в терминах ПЦ). При такой постановке реакции человеческие антитела к Le^c не попадают в цитоплазму клеток, а выявляют только мембранный антиген, что и явилось основной целью нашего исследования.

Мембранная экспрессия гликана при отсутствии антигена на лимфоцитах установлена в большинстве случаев — 72% (21 из 29), рис. 3.

Следует отметить, что связывание анти- Le^c с лимфоцитами (отрицательное) в ряде случаев было гетерогенным, как это показано на рис. 4.

Как видно на рис. 4 а, связывание анти- Le^c с лимфоцитами более низкое (отрицательная реакция), чем с опухолевыми клетками (положительная реакция). Вместе с тем уровни связывания антител с лимфоцитами различны — от полностью отрицательных более крупных лимфоцитов (окрашены фиолетовым) до слабой реакции, возможно, за счет Fc-рецептора, мелких лимфоцитов (окрашены синим). Поскольку опухолевые клетки не экспрессируют Fc-рецепторов, установление положительной реакции на них не представляет затруднений. В этом случае лимфоциты являются внутренним отрицательным контролем. Следует отметить, что подбор реагента для отрицательного контроля связывания человеческих антител к Le^c с опухолевыми клетками в данных исследованиях практически невозможен.

Выявление экспрессии антигена в сравнении с лимфоцитами представляется, несомненно, наиболее точным. Однако в отдельных случаях небольшая (доли процента) пропорция лимфоцитов демонстрирует уровни связывания анти- Le^c , сопоставимые с опухолевыми клетками (рис. 5 а). Дифференцированное окрашивание интратуморальных лимфоцитов проведено антителами к Т-лимфоцитам (CD3, меченными РЕ/Су5) и к В-лимфоцитам (CD19, меченными РЕ), что отражено на рис. 5 б. Крайне интересным оказался тот факт, что все интратуморальные В-лимфоциты связывали антитела к Le^c . При этом пропорция В-клеток была ничтожно малой в сравнении с Т-лимфоцитами, что согласуется с результатами наших более ранних исследований.

В литературе широко обсуждается возможность использования естественных антител для адоптивной терапии при эпителиальных опухолях. В Германии проведена II фаза клинических испытаний естественных человеческих моноклональных антител IgM класса у 20 больных низкодифференцированной аденокарциномой желудка в неоадьювантном режиме. Показаны эффективность антител (сокращение размера опухоли, индукция апоптоза) и отсутствие токсичности — повреждающего влияния на нормальные ткани и клетки иммунной системы [17, 18].

