

Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова
ЦЕНТР МАГНИТНОЙ ТОМОГРАФИИ И СПЕКТРОСКОПИИ

А.Ю. Юдина, А.А. Богданов-мл., Ю.А. Пирогов

**МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ
ТОМОГРАФИЯ
В ИЗУЧЕНИИ АНГИОГЕНЕЗА
И ЕГО МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

Под редакцией
проф. Ю.А. Пирогова



Москва
Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова
2008

ЮДИНА А.Ю., БОГДАНОВ-мл. А.А., ПИРОГОВ Ю. А.

Магнитно-резонансная томография в изучении ангиогенеза и его молекулярных маркеров / Под ред. Ю.А.Пирогова. – М.: Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 2008. – 144 с.

ISBN 978-5-8279-0079-5

Эта книга познакомит читателя с новым направлением междисциплинарных исследований – молекулярной визуализацией, то есть визуализацией и количественной оценкой процессов, происходящих на молекулярном и клеточном уровнях в живом организме. На примере работ авторов в области изучения опухолевого ангиогенеза и его молекулярных маркеров, с теоретическими обоснованиями и подробными протоколами, дается представление о молекулярной визуализации в целом, ее роли в биомедицинских исследованиях. Хочется подчеркнуть мультидисциплинарность этого направления науки, мультимодальный подход – объединение таких методов визуализации, как ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография), ультразвуковые исследования, оптические методы (биолюминесценция, флуоресценция), МРТ (магнитно-резонансная томография). Последние модальности широко используются в представленной работе, задачей которой является разработка и испытание новых методов контрастирования и контрастных агентов для МРТ, дающих возможность неинвазивно оценивать объем крови в опухоли и экспрессию рецепторов опухолевыми клетками. Возможные приложения – ранняя диагностика и типирование новообразований, составление индивидуального профиля опухоли для оптимального подбора терапии, неинвазивная и быстрая оценка эффективности анти-ангиогенных препаратов.

Возможно, многие поймут себя на мысли, что элементы молекулярной визуализации присутствуют в их собственных проектах или входят в круг интересов, хотя как направление в целом эта дисциплина в России известна пока мало (в области МРТ работы в этой направлении начаты в Центре магнитно-резонансной томографии и спектроскопии МГУ, директор Ю.А.Пирогов). В числе прочих, целью книги является изложить совокупность методов и представлений, известных под названием молекулярной визуализации, на примере конкретных исследований, проведенных в Исследовательском центре молекулярной визуализации (Center for Molecular Imaging Research), Бостон, США и Медицинской Школы Гарвардского Университета (Harvard Medical School), Вустер, США под руководством А.А.Богданова-мл. тогда еще аспиранткой ЦМТС МГУ А.Ю.Юдиной. Помимо авторов этой книги, в работе принимали участие сотрудники указанных выше учреждений, которым авторы выражают свою благодарность.

ISBN 978-5-8279-0079-5

© Ю.А. Юдина, А.А.Богданов-мл., Ю.А.Пирогов, 2008 г.

© Центр магнитной томографии и спектроскопии
МГУ имени М.В. Ломоносова, 2008 г.

© Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 2008 г.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	6
От редактора издания	7
Сокращения	11
Введение	12
Глава I. ОПУХОЛЕВЫЙ АНГИОГЕНЕЗ И АНТИ-АНГИОГЕННАЯ ТЕРАПИЯ	
I.1. Ангиогенез: неперемное условие для роста ракового новообразования	16
I.1.1. Ангиогенез и онкогенез	16
I.1.2. Механизмы ангиогенеза	17
I.1.3. Особенности опухолевых сосудов	19
I.2. Биохимия ангиогенеза	22
I.2.1. Ангиогенный переключатель	22
I.2.2. Основной игрок: сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и его рецепторы	25
I.2.2.1. VEGF – ключевой фактор ангиогенеза (25). I.2.2.2 Семейство VEGF (27). I.2.2.3 Рецепторы VEGF (30). I.2.2.4 Регуляция экспрессии VEGF (32). I.2.2.5 Биологическое действие VEGF (34).	
I.2.3. Эпителиальный фактор роста и его рецептор	37
I.2.4. Обзор современных препаратов, направленных против рецепторов семейства Her	41
I.2.4.1. Моноклональные антитела к белкам семейства Her (ErbB) (41).	
I.2.4.2. Ингибиторы тирозин-киназной активности Her (43)	
I.2.5. Прочие про-ангиогенные факторы	45
I.3. Анти-ангиогенез и анти-ангиогенная терапия	48
I.3.1. Эндогенные анти-ангиогенные факторы	48
I.3.2. Обоснование анти-ангиогенной терапии	49
I.3.3. Обзор современных анти-ангиогенных препаратов	51
I.3.4. Гипотеза о нормализации сосудов. Потребность в надежных биомаркерах раннего ответа на анти-ангиогенную терапию	55
Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
II.1. Клеточная культура	58
II.2. Флуоресцентные пробы	58
II.3. Контрастные МР-агенты	58
II.3.1. Gd-DTPA: общеупотребительный в клинике контрастный агент ...	65
II.3.2. PGC-Gd: внутрисосудистый контрастный агент	67
II.3.3. Gd-DTPA-diSer	68

II.4. МР-релаксометрия в изучении ангиогенеза	69
II.4.1. Метод релаксометрии	70
II.4.2. Описание РЧ-последовательностей для релаксометрии	71
II.5. МР-оценка изменения объема крови в опухоли, проницаемости сосудов и прочих параметров методами МРТ	74
II.5.1. T1-метод оценки гемодинамических параметров. Описание последовательности SPGR	74
II.5.2. Опухолевые модели	76
II.5.3. Магнитно-резонансное исследование мышей и анализ данных	77
II.5.4. Радиоизотопное исследование по определению фракции эритроцитов для коррекции значений абсолютного объема крови	79
II.5.5. Коррекция значений Vb	80
II.5.6. Гистологические методы для подтверждения соответствия данных МРТ происходящим в тканях процессам	81
II.6. Визуализация молекулярных маркеров ангиогенеза и онкогенеза методом магнитно-резонансной амплификации	82
II.6.1. Метод магнитно-резонансной амплификации	82
II.6.2. Синтез конъюгатов HRP-mab425 и GO-mAb425 (mAb Clone 425, anti-EGFR, Merck R&D)	84
II.6.3. Определение концентрации белка методом ВСА	87
II.6.4. Электрофорез SDS-PAGE (с додецилсульфонатом натрия)	88
II.6.5. Определение молярного соотношения замещения	89
II.6.6. Гель-фильтрация (гель-хроматография)	90
II.6.7. Количественное определение EGFR на клеточной культуре (метод ELISA)	91
II.6.8. Тест конъюгатов на клеточной культуре (МРТ метод)	91
II.6.9. <i>In vivo</i> МРТ-эксперимент. Визуализация маркера карциномы L6 ..	94
 Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ	
III.1. Объем опухоли и объем крови в опухоли. Магнитно-резонансная томография ангиогенеза	96
III.2. Поправочные коэффициенты по гематокриту в опухолевой и мышечной ткани	104
III.3. Результаты гистологических исследований (изменения микрососудов в ответ на анти-ангиогенную терапию VEGFR2-TKI) .	105
III.3.1. Гистология препаратов контрольной группы	105
III.3.2. Гистология препаратов экспериментальной группы (терапия VEGFR2-TKI)	105
III.4. Характеристика и релаксационные свойства парамагнитного субстрата Gd-DTPA-diSer	110

III.5. Характеристика биоконъюгатов для специфичной визуализации молекулярных маркеров с помощью парамагнитного субстрата Gd-DTPA-diSer	112
III.6. <i>In vitro</i> исследования работы системы биоконъюгаты-парамагнитный субстрат	115
III.7. Визуализация молекулярных мишеней <i>in vivo</i>	120
Глава IV. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ГЕМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ОПУХОЛИ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОМАРКЕРОВ	
IV.1. Анализ гемодинамических параметров	122
IV.2. Визуализация молекулярных маркеров	125
Заключение	127
Литература	132

ПРЕДИСЛОВИЕ

Перед читателем лежит книга, посвященная новейшим разработкам в области молекулярной визуализации, недавно возникшего направления биомедицинских научных исследований. Главной особенностью этой методики является *in vivo* наблюдение процессов, происходящих в живом организме на молекулярном и клеточном уровне. До последнего времени такое было просто невозможно, и лишь с появлением высокопольных магнитно-резонансных томографов высокого разрешения осуществилась давняя мечта медиков и биологов – не нарушая естественный жизненный цикл испытуемого (человека или животного) следить за деятельностью его внутренних органов, развитием патологий и терапевтическим влиянием вводимого в организм фармпрепарата. Теперь при испытании новых лекарственных веществ на малых животных (необходимый этап проверки терапевтического эффекта) удастся без хирургического вмешательства на одном подопытном экземпляре осуществлять полный цикл наблюдения за функционально-морфологическими изменениями организма от нормы к патологии и до окончательной реакции на фармакологическое воздействие. Более того, молекулярная визуализация позволяет строго контролировать процессы целевой доставки лекарств в область патологических изменений – опухоль, ишемическое повреждение мозга, почек, сердечной мышцы и т.п. Формируя молекулы лекарственного препарата, содержащие необходимые биомаркеры и парамагнитные включения, можно обеспечивать и точное попадание биомаркера в экспрессированный патологией белок-мишень и за счет парамагнитной амплификации контраста определять посредством МРТ местоположение искомого белка-мишени. Очевидно, что методика молекулярной визуализации крайне необходима в современную эпоху постгеномных и протеомных биомолекулярных исследований, проведение которых немыслимо без *in vivo* экспериментов, подобных тем, что описаны в монографии.

