



ВЛИЯНИЕ *IN VITRO* ХИМИОПРЕПАРАТОВ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ 24-ЧАСОВОГО ИНКУБИРОВАНИЯ

С.Н. Наврузов, Л.Т. Алимходжаева

Республиканский онкологический научный центр МЗ Республики Узбекистан, Ташкент

IN VITRO EFFECTS OF CHEMICAL AGENTS ON BREAST TUMOR CELLS UNDER 24-HOUR INCUBATION

S.N. Navruzov, L.T. Alimkhodzhaeva

Republican Cancer Research Center, Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan

The use of cytostatics is frequently limited due to their high toxicity and inadequate selectivity. This makes one search for adjuvant treatments to limit tumor growth and extent, to eliminate traditional chemotherapy sequels, and to ensure stable and prolonged remission. This investigation has revealed the specific features of using natural and recombinant cytokines in combination with chemical agents in therapy for malignancies. The findings open up new vistas for the treatment of malignancies with natural cytokines.

В настоящее время постоянно расширяется спектр медикаментозных средств (интерферон и другие цитокины) для лечения онкологических больных, но не существует единого мнения о терапевтических преимуществах этих средств и практически отсутствуют стандартизированные схемы их использования в сочетании с традиционной терапией [1–3]. В то же время достаточно убедительно теоретически обосновано применение для лечения злокачественных новообразований ЛАК-терапии (терапия лимфоцин-активированными киллерами), позволяющей достоверно повысить противоопухолевую активность лимфоцитов, осуществляющих киллерную функцию. Тем не менее методика получения ЛАК-клеток сложна и громоздка, поскольку заключается в необходимости длительного (2–6 сут) культивирования моноклеидов с высокими дозами интерлейкина-2 (ИЛ-2), при этом важно, чтобы интерферон не влиял на индукцию ЛАК. Получить подобные условия можно только *in vitro*, так как длительное системное введение ИЛ-2 вызывает большое число побочных эффектов у пациентов и часто не приводит к желаемому результату [4, 5].

Другим, более перспективным методом, на наш взгляд, является восстановление функции лимфоцитов с использованием ультразвукового и гравитационного воздействий. Методика выделения фактора стимуляции лимфоцитов, разработанная в нашем центре, показала высокую эффективность восстановления утраченной или ослабленной функции иммунных клеток как *in vitro*, так и в клинических условиях лечения лекарственных и лучевых иммунодефици-

тов более чем у 300 онкологических больных с запущенными опухолями различной локализации. Непосредственные и отдаленные наблюдения за больными доказали абсолютную безопасность метода, поскольку фактор стимуляции выделяется из аутологичной лейкомазсы и его повторное введение не вызывает антигенной реакции, что, как правило, всегда позволяет применять рекомбинантные цитокины. В то же время вопрос об использовании этой методики в схеме противоопухолевой терапии остается открытым. Поэтому основной задачей исследования стало изучение возможности применения метода экстракорпорального лечения крови с вариантом модифицированной ЛАК-терапии в схеме неoadъювантной терапии местно-распространенного рака молочной железы (РМЖ).

Изучение морфологической структуры опухоли 28 больных РМЖ показало, что избранные воздействия существенно различаются по характеру и выраженности изменений (см. таблицу).

В 1-й серии эксперимента после обработки *in vitro* опухоли циклофероном отмечены повышение числа митозов — МИ — $2,5 \pm 0,4\%$ и незначительная индукция апоптоза — АИ — $2,1 \pm 0,38\%$ (рис. 1).