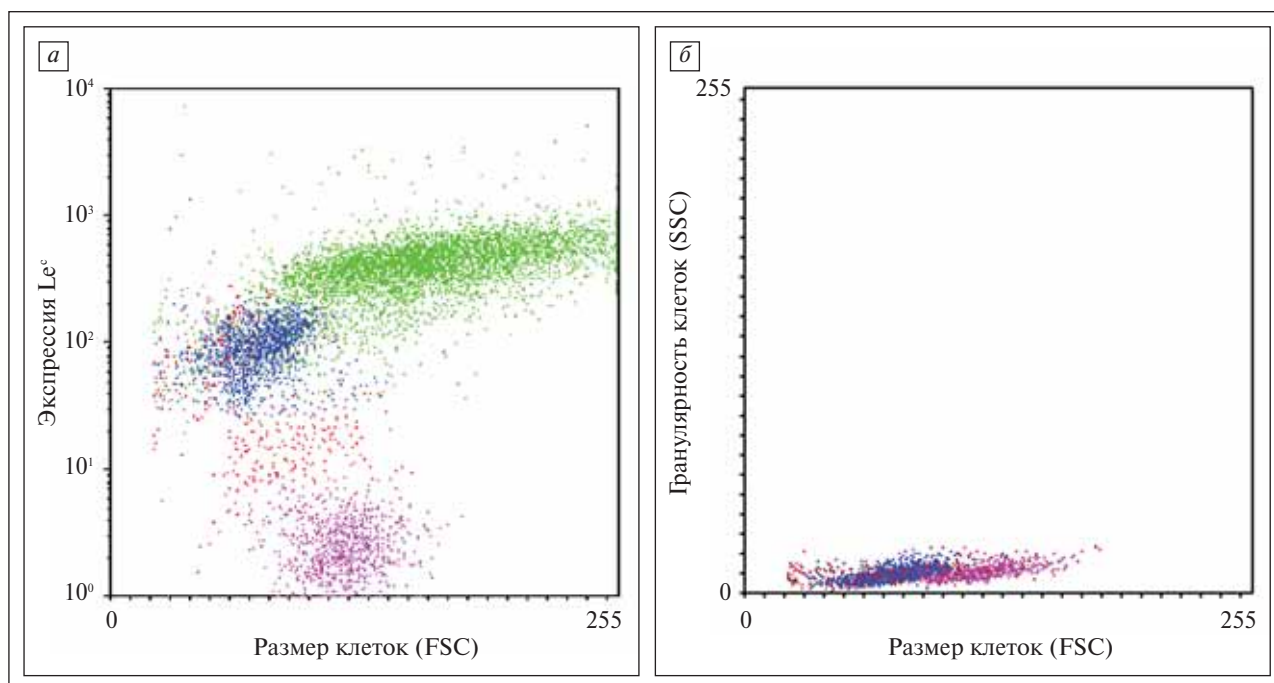


Рис. 4. Связывание анти- Le^c с опухолевыми клетками и интратуморальными лимфоцитами: *а* — мономорфная мембранная экспрессия Le^c на клетках РМЖ (окрашены зеленым), отсутствие антигена на лимфоцитах (окрашены красным, синим, фиолетовым); *б* — в опухолевой ткани присутствуют крупные (окрашены фиолетовым) и мелкие (окрашены синим) лимфоциты

Разумеется, использование естественных антител, реагирующих в 100% случаев того или иного вида опухоли (как антитела SC-1 при аденокарциноме желудка), не требует изучения опухолей на предмет экспрессии антигена.

Иная ситуация с антителами к Le^c , которые определяют антиген в 50—70% случаев РМЖ. При этом необходимо исследовать как сыровоточные уровни антител, так и экспрессию антигена на опухоли. При высоких титрах антител при-