Несмотря на то, что авторы этой книги в настоящее время работают не только в России (Ю.А.Пирогов – профессор МГУ имени М.В.Ломоносова), но и за рубежом (А.А.Богданов-мл. – профессор Гарвардского университета в США, А.Ю.Юдина – сотрудник Ме-

6

дицинского центра университета г. Бордо во Франции), все они, воспитанники Московского университета, представляют отечественную научную школу МРТ визуализации и развивают ее успехи в процессе плодотворной совместной деятельности. В связи с выходом данной книги в свет хочется пожелать им дальнейших достижений в этом перспективном научном направлении.

Директор НИИ

«Международный томографический центр» СО РАН,
Президент Центра магнитной томографии
и спектроскопии МГУ,
академик РАН *Р.З.Сагдеев*

30 сентября 2008 г.

ОТ РЕДАКТОРА ИЗДАНИЯ

Монография является первым в России изданием, специально посвященным новому направлению на стыке физики, химии, биологии и медицины – молекулярной визуализации, позволяющей *in vivo* наблюдать происходящие на молекулярном и клеточном уровне события в живом организме. К примеру, один из способов изучения живых организмов и разработки методов потенциальной терапии основан на применении молекулярных биомаркеров, специфичных к сверхэкспрессированным при патологическом процессе белкам живой ткани. Эти биомаркеры обеспечивают целевую доставку связанных с ними парамагнитных или суперпарамагнитных комплексов, создающих магнитно-резонансный контраст и, таким образом, позволяют определить местонахождение белка-мишени при помощи магнитно-резонансной томографии. Конечно, чувствительность МРТ не столь велика, чтобы детектировать сигналы отдельных молекул, но при достаточном уровне экспрессии белка-мишени они уверенно визуализируются и в этом смысле визуализируются молекулярно. Вместе с тем, существуют и другие способы молекулярной визуализации, реализуемые как с помощью МРТ, так и других методов, например, позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или оптических измерений. Последние чувствуют отклик и отдельных молекул, однако они также не лишены недостатков и требуют разработки специальных методик, которые в данной книге не обсуждаются.

Изучение онкологического ангиогенеза, связанного с формированием новых кровеносных сосудов на базе уже существующих, является одним из наиболее подходящих объектов для демонстрации предмета молекулярной визуализации. Образование солидных опухолей легко обнаруживается посредством МРТ измерений, технология маркировки предназначенных для целевой доставки биомолекул и терапии новообразований в основном разработана, присоединение контрастирующих парамагнитных атомов (гадолиния, железа и др.) также не представляет принципиальных трудностей. Подобные эксперименты стали особенно доступными с появлением в исследовательских центрах новейших биоспектротомографических приборов типа BioSpec с магнитным полем от 4 до 11 Тл. Их высокое пространственное разрешение (вплоть до 10 мкм) позволяет отчетливо наблюдать *in vivo* молекулярно-морфологические изменения во внутренних органах малых животных. В настоящее время такой технологией владеют многие зарубежные лаборатории в США, Европе, странах Юго-Восточной Азии. Появившийся недавно в Центре магнитной томографии и спектроскопии МГУ имени М.В.Ломоносова (ЦМТС МГУ) пока что единственный в России биоспектротомограф Bruker BioSpec 70/30 URS с магнитным полем 7 Тл и теплым отверстием 300 мм впервые позволил нам на современном научном уровне вести работы по молекулярной визуализации в области биологии, протеомных исследований, медицинской терапии, фармакологии, психофизиологии и др.

Значительную поддержку нашим исследованиям оказали научные связи с учеными университетов и медицинских центров Германии, Франции, Голландии, Италии и США, где уже накоплен богатый опыт работ по магнитно-резонансной томографии высокого разрешения в экспериментах на малых животных. Особенно плодотворной оказалась зарубежная стажировка одного из авторов монографии, Анны Юдиной, в Исследовательском центре молекулярной визуализации Гарвардской медицинской школы США (2005), а также работа в медицинских центрах университетов Утрехта и Лейдена в Голландии (2006) и в Центре молекулярной и функциональной визуализации г. Бордо во Франции (2008). Одновременно работы по молекулярной визуализации были начаты и в ЦМТС МГУ также с участием в постановке и проведении экспериментов доктора А.Ю.Юдиной. Настоящая монография написана, главным образом, на основе результатов, полученных ею, тогда

еще аспиранткой ЦМТС МГУ, во время годичной командировки в США, где она работала в лаборатории профессора А.А.Богданова-мл. Именно ему принадлежит большинство идей описанных здесь экспериментов по применению методов МРТ для исследования онкоангиогенеза и терапии раковых заболеваний. Продолженные в МГУ, эти исследования легли в основу сначала диссертации, защищенной А.Ю.Юдиной на кафедре биофизики физфака МГУ, а затем и данной монографии, которая, как мы надеемся, будет полезна российским коллегам, занятым проблемами онкологии, ангиотерапии, томографической диагностики, решением фундаментальных задач в области постгеномных и протеомных исследований.

О перспективности и актуальности направления молекулярной визуализации свидетельствует создание в последние годы ряда профильных научно-общественных объединений. Таковыми являются, например, Научное общество молекулярной визуализации (Society for Molecular Imaging – SMI), Европейское общество молекулярной визуализации (European Society of Molecular Imaging – ESMI), Академия молекулярной визуализации (Academy of Molecular Imaging – AMI), Федерация азиатских обществ молекулярной визуализации (Federation of Asian Societies of Molecular Imaging – FASMI) и др. Также была образована секция молекулярной визуализации в наиболее авторитетной ассоциации исследователей магнитного резонанса – Международном обществе магнитного резонанса в медицине (ISMRM), членом которой является Анна Юдина, а Алексей Алексеевич Богданов-мл. занимает должность программного директора в Руководящем совете секции. Уже несколько лет в США издается научный журнал «Molecular Imaging», в редколлегии которого также состоит А.А.Богданов-мл.

В настоящий момент работы по молекулярной визуализации в МГУ успешно развиваются. Получены впечатляющие результаты в *in vivo* экспериментах по фармакокинетике капсулированных магнитно-активных нанолекарств, транспорту мезенхимальных стволовых клеток, меченых визуализирующими парамагнитными ионами, целевой доставке фармпрепарата в глиомную опухоль головного мозга крысы и др. Так, например, с помощью биоспектротомографа BioSpec 70/30 в опытах на малых животных удается отчетливо наблюдать процесс перемещения стволовых клеток, введенных в здоровое полушарие головного мозга подопытной

крысы, в полушарие, пораженное инсультом, купирование стволовыми клетками пораженного участка и функциональное восстановление мозговой деятельности. Важным достоинством метода является возможность в течение длительного срока (порядка месяца) проводить эксперимент *in vivo* на одном и том же экземпляре подопытного животного, поэтапно изучая как развитие патологии, так и эффекты воздействия на нее исследуемого фармпрепарата.

Такие эксперименты принципиально являются кросс-дисциплинарными и требуют участия специалистов самого различного профиля – медиков, биохимиков, физиков, специально подготовленных операторов-исследователей. Авторы выражают глубокую благодарность всем, кто участвовал в подготовке и проведении описанных в монографии работ – сотрудникам Центра магнитной томографии и спектроскопии МГУ, Исследовательского центра молекулярной визуализации (CMIR, США), Российского онкологического центра РАМН, Московского института имени Сербского и Российского государственного медицинского университета.

Директор ЦМТС МГУ
профессор *Ю.А.Пирогов*
28 сентября 2008 г.