*Влияние in vitro химиопрепаратов
на опухолевые клетки молочной железы
в условиях 24-часового инкубирования*

Группа/воздействие (n=1400 клеток)	МИ, %	АИ, %
1. Опухоль + циклоферон	$2,5 \pm 0,41^*$	$2,1 \pm 0,38^*$
2. Опухоль + доксорубин	$0,6 \pm 0,20^*$	$1,5 \pm 0,32^*$
3. Опухоль + доксорубин + циклоферон	$1,4 \pm 0,31^*$	$3,6 \pm 0,49^*$
4. Опухоль + доксорубин + аутосыворотка УЗО	$0,2 \pm 0,11$	$2,8 \pm 0,44^*$
5. Опухоль + аутосыворотка УЗО	0	$8,1 \pm 0,72$

Примечание. * $p < 0,05$, сравнение с V серией. УЗО — ультразвуковая обработка; МИ — митотический, АИ — апоптотический индексы.

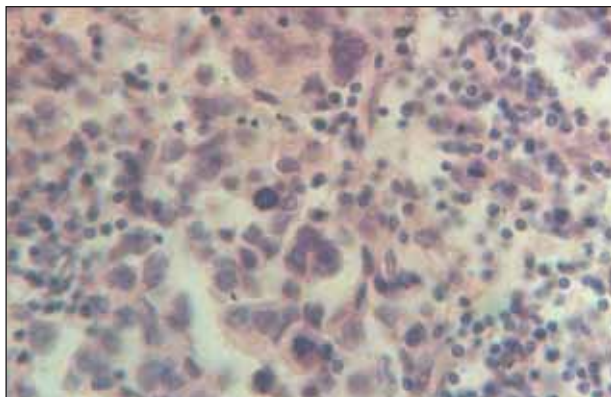


Рис. 1. Участок опухоли молочной железы после 24-часового инкубирования в питательной среде RPMI-1640 с добавлением циклоферона. Видны нормальные и патологические метафазы (в центре и справа), внизу апоптоз в опухолевых клетках. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение около 10, общее — 40

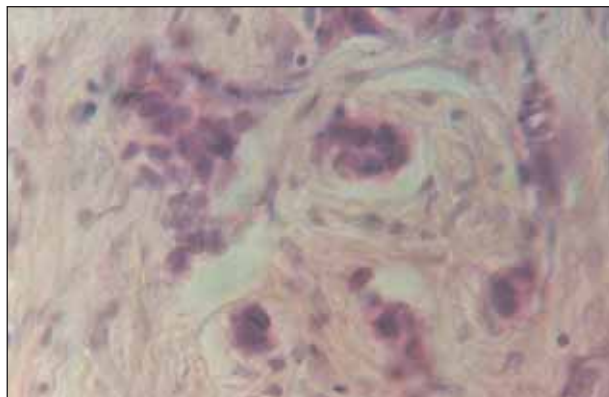


Рис. 2. Участок опухоли молочной железы после 24-часового инкубирования в питательной среде RPMI-1640 с добавлением доксорубина. Видны некротические и апоптотические погибшие клетки (в центре, вверху и справа). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение около 10, общее — 40

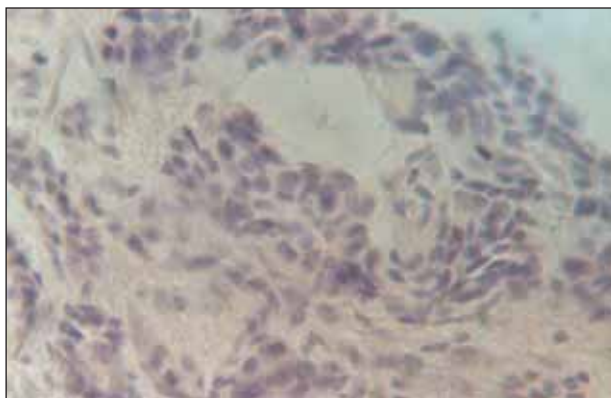


Рис. 3. Участок опухоли молочной железы после 24-часового инкубирования в питательной среде RPMI-1640 с доксорубином и циклофероном. Видны единичные митозы (справа), гиперхромия и пикноз ядер, отек и разрушение стромы опухоли. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение около 10, общее — 40