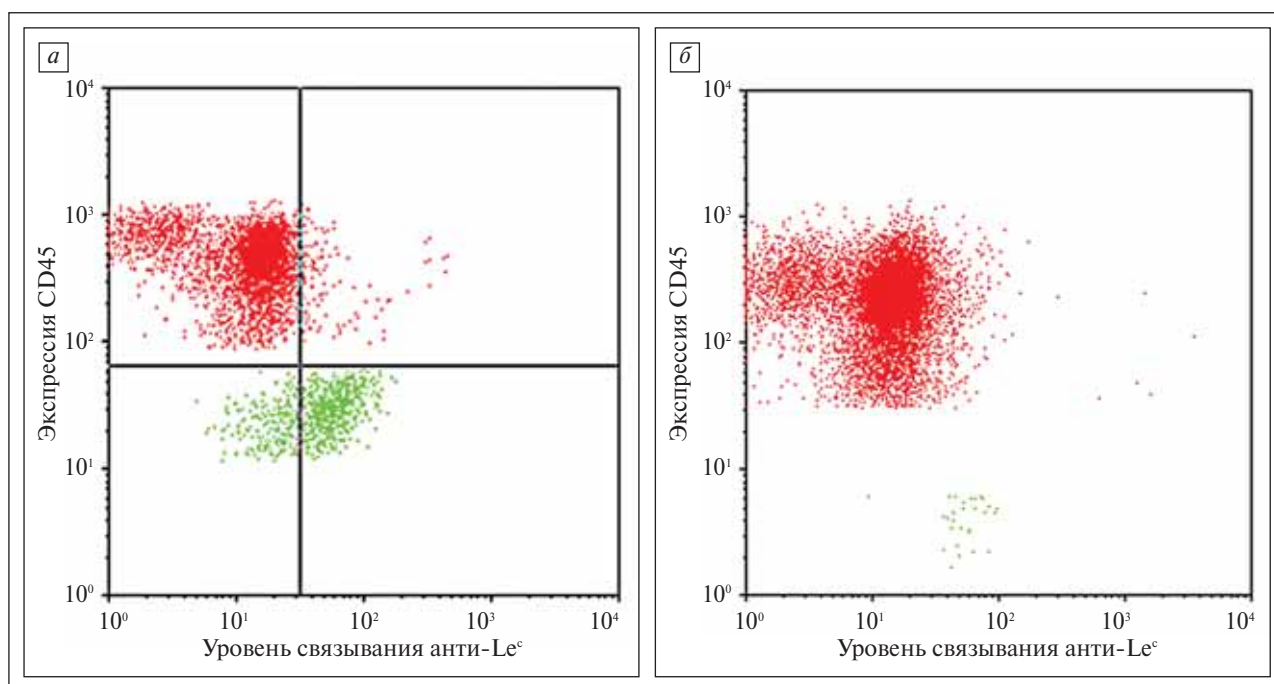


Рис 5. Взаимодействие интратуморальных В-лимфоцитов с анти- Le^c : *а* — связывание антител к Le^c с опухолевыми клетками (окрашены зеленым) и с минимальной пропорцией лимфоцитов (окрашены красным); *б* — практически все В-лимфоциты (окрашены зеленым) связывают антитела к Le^c

менение анти-Le^c в качестве адоптивной иммуно-терапии нецелесообразно. У больных с отсутствием сывороточных антител возможны 2 ситуации — опухоль антиген-отрицательна или антиген-положительна. Именно в последнем случае показано использование антител. По этой причине необходимо изучать мембранный Le^c на опухолевых клетках.

С учетом данных литературы, собственного опыта, особенностей и титров естественных IgM-антител наибольшее применение они могут найти в качестве адъювантной терапии в лечении микрометастазов, являющихся главной причиной развития отдаленных метастазов и смерти больных. Получить экспериментальное доказательство влияния естественных антител на циркулирующие и диссеминированные раковые клетки достаточно сложно. Достаточно убедительные данные получены в 2005 г. В. Illert и соавт. [19]. Авторы вводили естественные человеческие моноклональные антитела IgM-класса мышам nude с метастазирующей аденокарциномой желудка, а в группе сравнения антитела не вводили. Антитела направлены к углеводной детерминанте клеток рака желудка, индуцируют апоптоз опухолевых клеток. Спустя неделю после введения антител оценивали частоту обнаружения диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Отмечено достоверное снижение частоты обнаруже-

ния диссеминированных клеток у животных, которым вводили антитела ($p=0,0011$).

Работа по изучению диссеминированных опухолевых клеток, проводимая в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, свидетельствует о высокой частоте поражения костного мозга при эпителиальных опухолях даже на ранних стадиях, например, при РМЖ — примерно 30% [20]. Несомненно, эта группа больных представляется наиболее перспективной для разработки методов адоптивной терапии, основанных на применении естественных антител к Le^c с учетом экспрессии данного антигена на опухолях и титров естественных антител в сыворотке крови.