СОКРАЩЕНИЯ

ЭКМ – экстраклеточный матрикс
VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста
uPA – урокиназный активатор плазминогена
uPAR – рецептор uPA
ТТРА - активатор плазминогена тканевого типа
КОК – карцинома ободочной кишки
ГШ – рак головы и шеи
НМКРК – немелкоклеточный рак легкого
ПЖ – рак поджелудочной железы
ПЧ – рак почки
ЯИ – рак яичников
ШМ – рак шейки матки
ГР – рак груди
ПР – рак предстательной железы
ИТКА – ингибитор тирозин-киназной активности; то же, что TKI – tyrosine-kinase inhibitor
q - число молекул воды, непосредственно координированных с ионом Gd
 τ_m - корреляционное время обмена
 τ_r - корреляционное время вращения
 τ_d - корреляционное время диффузии, характеризующее передачу релаксации окружающим комплекс молекулам воды
In vivo – в живом организме
In vitro – «в пробирке», вне живого организма
In utero – в матке (в пренатальном периоде)
De novo – заново

ВВЕДЕНИЕ

Ангиогенезом называют формирование новых сосудов на базе существовавших ранее. Более 25 лет назад Judah Folkman впервые сформулировал основные положения теории взаимосвязи ангиогенеза и онкогенеза [1]: (i) большинство первичных солидных опухолей проходит через стадию небольшой аваскулярной массы (размерами 1-2 мм в диаметре), могущей длительное время находиться в неактивном, «спящем» состоянии (при этом кислород и питательные вещества доставляются в процессе пассивной диффузии); (ii) эти микрообразования каким-то образом могут «включить» ангиогенез, заставляя окружающие сосуды выпускать «ростки» в сторону опухоли, которые впоследствии интегрируются в опухолевую массу (тем самым новообразование получает возможность роста и метастазирования – через кровоток); (iii) ангиогенный «переключатель» активируется при помощи семейства эндогенных белков, факторов роста; (iv) рост опухоли можно остановить путем блокирования ангиогенеза либо через «переключатель», либо напрямую разрушая эндотелиальные клетки новых сосудов (последний подход предполагает, что новообразованные сосуды по своей структуре и клеточному составу отличаются от зрелых «обычных» сосудов); (v) будучи успешным, такой терапевтический подход направлен на лишение раковой опухоли возможности расти и метастазировать; в лучшем случае это может привести к ее регрессу до 1-2 мм в диаметре и достижению «спящей» стадии, когда ее существование уже не зависит от наличия кровеносной сети.

В настоящее время анти-ангиогенная терапия является одним из самых перспективных направлений в терапии раковых заболеваний, причем особенно эффективен «двойной удар» - совместно с цитотоксической терапией, направленной против опухолевых клеток. Идут клинические испытания эндогенных ингибиторов ангиогенеза (эндостатин, ангиостатин, тромбоспондин), антител против ключевых ангиогенных факторов (VEGF, интегрины) и низкомолекулярных ингибиторов тирозин-киназной активности их рецепторов (VEGFR2-ТКИ). Первый анти-VEGF препарат (bevacuzimab, Genentech, Inc., San Francisco, CA) уже одобрен в США для лечения

метастатического рака кишечника совместно с химиотерапией, десятки препаратов находятся на различных стадиях клинических испытаний.

Особо остро встает вопрос об эффективном мониторинге действия анти-ангиогенных препаратов при клинических испытаниях для определения оптимальной биологически активной дозы и «временного окна» для введения. Пока, несмотря на явные положительные результаты, клинические исследования ингибиторов ангиогенеза не оправдали радужных перспектив, возникших после преклинических испытаний. По крайней мере, частично это обусловлено сложностью дизайна клинических исследований в этой области. Терапия не цитотоксична – это благоприятно для пациента, но определение оптимальных биологически активных доз и оценка ответа на терапию представляют большую проблему. Подход, применяемый в химиотерапии (максимально возможная доза), является неприемлемым для анти-ангиогенной терапии, поскольку а) побочные эффекты этих лекарств все еще непредсказуемы и б) наиболее эффективная доза может быть намного меньше максимальной. С другой стороны, оценка оптимальной дозы по измерению уменьшения размеров опухоли или времени прогресса болезни не представляется практически обоснованной, поскольку сам механизм действия анти-ангиогенных препаратов таков, что до появления видимого уменьшения размеров опухоли могут пройти многие месяцы и даже годы. Кроме того, в большинстве случаев раковые опухоли крайне гетерогенны и поэтому индивидуальные особенности будут иметь очень большое влияние на исход терапии. Следовательно, для получения статистически достоверных результатов нужны систематические, охватывающие большое число пациентов, а следовательно, очень дорогостоящие клинические исследования.

Таким образом, возникает потребность в определении надежных биомаркеров раннего ответа на анти-ангиогенную терапию, по которым можно будет предсказать последующий клинический эффект. Такие биомаркеры будут полезны не только для облегчения клинических исследований новых препаратов, но и для определения индивидуальной схемы лечения для каждого пациента.

Выше уже упоминалось длительное время, необходимое для видимых морфологических изменений в опухоли. Несмотря на то, что клинический ответ на терапию ингибиторами ангиогенеза является медленным, некоторые метаболические и физиологические

изменения можно зафиксировать уже вскоре после начала лечения. Поскольку терапия ингибиторами ангиогенеза направлена на аномальные опухолевые сосуды, то естественно предположить, что роль маркеров играют такие гемодинамические параметры, как объем крови в опухоли, поток крови через опухоль, проницаемость опухолевых сосудов и их плотность. Еще одним подходом является дизайн контрастных агентов, взаимодействующих с молекулярными маркерами ангиогенеза. Поскольку ингибиторы ангиогенеза специфичны по отношению к определенным ангиогенным молекулам (VEGF, EGFR, $\alpha\beta3$) или же косвенным способом направлены на подавление их активности, то оценка изменения количества в опухоли даст представление о ходе терапии. Также показано, что эти факторы могут представлять собой диагностическую и прогностическую ценность. Помимо прочего, для индивидуализации терапии было бы крайне ценным так называемое «типирование» опухолей, то есть создание индивидуального профиля по ключевым молекулярным маркерам. Мониторинг этих факторов в процессе лечения был бы также крайне полезен.

Самым простым способом, позволяющим следить за терапевтическим эффектом, является биопсия опухоли. Однако частое изъятие биопсийного материала из опухоли многие медики считают слишком обременительным для пациентов. Намного более предпочтительной была бы неинвазивная методика исследования новообразования. При биопсии гетерогенность опухоли не позволяет надеяться увидеть картину в целом, а не локально, да и погрешность в зависимости от области опухоли будет велика. Возникает потребность в воспроизводимой методике, которая бы позволяла проводить мониторинг всей опухоли в целом или отдельных ее областей.

Магнитно-резонансная томография (МРТ) является незаменимым инструментом при изучении ангиогенеза *in vivo*, поскольку а) это неинвазивная методика; б) она позволяет делать множество повторных воспроизводимых снимков с хорошим анатомическим разрешением; в) не сопровождается ионизирующим излучением; г) позволяет измерять абсолютный объем крови, изменение которого предшествует регрессу опухоли. Современные достижения в молекулярной МРТ также позволяют неинвазивно исследовать молекулярные мишени, однако возможности визуализации молекулярных биомаркеров рака и нео-ангиогенеза пока являются ограничен-

ными. В данной работе изложены основы и молекулярная биология ангиогенеза, дан обзор современных анти-ангиогенных препаратов, а также обсуждаются стратегии дизайна контрастных агентов для визуализации ангиогенеза и онкогенеза на клеточном уровне при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ). Экспериментальная часть работы посвящена оценке анти-ангиогенной терапии при помощи внутрисосудистого контрастного агента, а также разработке и испытанию на клеточных культурах и животных новых контрастных препаратов для молекулярной магнитно-резонансной томографии.

Глава I ОПУХОЛЕВЫЙ АНГИОГЕНЕЗ И АНТИ-АНГИОГЕННАЯ ТЕРАПИЯ

I.1. Ангиогенез как необходимое условие роста опухоли

I.1.1. Ангиогенез и онкогенез

Ангиогенезом, повторим, называют формирование новых сосудов на базе существовавших ранее. В эмбриональном развитии этот процесс дополняет васкулогенез, при котором эндотелиальные клетки развиваются из клеток-предшественников [1,2]. Как мы видим, ангиогенез не всегда является чем-то нежелательным – напротив, для многих жизненно важных событий этот процесс вполне естественен [3,4]. Формирование сосудов необходимо при эмбриогенезе, заживлении ран, при менструальном цикле. Примечательно, что за исключением работы женской репродуктивной системы в организме взрослого млекопитающего ангиогенез находится в неактивном, «спящем» состоянии. Помимо клеток центральной нервной системы эндотелиальные клетки являются одними из самых долгоживущих (в любое отдельно взятое время в сосуде взрослого только 1 клетка эндотелия из 10 000 или 0,1% находится в цикле деления). Для эпителия кишечника это соотношение составляет 1 400 или 14%, то есть время обновления измеряется днями, в то время как для эндотелия сосудов – годами. В этих условиях ангиогенез характеризуется высокой степенью регуляции. Это значит, что он «включается» на короткое время (порядка дней), а потом также целенаправленно «выключается». Если же тонкий баланс про- и антиангиогенных факторов нарушен, то такой тип уже нерегулируемого, постоянного ангиогенеза характерен для патологических процессов: псориаза, диабетической ретинопатии, раковых заболеваний [5]. При артрите новые капилляры буквально «вторгаются» в сустав, разрушая хрящ. При диабете поражают стекловидное тело, и микрокровоотечения приводят к слепоте (глазная неоваскуляризация служит основной причиной потери зрения при более чем 20 заболеваниях). Ангиогенез является также необходимым условием для роста и метастазирования раковых новообразований [1, 2, 3, 6].