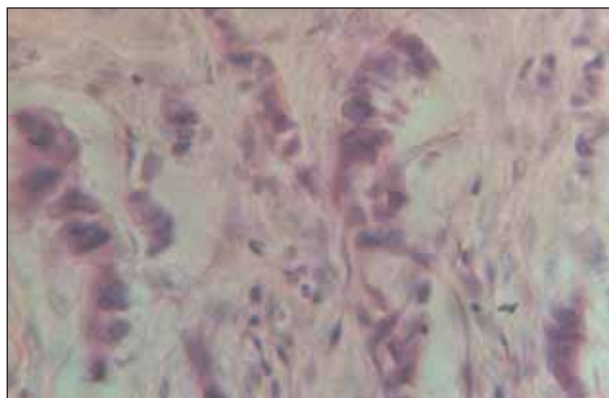


Рис. 4. Участок опухоли молочной железы после 24-часового инкубирования в питательной среде RPMI-1640 с доксорубином и аутоывороткой после УЗО. Дезорганизация и отек стромы опухоли, некротическая и апоптотическая гибель клеток (апоптотические тела справа вверху). Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение около 10, общее — 40

Во 2-й серии эксперимента под действием доксорубина количество делящихся клеток значительно снизилось (МИ 0,6%), а выраженность апоптоза нарастала (АИ $1,5 \pm 0,32\%$). Одновременно определялось токсическое повреждение клеток при относительном сохранении стромы опухоли (рис. 2).

В 3-й серии эксперимента совместное действие на опухоль доксорубина и циклоферона сопровождалось повышением числа митозов ($1,4 \pm 0,3\%$) и увеличением выраженности апоптоза ($3,6 \pm 0,5\%$). При этом выявлялись множественные токсические повреждения клеток, гиперхромия ядер, пикноз и признаки разрушения стромы (рис. 3).

В 4-й серии при воздействии на опухоль доксорубина и сыворотки из аутокрови после УЗО наблюдалось резкое снижение деления клеток (МИ 0,2%) относительно всех предшествующих вариантов. При этом отмечалось возрастание АИ (2,8%) и одновременно обнаруживались множест-

венные некротические участки клеток и дезорганизация стромы опухоли (рис. 4).

Наиболее интересны результаты, полученные в 5-й серии эксперимента, где на опухоль воздействовали только сывороткой из аутокрови, обработанной по специальной методике. При этом процесс деления клеток (МИ 0) практически прекращался, а апоптоз возрастал до 114/1400 (АИ $8,1 \pm 0,7\%$), что достоверно превышает наиболее оптимальный результат, полученный в 4-й серии эксперимента ($p < 0,05$). Все это происходило на фоне появления множественных деструктивных изменений и почти тотальной гибели клеток по типу некроза и апоптоза при сохранении стромы опухоли (рис. 5).

Таким образом, в результате полученных данных выявлен целый ряд особенностей использования естественных и рекомбинантных цитокинов в сочетании с химиопрепаратами в лечении злокачественных опухолей. Обнаружение отчетливого снижения противоопухолевого эффекта при совме-

стном использовании циклоферона и доксорубицина, на наш взгляд, требует более осторожного использования этого иммуномодулятора одновременно с полихимиотерапией в клинических условиях. В то же время достоверное и своеобразное противоопухолевое совместное действие доксорубицина и цитокинов, выделенных из аутокрови, указывает на реальную возможность и целесообразность применения этой методики в лечении РМЖ.

Результаты, полученные в 5-й серии эксперимента, где сыворотка из аутокрови вызывает практически полную остановку деления клеток и сопровождается индукцией апоптоза (АИ 8,1%, $p < 0,05$) и некроза в опухоли (по-видимому, за счет высвобождения из лимфоцитов фактора некроза опухоли), открывают совершенно новые перспективы в лечении злокачественных опухолей с использованием естественных цитокинов.