Исследования в области естественного гуморального иммунитета на основе точного соотношения антительной специфичности (анти-Le^c) с профилем экспрессии гликана на опухолевых клетках и иммунологического стадирования (определение изолированных раковых клеток в костном мозгу) позволяют выделить группу пациенток (анти-Le^c/Le^{c+}), в которой целесообразно изучение возможностей адоптивной терапии для восполнения дефицита антител к Le^c, что может быть полезным в профилактике развития отдаленных метастазов у больных. В конкретном случае с антигеном Le^c в числе направлений адоптивной терапии могут быть рассмотрены разрешенные к клиническому применению препараты Ig (например, пентаглобин) с высокими титрами антител к Le^c, а также получение моноклональных человеческих антител к Le^c.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vollmers H.P., Brandlein S. Nature's best weapons to fight cancer. Revival of human monoclonal IgM antibodies. *Hum Antibodies* 2002;11(2):131—42.
2. Brandlein S., Vollmers H.P. Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity. *Histol Histopathol* 2004;19(3):897—905.
3. Vollmers H.P., Brandlein S. Natural IgM antibodies: from parias to parvenus. *Histol Histopathol* 2006;21(12):1355—66.
4. Vollmers H.P., Brandlein S. Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Histol Histopathol* 2006;21(5):755—65.
5. Bohn J. Are natural antibodies involved in tumour defence. *Immunol Lett* 1999;69(3):317—20.
6. Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 2000;37(18):1141—9.
7. Kasaian M.T., Casali P. Autoimmunity-prone (CD5 B) cells, natural antibodies and self-recognition. *Autoimmunity* 1993;15(4):315—29.
8. Bofill M., Janossy G., Janossa M. et al. Human B-cell development. II. Subpopulations in human fetus. *J Immunol* 1985;134(3):1531—8.
9. Brandlein S., Pohle T., Ruoff N. et al. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* 2003;63:7995—8005.
10. Pohle T., Brandlein S., Ruoff N. et al. Lipoptosis: a tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation. *Cancer Res* 2004;64:3900—6.
11. Rye P.D., Walker R.A. Prognostic value of breast cancer-associated glycoprotein detected by monoclonal antibody Lu-BCRU-G7. *Eur J Cancer* 1994;30(7):1007—12.
12. Rye P.D., Bovin N.V., Vlasova E.V., Walker R.A. Monoclonal antibody LU-BCRU-G7 against a breast tumor-associated glycoprotein recognizes the disaccharide Gal beta1-3GlcNAc. *Glycobiology* 1995;5(4):385—9.
13. Тупицын Н.Н., Летягин В.П., Паниченко А.В. и др. Новые иммунологические маркеры (CD71, LU-BCRU-G7), взаимосвязанные с прогнозом рака молочной железы. *Совр онкол* 2001;3(4):161—3.
14. Тупицын Н.Н., Галанина О.Е., Бовин Н.В. и др. Уровень специфических антител к углеводному антигену Le^c понижен у больных раком молочной железы. *Иммунология* 2008;2(3):31—3.
15. Tupitsyn N.N., Kadagidze Z.G., Tuichiev I.K. et al. Relationship between semiquantitative and quantitative parameters of local immune response in gastric cancer. *Exper oncol* 1995;17:31—6.
16. Rye P.D., Bovin N.V. Selection of carbohydrate-binding cell phenotypes using oligosaccharide-coated magnetic particles. *Glycobiology* 1997;7(2):179—82.
17. Vollmers H.P., Zimmerman U., Krenn U. et al. Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: first clinical and histopathological results. *Oncol Rep* 1998;5:549—52.
18. Beutner U., Lorenz U., Illert B. et al. Neoadjuvant therapy of gastric cancer with human monoclonal IgM antibody SC-1: impact on immune system. *Oncol Rep* 2008;19:761—9.
19. Illert B., Otto C., Vollmers H.P. et al. Human antibody SC-1 reduces disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer. *Oncol Rep* 2005;13(4):765—70.
20. Крохина О.В., Летягин В.П., Тупицын Н.Н. и др. Иммуноцитологическая диагностика микрометастазов рака молочной железы в костный мозг. *Иммуногемопоз* 2007—2008;5—6:116—31.