Для того, чтобы выжить, клеткам млекопитающих нужен кислород и питательные вещества: поэтому необходимым условием их выживания является наличие кровеносных сосудов на расстоянии 100-200 мкм – предел для диффузии кислорода [6]. Раковые клетки – это, в сущности, производные клеток ткани, которые утратили способность регуляции роста и потому характеризуются аномальной пролиферацией. И хотя некоторыми особенностями они отличаются от своих «неизмененных собратьев», во многих аспектах опухолевые и нормальные клетки довольно схожи. А именно – им также требуются кислород и питательные вещества вместе с возможностью удаления продуктов метаболизма, а значит – кровеносные сосуды.

I.1.2. Механизмы ангиогенеза

В эмбриогенезе сосуды формируются *de novo* из эндотелиальных прекурсоров (васкулогенез). Эндотелиальные клетки дифференцируются и размножаются в лишенной сосудов ткани, пока не объединяются и не формируют примитивную сосудистую сеть [7]. В нее входят основные сосуды эмбриона, такие как аорта и наиболее крупные вены, соединенные наподобие ячеек в пчелиных сотах. Изменение архитектуры сосудистой сети, такое как усложнение структуры, увеличение как самих сосудов, так и их числа, вызывается «включением» ангиогенных факторов. Через ангиогенное ремоделирование, которое включает в себя «обрезание» излишних «ветвей» и укрупнение оставшихся сосудов, и развивается характерная для зрелой сосудистой сети структура [8]. У взрослого человека новые сосуды формируются, в основном, именно через ангиогенез (а не васкулогенез). Эти же (то есть ангиогенные) процессы происходят и при формировании сосудистой сети опухоли.

Всего в арсенале опухоли есть четыре механизма получения и интеграции сосудов (Рис. 1) [9]. Опухоль может образовываться вблизи какого-либо сосуда, который теперь будет доставлять ей кислород и питательные вещества (co-option). Сосудистая сеть расширяется при помощи «эндотелиальных побегов», которые выпускаются в опухоль. Сосуды опухоли ремоделируются при помощи вставок из элементов межклеточной ткани в сосудистую оболочку, расширяя, таким образом, существующий сосуд. Попадающие в опухоль из костного мозга или периферического кровотока

предшественники эндотелиальных клеток (ангиобласты) выстилают опухолевые сосуды, ускоряя их рост и созревание [8,9].

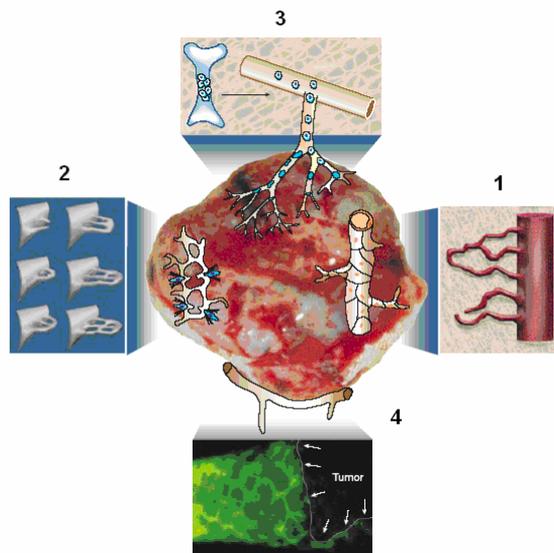


Рис. 1 [9]. Клеточные механизмы ангиогенеза в опухоли: 1) путем «эндотелиальных побегов»; 2) путем «вставок» в сосудистую оболочку 3) путем попадания в опухоль эндотелиальных предшественников (ангиобластов) 4) путем «захвата» существовавших ранее сосудов (co-option)

Ангиогенез проходит в несколько этапов. Сначала основная мембрана разрушается под действием протеаз и эндотелиальные клетки мигрируют в межклеточное пространство, формируя так называемые «эндотелиальные побеги». На острие такого «побега» происходит интенсивное размножение эндотелиальных клеток. Затем при участии перицитов формируются сосудистая оболочка и основная мембрана, анастомозы, и, наконец, налаживается кровоток [9,10]. Два основных варианта опухолевого ангиогенеза приведены на Рис. 2.

Ангиогенный ответ микрососудов характеризуется изменением клеточной адгезии между расположенными рядом эндотелиальными клетками, перицитами и экстраклеточным матриксом (ЭКМ) [11]. Во время процесса активной неоваскуляризации клетки эпителия ремоделируют свой цитоскелет, экспрессируют молекулы поверхностной адгезии, такие как интегрины и селектины, секретируют протеолитические ферменты и ремоделируют приле-

жащий ЭКМ. За этими событиями следует формирование незрелых капилляров. Чтобы они превратились в функциональные сосуды, необходимо присутствие автокринных/паракринных проангиогенных факторов, которые вызывают миграцию, пролиферацию и дифференциацию эндотелиальных клеток, что ведет к воссозданию базальной мембраны и анастомозу с новообразованными или существовавшими ранее сосудами.

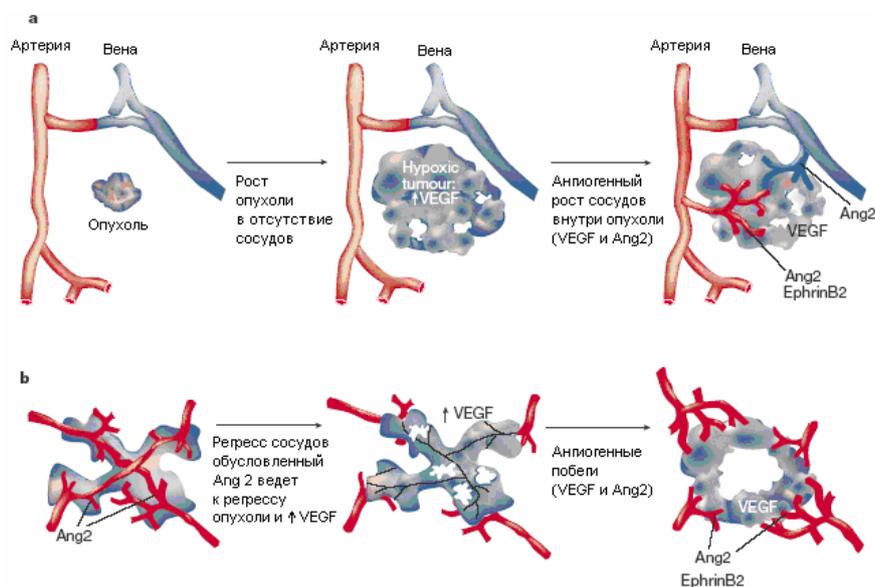


Рис. 2 [8]. Два варианта ангиогенеза в опухоли. А. Опухоль формируется как аваскулярная масса, по мере роста возникает гипоксия, которая вызывает экспрессию про-ангиогенных факторов (VEGF, в первую очередь), активирующих прорастание сосудов в опухоль. В. Опухоль растет на базе существовавшего ранее сосуда, под воздействием ангиопоэтина2 сосуд регрессирует, в результате чего формируются некротическая область в центре опухоли (мало VEGF) и область активного ангиогенеза на периферии (гипоксия =>экспрессия VEGF)

1.1.3. Особенности опухолевых сосудов

Еще Дж. Фолкман предсказал, что сформированные в результате ангиогенеза сосуды будут отличаться от таковых в остальных тканях. Действительно, такие сосуды аномальны как структурно, так и функционально (см. Рис. 3). В отличие от нормальной сосу-

дистой сети, которая четко структурирована, опухолевая в значительной мере хаотична. Для нее характерны многочисленные петли, переплетения, параллельные соединения и тупиковые ветви [12, 13]. Сами сосуды при этом расширены, имеют неравномерный диаметр (частично это обусловлено сжатием незрелой сосудистой стенки в результате давления пролиферирующих опухолевых клеток), многочисленные ответвления. Выстилающие дно сосуда эндотелиальные клетки