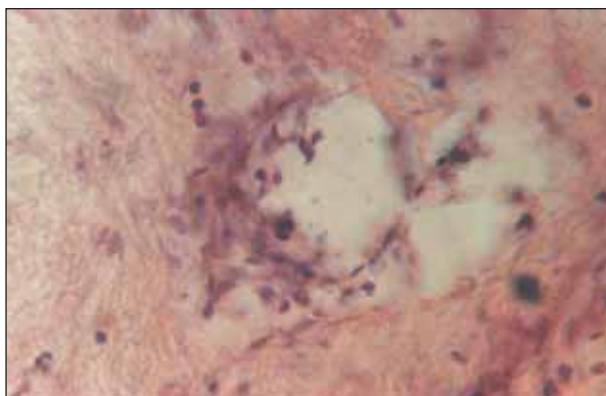


Рис. 5. Участок опухоли молочной железы после 24-часового инкубирования в питательной среде RPMI-1640 с аутосывороткой после УЗО. В центре некротическая гибель клеток, справа и слева апоптотическая гибель клеток. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение около 10, общее — 40

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронцова А.Л. Исследование возможной роли интерферона в сопротивляемости клетки процессу злокачественной трансформации. В кн.: Канцерогенез, методы диагностики и лечения опухолей. Киев, 1971. с. 37—8.
2. Воронцова А.Л. Роль интерферона в противоопухолевой резистентности. Экспер онкол 1989;6(11):49—54.
3. Воронцова А.Л., Гаврина Г.Б., Кудрявец Ю.И., Захарычев В.Д. Сывороточный тест для определения риска появления метастазов у онкологических больных. Экспер онкол 1991;(13):25—7.
4. Воронцова А.Л., Кудрявец Ю.И., Фадеев В.А. Влияние интерферона на токсический эффект и противоопухолевую активность винбластина при комбинированной терапии метастазирующей карциномы Льюис. Экспер онкол 1984;(6):54—7.
5. Воронцова А.Л., Кудрявец Ю.И., Фадеев В.А., Балицкий К.П. Антиметастатическое действие интерферона при хирургическом удалении экспериментальных опухолей. Экспер онкол 1983;(5):45—9.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ НЕОАДЪЮВАНТНОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С УЧЕТОМ ИММУНОФЕНОТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.А. Субботина, В.П. Лetyagin, Н.Н. Тупицын, И.В. Высоцкая, В.Д. Ермилова

НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва;
кафедра онкологии ММА им. И.М. Сеченова

ANALYSIS OF THE RESULTS OF NEOADJUVANT TREATMENT IN PATIENTS WITH CONSIDERATION FOR THE IMMUNOPHENOTYPICAL FEATURES OF BREAST CANCER

A.A. Subbotina, V.P. Letyagin, N.N. Tupitsyn, I.V. Vysotskaya, V.D. Yermilova

Research Institute of Clinical Oncology, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow; Department of Oncology, I.M. Sechenov Moscow Medical Academy

The efficiency of neoadjuvant chemotherapy is directly related to the expression of CD95 (FAS/APO-1) apoptosis receptor on cancer cells, which is confirmed with the pathomorphism and changes of CD95-positive cells during neoadjuvant chemotherapy (the most effective CAF regimen is cyclophosphan, doxorubicin, and 5-fluorouracil).

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных заболеваний среди женщин. В странах СНГ в 2005 г. его доля составила 17—20%, в России — 30—35% [1]. Ежегодно в мире выявляют около 1 млн новых случаев РМЖ, а к 2010 г. ученые прогнозируют рост заболеваемости до 1,45 млн [2]. Именно поэтому лечение РМЖ — одна из наиболее актуальных проблем в современной клинической онкологии.

В исследованиях РМЖ в настоящее время широкое распространение получили молекулярно-биологические характеристики клеток первичной опухоли: экспрессия различных онкогенов, факторов роста и их рецепторов, молекул, регулирующих апоптоз, рецепторов эстрогенов и прогестерона. Многие из этих показателей являются важными при выборе тактики ведения больных, так как тесно связаны с результатами лечения и прогнозом заболевания. Уровень дифференци-