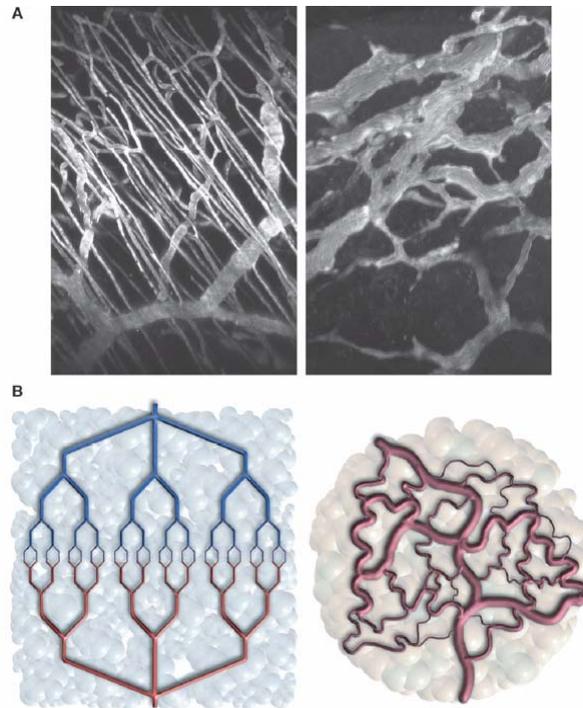


Рис. 3 [13]. Отличия нормальной сосудистой сети (слева) от опухолевой (справа). Первая характеризуется четкой упорядоченной структурой, вторая – хаотична, со множеством замкнутых петель и тупиковых ветвей (А – фотомикрография, В – схематическое представление)

расположены неравномерно – в некоторых местах имеются значительные промежутки, в других, наоборот, скопления [14]. Некоторые эндотелиальные клетки не экспрессируют характерные эндотелиальные маркеры (например, CD31) и претерпевают апоптоз, тем

самым обнажая сосудистую оболочку и открывая путь опухолевым клеткам (так называемые мозаичные сосуды). Именно последние в большой степени способствуют метастазированию (то есть распространению по всему организму) раковых клеток. Молекулы адгезии тоже экспрессируются неравномерно по сравнению с нормальной тканью.

Что касается клеток сосудистой стенки (перицитов), то данные о таковых в опухолевых сосудах противоречивы. Одни исследования говорят об их недостаточности, другие, наоборот, об избытке [15]. Обусловлено ли это разным положением вещей в различных опухолях либо отличием в используемых маркерах (α -глакомышечный актин, десмин) – неизвестно, как неопределено и происхождение самих перицитов. Одно из возможных объяснений заключается в том, что фибробласты на границе «нормальная ткань-опухоль» под влиянием микроокружения опухоли дифференцируются сначала в миофибробласты, а затем в подобные перицитам клетки. Существует гипотеза, что именно такие перицитоподобные клетки направляют рост эндотелиальных побегов в опухоль [16]. *In vivo* микроскопия и иммуногистохимическое окрашивание подтверждают, что ассоциированные с опухолью перициты характеризуются аномальной морфологией и недостаточным контактом с клетками эндотелия и матриксом. Исследования при помощи *in vivo* микроскопии также показывают, что такие перицитоваскулярные клетки производят VEGF (сосудисто-эндотелиальный фактор роста), который делает сосуды более проницаемыми. Это противоречит функции перицитов в нормальной ткани, а именно, укреплению стенок сосудов. Упомянутое противоречие требует дальнейшего изучения.

Под влиянием перечисленных выше условий кровотоков в опухолевых сосудах хаотичен и неравномерен [17]. Более того, по причине постоянного ремоделирования сосудистой сети в раковых новообразованиях, кровотоков и проницаемость сосудов варьируются от опухоли к опухоли, между опухолью и метастазами, а также между разными областями одной и той же опухоли. Это также приводит к областям с пониженным содержанием кислорода (гипоксия) и повышенной кислотностью в отдельно взятой опухоли. Перечисленные выше факторы осложняют доставку лекарств через кровотоки и способствуют выработке про-ангиогенных молекул [18].

1.2. Биохимия ангиогенеза

1.2.1. Ангиогенный «переключатель»

В настоящее время гипотеза об «ангиогенном переключателе» является общепризнанной. Считается, что он находится в «выключенном» положении, когда преобладают анти-ангиогенные факторы и включается, когда равновесие сдвигается в сторону про-ангиогенных [19]. В роли активаторов ангиогенеза выступают сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF, фактор роста фибробластов bFGF, рецептор эпителиального фактора роста (EGFR) и другие, а в роли эндогенных ингибиторов – тромбоспондин, ангиостатин, эндостатин, вазостатин, интерферон α/β , ангиопоэтин-2 (в отсутствие VEGF).

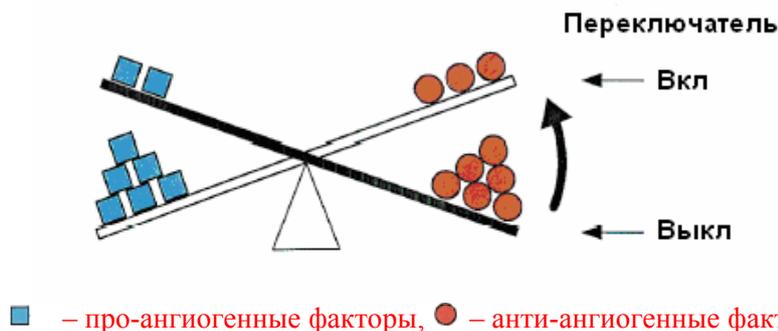


Рис. 4 [19]. Ангиогенный переключатель. Когда «перевешивают» ангиогенные факторы, запускается процесс ангиогенеза; когда «перевешивают» анти-ангиогенные, ангиогенез подавляется

Было открыто несколько обстоятельств, влияющих на тонкий баланс про- и антиангиогенных факторов. Это, прежде всего, стресс: метаболический (гипоксия, низкий pH, гипогликемия), механический (давление, обусловленное активно пролиферирующими клетками), иммунный ответ/воспаление (инфильтрация клетками иммунной системы воспаленного участка) и генетические мутации (активация онкогенов или делеция генов, которые подавляют опухолевый рост, контролируя производство регуляторов ангиогенеза).

В пользу гипотезы об антиангиогенном переключателе говорят следующие факты. Во-первых, количественные тесты на пролиферацию и миграцию, в которых VEGF и FGF вызывают в капиллярах положительный ангиогенный ответ, блокируемый добавлением ингибитора (например, тромбоспонгина-1), который «выключает» ангиогенез. Во-вторых, в человеческих опухолевых клетках восстановление супрессорного гена p53 увеличивает уровень тромбоспонгина-1 и других эндогенных ингибиторов ангиогенеза, что блокирует как синтезируемые опухолевыми клетками проангиогенные факторы, так и добавленный извне bFGF. Третье соображение заключается в том, что в нормальных островках Лангеранса в поджелудочной железе активно экспрессируются два мощнейших проангиогенных фактора – VEGF и aFGF. При этом в норме ангиогенез не наблюдается, что предполагает уравнивание этих факторов эндогенными ингибиторами ангиогенеза. Если так, то отсутствие таких ингибиторов переведет выключатель в положение «включено», что вызовет ангиогенез. Действительно, существуют генетические свидетельства наличия гена-супрессора ангиогенеза, расположенного в 16-й хромосоме (у мышей). В этом локусе часто наблюдается потеря гетерозиготности в случае аномального ангиогенеза в островках Лангеранса и в солидных (локализованных) опухолях. Эти и другие факты предполагают наличие регуляторного механизма, который интегрирует накапливаемые эффекты сигналов про- и антиангиогенных факторов и удерживает эндотелиальные клетки в альтернативных состояниях «латентности» или ангиогенеза. Таким образом, изменения равновесия между положительными и отрицательными сигналами регулируются ангиогенным переключателем. Если «перевешивают» ингибиторы ангиогенеза, эндотелиальные клетки находятся в «латентном» состоянии, преимущественном во взрослом организме млекопитающего за исключением женского репродуктивного цикла, где ангиогенез четко регулирован. В случае, если «перевешивают» ангиогенные факторы, эндотелиальные клетки получают сигнал к размножению, миграции и формированию новых кровеносных сосудов, смещая таким образом равновесие в сторону ангиогенеза.

Это положение иллюстрирует Рис. 5. На нем в левой колонке стрелками показаны сосуды при нормальном или предопухолевом состоянии, в правой – при ангиогенезе, сопровождающем раковое новообразование.

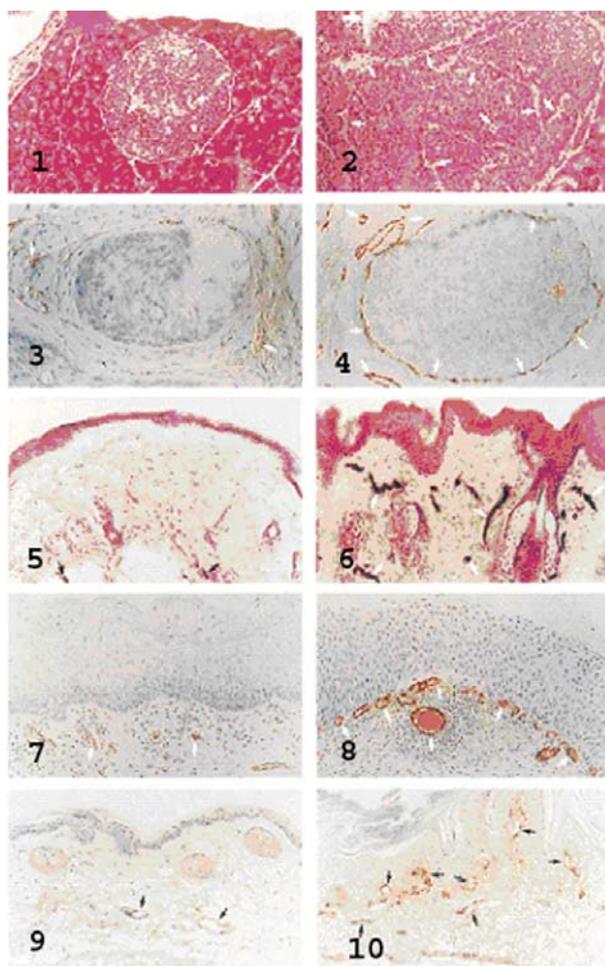


Рис. 5 [16]. Гистологическая картина ангиогенного переключателя в различных тканях. Увеличение 64х

В верхнем ряду располагаются гистологические срезы островков Лангеранса в поджелудочной железе мыши, окрашенные гематоксилином и эозином. Слева – нормальные делящиеся β -клетки (1), справа – островок Лангеранса с ангиогенным профилем (2). Второй ряд: человеческая молочная железа, где слева – нормальная ткань (3), а справа – неоваскуляризованная (4). В третьем ряду рас-

полагаются срезы кожи мыши (дерма). Слева мы видим доброкачественный фиброматозный очаг с несколькими глубоко лежащими сосудами (5), справа – агрессивный фиброматоз с крупными капиллярами, разбросанными по утолщенной дерме (6). Четвертый ряд – карцинома шейки матки человека. В нормальном состоянии (слева) немногочисленные сосуды расположены глубоко в строме (7), при злокачественной дисплазии (справа) видно множество новообразованных капилляров, прилегающих к базальной мембране (8). В нормальном мышинном ухе (нижний ряд, слева) в строме присутствует небольшое количество сосудов (9), в то время как при вызванной HPV-16 эпидермальной дисплазии наблюдается множество капилляров, особенно вблизи трансформированных кератиноцитов (10).

Интересной представляется связь ангиогенеза и апоптоза. В ряде исследований, в том числе, на модели подкожно имплантированной карциномы легкого Льюиса, показано [20], что высокий уровень эндогенных ингибиторов ангиогенеза (плазминогена), сопровождающий рост первичной опухоли, «мешает» росту отдаленных метастазов в легких, которые остаются в «спящем» состоянии. Исследование клеток таких латентных метастазов показало высокое (30%) содержание клеток, находящихся в S-фазе и при этом совсем небольшое увеличение метастатической опухолевой массы. Судя по всему, этот факт объясняется высокой встречаемостью апоптоза (примерно 8%), то есть активное клеточное деление нейтрализуется клеточной смертью [21]. Снятие ангиогенной блокады (резекция первичной опухоли) вело к активному ангиогенезу и быстрому росту легочных метастазов.

I.2.2. Основной игрок: сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и его рецепторы

I.2.2.1. VEGF – ключевой фактор ангиогенеза. Десятилетия исследований в области молекулярных основ ангиогенеза выявили ряд сигнальных путей различных факторов роста и других семейств белков, которые сдвигают молекулярный «переключатель» в сторону ангиогенеза. Их принято называть про-ангиогенными (или просто «ангиогенными») факторами. Возможно, наиболее полно охарактеризованным и изученным ангиогенным фактором является сосудистый эндотелиальный фактор роста (также известный как фактор сосудистой проницаемости – по эффекту, им вызы-

ваемому) [22, 23]. Он достаточно уникален среди факторов роста своей специфичностью к сосудистому эндотелию. В настоящее время установлено, что именно сосудистый эндотелиальный фактор роста и его рецепторы играют ключевую роль в процессах васкулогенеза и ангиогенеза. Итак, сосудистый эндотелиальный фактор роста является высокоспецифичным клеточным митогеном. Активация его рецепторов ведет к росту эндотелиальных побегов, увеличению проницаемости сосудов и экспрессии матриксных металлопротеиназ (MMPs), результирующей в его локальном разрушении, что необходимо для движения эндотелиальных клеток. Эти события приводят к расширению сосудистой сети, изначально за счет формирования еще «незрелых сосудов», к которым под воздействием многочисленных ангиогенных факторов «стягиваются» поддерживающие клетки (например, перициты). Кроме этого, показано, что VEGF необходим для выживания клеток недавно сформировавшихся сосудов в том смысле, что он смещает молекулярные веса от апоптоза к выживанию.

О важности VEGF для формирования сосудов говорят, например, результаты недавних исследований: даже нарушение одной VEGF-аллели в мышах приводит к эмбриональной смерти, обусловленной серьезными сосудистыми аномалиями, а нарушение обеих аллелей ведет к эмбриональной смерти на фоне практически полного отсутствия сосудистой сети [24, 25]. Более мягкие вмешательства в экспрессию VEGF во время эмбрионального развития также вели к глубоким аномалиям сосудов, приводившим к смерти в эмбриональном или постнатальном периодах [26]. VEGF продолжает оставаться критичным в период раннего постнатального роста и развития, как доказано постнатальной инактивацией VEGF с использованием генной делеции путем Cre-loxP или введением растворимого VEGF рецептора, который эффективно блокирует действие VEGF [27]. Несмотря на то, что инактивация VEGF в первые недели после рождения является летальной, в более позднем возрасте она намного менее травматична, и по-видимому, затрагивает лишь те структуры, которые претерпевают постоянное ремоделирование сосудов, например, желтое тело в яичниках. Из этого следует, что VEGF, за малыми исключениями, не имеет постоянных сигнальных функций во взрослом организме. Наиболее наглядно потребность в VEGF для ангиогенеза показана на примере васкуляризации сетчатки глаза у грызунов, которая имеет место вскоре

после рождения. Прорастание ангиогенных «побегов» в изначально аваскулярную и гипоксичную сетчатку зависит от экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста. Любое возмущение нормального паттерна экспрессии VEGF влечет за собой нарушения васкуляризации сетчатки с печальными последствиями для ее функционирования [28]. Этот процесс необратим, так как позднее восстановление экспрессии VEGF не только не улучшает, а скорее усугубляет ситуацию. Наиболее простым способом нарушить нормальную экспрессию VEGF можно, на короткий срок поместив новорожденных грызунов в условия с повышенным содержанием кислорода. Это временно подавляет VEGF в сетчатке, что приводит к прекращению роста уже появившихся сосудов и даже деградации существующих. При нормализации содержания кислорода в воздухе сетчатка оказывается в условиях гипоксии и отвечает бурной экспрессией VEGF. Однако возникающие кровеносные сосуды оказываются далеки от нормальных: они легко повреждаются механически, склонны к «протеканию» и кровоизлияниям. Этот пример показывает чрезвычайную важность сосудистого эндотелиального фактора роста для ангиогенеза и необходимость его четкой регуляции при нормальных процессах. Кстати говоря, приведенное выше исследование заставляет задуматься о возможных последствиях обогащения воздуха кислородом во время ухода за недоношенными младенцами.

1.2.2.2. Семейство VEGF. Семейство VEGF включает в себя 6 членов: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E и плацентарный фактор роста PlGF (PlGF-1 и PlGF-2), каждому из которых соответствует определенный ген (Рис. 6). Перечисленные выше лиганды имеют специфическое сродство к рецепторам VEGF-1, VEGF-2 и VEGF-3. Дополнительно, нейрофилин (NRP)-1 и NRP-2 служат ко-рецепторами определенным изоформам VEGF, увеличивая сродство этих лигандов к соответствующим рецепторам. VEGF-A (обычно называемый просто VEGF) был впервые идентифицирован Dvorak et al. [29] как повышающий проницаемость сосудов фактор, выделяемый опухолевыми клетками. Позже Ferrara и сотрудники его лаборатории [30] выделили и клонировали VEGF-A как специфический эндотелиальный митоген. Нативный VEGF является основным связывающимся с гепарином гомодимерным гликопротеином с массой 45 000 Да. Эти характеристики соответствую-

ют VEGF165, который представляет собой главную из изоформ. Ген VEGF-A претерпевает альтернативный сплайсинг, порождая зрелые изоформы со 121, 165, 189 и 206 аминокислотными остатками. Было идентифицировано несколько не столь часто экспрессируемых изоформ – VEGF145 и VEGF183.

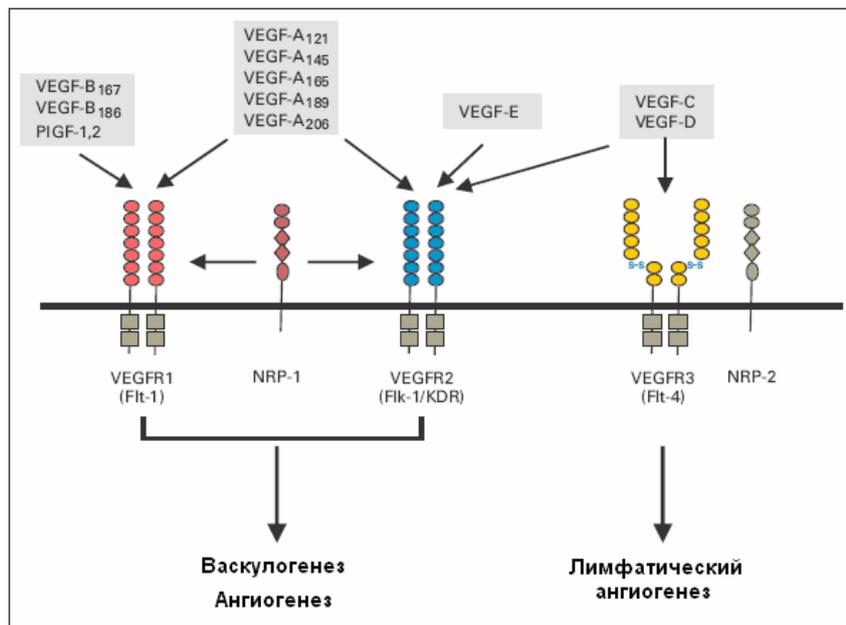


Рис. 6 [40]. Специфичность связывания различных членов семейства VEGF и их рецепторов

VEGF121 и VEGF165 являются растворимыми формами, тогда как VEGF189 и VEGF206 находятся в связанной форме с гепаринсодержащими протеогликанами мембраны. VEGF165 существует как в растворимой, так и в связанной с экстраклеточным матриксом (ЭКМ) формах. Связанные с ЭКМ изоформы VEGF-A, VEGF-C и VEGF-D могут быть активированы посредством С-концевого расщепления плазмином, что порождает биоактивный фрагмент. Показано, что активация плазминогена и превращение в плазмин играют важную роль в каскаде ангиогенеза. Таким образом, похоже, что протеолиз VEGF происходит и *in vivo*. Генерация биологически активного VEGF путем протеолитического расщепления может

быть особенно важным в микроокружении опухоли, где исследования достоверно подтверждена повышенная экспрессия протеаз (включая плазмин). Итак, VEGF может стать доступен для эндотелиальных клеток либо в виде растворимой формы (VEGF121, VEGF165), либо путем протеолитического расщепления. Однако потеря способности связываться с гепарином ведет к значительному уменьшению митогенической активности. Альтернативно, VEGF может покинуть ЭКМ под действием MMP-9, что инициирует ангиогенный переключатель. VEGF165 является главной изоформой и сверхэкспрессируется во многих человеческих солидных опухолях, в частности, в карциномах (в карциноме ободочной кишки, например). Транскрипты, кодирующие VEGF121 и VEGF189 встречаются в большинстве тканей, экспрессирующих ген VEGF. VEGF206, напротив, является редкой изоформой (идентифицирована пока что только в печени плода). Недавние исследования предполагают, что паттерны экспрессии некоторых изоформ являются ткань-специфичными, что свидетельствует об их особой роли в васкулогенезе и, возможно, опухолевом ангиогенезе.

Как уже было отмечено ранее, VEGF-A играет ключевую роль при формировании сосудов в эмбриогенезе и раннем постнатальном периоде, после чего его действие ограничивается лишь такими нормальными процессами, как заживление ран, овуляция и менструация и регуляция кровяного давления. Именно VEGF-A инициирует патологический ангиогенез в опухоли; также его связывают с такими заболеваниями, как псориаз, артрит и ретинопатия при диабете. Нокаутные по VEGF-B и PlGF мыши не имеют патологий сосудистой системы, что согласуется с данными, что эти белки вовлечены в патологические процессы взрослого организма. Гомологи сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF-C и VEGF-D играют решающую роль при формировании лимфатических сосудов в эмбриональном и постнатальном развитии. В мышцах гомозиготная делеция гена VEGF-C приводит к эмбриональному летальному исходу, а гетерозиготная – к постнатальным дефектам лимфатической системы, связанным с аномалиями лимфатических сосудов. Есть данные, что VEGF-C и VEGF-D также вовлечены и в ангиогенез, особенно патологический ангиогенез в опухоли, однако точной информации об их роли в этих процессах нет. VEGF-E не является гомологом VEGF, встречающимся у млекопитающих; скорее, это вирусный белок, который кодируется ви-

русом семейства оспы Ogf, использующий тирозин-киназный домен Flt1 и несущий мощный митогенный сигнал. VEGF-E характеризуется примерно 22%-ной идентичностью последовательности с VEGF и, подобно изоформе VEGF121 не имеет домена для связывания с гепарином.

1.2.2.3. Рецепторы VEGF. Лиганды VEGF действуют посредством нескольких специфичных рецепторов. Два из них были изначально идентифицированы на эндотелиальных клетках – это VEGFR-1 (также известный как Flk-1) и VEGFR-2 (известный как KDR и его мышинный гомолог, Flt-1 – их гомологичность составляет 85%). VEGFR-1 и VEGFR-2 также экспрессируются на многих линиях кроветворных клеток взрослого организма. Гомологичность этих рецепторов составляет 44% и они имеют общую характеристическую структуру, состоящую из семи внеклеточных иммуноглобулиноподобных доменов, одного трансмембранного домена и согласованной тирозин-киназной последовательности, прерванной вставленным киназным доменом. И VEGFR-1 (Flt-1), и VEGFR-2 (KDR) связывают главную изоформу VEGF (VEGF165). Сродство VEGFR-1 к VEGF более высокое ($K_d=10-20$ пМ по сравнению с $K_d=75-125$ у VEGFR-2). Таким образом, сродство рецептора Flt-1 примерно на порядок выше. Активация рецепторов происходит путем димеризации и автофосфорилирования тирозиновых остатков в цитоплазматической части вследствие связывания с лигандом (см. Рис. 7).

Показано, что большинство нисходящих эффектов в проангиогенной цепочке событий происходит посредством активации VEGFR-2. Они включают в себя повышение проницаемости микрососудов, пролиферацию, миграцию, инвазию и выживание эндотелиальных клеток [31]. Ключевая роль VEGFR-2 в формировании сосудов доказывается тем, что гетеро- и гомозиготные нокаутные мыши умирают *in utero* по причине несовместимых с жизнью дефектов сосудистой сети. Принято считать, что обусловленное VEGFR-2 размножение эндотелиальных клеток происходит благодаря активации сигнального пути фосфолипазы C гамма-протеинкиназа – C Raf MAP киназа, а выживание и миграция связаны с PI3K и FAK (киназа фокальной адгезии) соответственно. Специфическая активация VEGFR-2 при помощи VEGF-E вызвала высокую активность эндотелиальных клеток *in vitro* и *in vivo*, выступая в

поддержку предположения о том, что активация только VEGFR-2 может эффективно стимулировать ангиогенез.

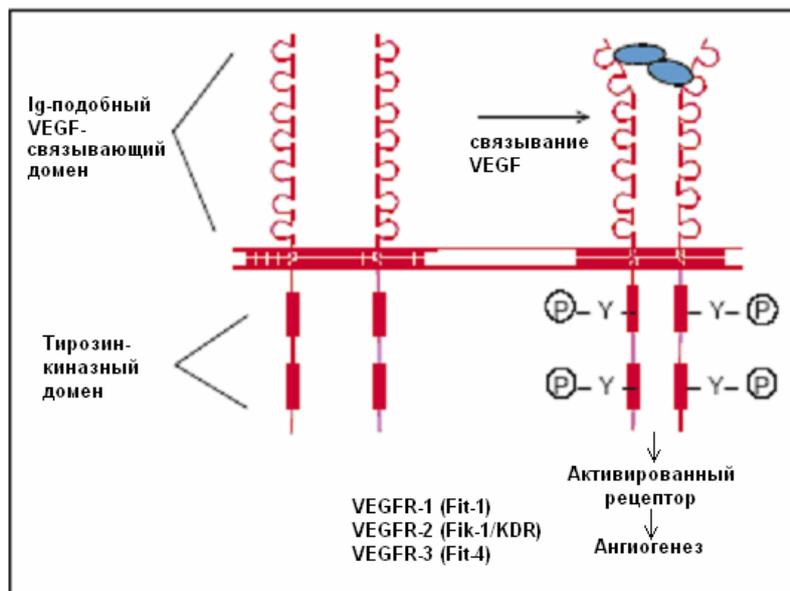


Рис. 7. Схематическое изображение структуры тирозин-киназных рецепторов VEGFR

Появляется все больше и больше доказательств того, что VEGFR-2 экспрессируется не только на клетках эндотелия, но и на многих опухолевых клетках, включая немелкоклеточную карциному легкого, меланому, карциному предстательной железы, карциному молочной железы и лейкемию [32, 33, 34]. Достоверность этих данных еще проверяется, поскольку в них используется иммуногистохимическое окрашивание, которое потенциально способно давать ложноположительные результаты. Если они соответствуют действительности, то VEGF является не только ангиогенным, но и онкогенным (по независимому от эндотелия механизму) фактором.

В то время как сейчас ведущая роль VEGFR-2 в инициации ангиогенеза не подвергается сомнению, данные о роли VEGFR-1 (Flt-1) и по сей день остаются противоречивыми. В ряде исследований [35, 36] высказывается предположение о том, что он служит своеобразным «капканом» VEGF либо подавляет сигнализацию через

VEGFR-2. Однако в других работах [37, 38] указывается что, по крайней мере, в некоторых типах клеток VEGFR-1 играет позитивную, конструктивную роль в ангиогенезе, участвуя в миграции моноцитов, привлечении предшественников эндотелиальных клеток, увеличивая адгезию клеток-киллеров и активируя факторы роста синусоидальных эндотелиальных клеток печени. В пользу последней гипотезы говорит и недавнее исследование группы М. Autiero [39], который показал, что активация VEGFR-1 лигандом PlGF ведет к кросс-фосфорилированию VEGFR-2 в эндотелиальных клетках, ко-экспрессирующих эти рецепторы. Вспомогательными рецепторами к VEGF служат также нейрофиллины (см. Рис. 6), роль которых сводится к модулированию связывания с главными рецепторами VEGFR-1 и VEGFR-2. Недавно был открыт еще один тирозин-киназный рецептор, VEGF-3, который, однако, связывает не VEGF, а VEGF-C, что указывает на его роль в лимфогенезе.

I.2.2.4. Регуляция экспрессии VEGF. На экспрессию гена VEGF влияет несколько факторов, среди которых можно назвать гипоксию, цитокины, факторы роста (такие как EGF, TGF- β , интерлейкины), а также клеточная дифференциация и трансформация. Рассмотрим эти факторы по отдельности.

Гипоксия. Исследования показали, что вызываемый гипоксией фактор-1 (HIF-1) является ключевым посредником между гипоксией и экспрессией VEGF [40]. Важную роль играет также продукт гена опухолевого супрессора фон Хиппеля-Линдау. При нормоксических условиях HIF-1 α быстро разрушается по убиквитин-протеосомному механизму – процесс, который контролируется продуктом гена опухолевого супрессора vHL. При условии гипоксии или в случае, если ген vHL отсутствует или мутирован, HIF-1 α димеризуется с HIF-1 β , после чего комплекс перемещается в ядро и связывается с промотером VEGF, что и ведет к повышенной транскрипции VEGF.

Факторы роста и цитокины. В ряде работ показано, что цитокины и факторы роста способны регулировать экспрессию ангиогенных факторов в линиях опухолевых клеток, таким образом, выступая в роли не прямых ангиогенных факторов. Важность EGF (эпидермального фактора роста)/ErB1 и HER-2/neu (ErB2) показана для таких опухолевых систем, как карцинома ободочной кишки

[41], рак поджелудочной железы [42], рак желудка [43], рак молочной железы [44, 45], глиобластома [46], немелкоклеточный рак легкого [47] и так далее.

Рецептор инсулиноподобного фактора-I (IGF-IR) экспрессируется во многих формах рака человека и связан с плохим прогнозом, агрессивным течением болезни и формированием метастазов. Недавно на экспериментальных модельных системах была показана важная роль системы IGF-IR в процессе ангиогенеза, которая заключается в повышении экспрессии VEGF при раке поджелудочной железы, молочной железы, ободочной и прямой кишки, а также эндометриальных новообразованиях [48, 49].

Семейство выделяемых из плаценты факторов роста (PDGF) модулирует ангиогенез, регулируя выживание эндотелиальных клеток и привлекая перициты и гладкомышечные сосудистые клетки, а также повышая уровень VEGF, как показано на нескольких модельных системах. Ferrara и сотрудники в своей недавней работе [50] продемонстрировали важную роль PDGF в увеличении количества стромального VEGF-A. Используя модель опухолевых клеток с дефицитом VEGF, исследователи показали, что экспрессируемый ими PDGF-AA отвечает за привлечение производящих VEGF ассоциированных с опухолью фибробластов. Прерывание паракринного сигнала рецептора PDGF-альфа между опухолевыми клетками и стромальными фибробластами в этой модели значительно подавило ангиогенез и рост опухоли. Это показывает необходимость PDGF для привлечения производящих VEGF стромальных фибробластов, а также важность вне-опухолевого VEGF для поддержания ангиогенеза в опухоли.

Простогландины играют критическую роль во многих происходящих в организме процессах, в том числе, некоторые из них оказывают влияние на повышение экспрессии VEGF [51]. Простогландин-эндопероксид синтаза (также известная как циклооксигеназа, COX) является лимитирующим ферментом окислительного превращения арахидоновой кислоты в различные предшественники простогландинов. За последнее десятилетие многочисленные исследования подтвердили связь сверхэкспрессии COX-2 с прогрессированием опухоли и активным ангиогенезом (повышенной экспрессией VEGF) в нескольких солидных опухолях, включая рак желудка, рак ободочной кишки, предстательной железы, молочной

железы и поджелудочной железы [52, 53]. Также показано, что СОХ-2 повышает экспрессию VEGF в многочисленных клеточных линиях. Однако этот эффект, возможно, зависит от типа новообразования, поскольку проявляется не во всех опухолях.

Онкогены и гены-супрессоры опухолей. Ключевую роль в возникновении ангиогенного фенотипа неопластических клеток играет, по-видимому, инактивация функции опухолевого супрессора p53, контролирующего экспрессию некоторых ингибиторов и стимуляторов ангиогенеза [54]. Так, p53 активирует гены тромбоспондинов 1 и 2 (ингибирующих ангиогенез), а транскрипцию гена VEGF (который, напомним, является ключевым про-ангиогенным фактором), наоборот, подавляет. Вместе со способностью p53 активироваться в ответ на гипоксию, это предопределяет еще один механизм, посредством которого нормальное функционирование p53 может защищать организм от опухолевого роста: гипоксия, возникающая в центре неопластического узелка, индуцирует p53 и, как следствие, апоптоз или остановку клеточного цикла, сопровождающуюся повышением секреции тромбоспондинов и снижением экспрессии VEGF, что должно предотвращать неоваскуляризацию узелка. Естественно поэтому, что инактивация p53 может являться важным этапом в приобретении способности стимулировать ангиогенез. Действительно, при анализе механизмов возникновения ангиогенного фенотипа в человеческих фибробластах было обнаружено, что в большинстве случаев именно инактивация p53 является инициальным событием.

К дальнейшему усилению способности стимулировать ангиогенез может приводить экспрессия онкогенов, в частности, онкогенов семейства RAS, вызывающих активацию транскрипционного комплекса AP-1 и, как следствие, с одной стороны, повышение секреции VEGF, ген которого содержит респонсивные элементы для AP-1, а с другой, увеличение продукции ряда матриксных металлопротеиназ (ММР-9/коллагеназа IV, ММР-1 и др.), гены которых также регулируются AP-1 и другими Ras-индуцируемыми транскрипционными факторами, в частности, Ets1.

1.2.2.5. Биологическое действие VEGF. Эффекты воздействия VEGF на эндотелиальные клетки суммированы в Табл. 1. Ниже они рассмотрены более подробно.

Таблица 1. Действие VEGF на эндотелиальные клетки

Функция	Механизм
Проницаемость	Везикулоvasкулярные органеллы; сосудистые поры; открытие соединений между прилежащими эндотелиальными клетками
Пролиферация	Активация митоген-активируемых протеин киназ (МАРК)
Инвазия	Индукция металлопротеаз, uPA, uPAR, ТТРА
Миграция	Активация FAK, p38, оксида азота
Выживание	Индукция PI3K/Akt, Bcl2, A1, сервивина, XIAP или FAK, ингибирование каспаз
Активация	Повышение экспрессии интегринов; изменения цитоскелета

Проницаемость. VEGF был замечен благодаря своему эффекту увеличивать проницаемость венул и небольших вен, за что изначально был назван фактором сосудистой проницаемости (VPF) [55]. Действительно, VEGF – самый сильный среди увеличивающих проницаемость сосудов агент – в 50 000 раз сильнее гистамина [56]. Эта способность и сейчас считается одной из самых важных функций VEGF, особенно учитывая, что гиперпроницаемость микрососудов опухоли обусловлена, в основном, оверэкспрессией VEGF. Возможно, что повышенная проницаемость ведет к утечке нескольких белков, в числе которых фибриноген и ему подобные. Это также может вести к накоплению фибрина в экстравазальном пространстве, что в конечном итоге затрудняет отток эдемы и трансформирует в норме анти-ангиогенное пространство стромы в область с благоприятными для ангиогенеза условиями.

Точный механизм обусловленного VEGF повышения проницаемости сосудов пока до конца неясен. Дворак и сотрудники показали, что макромолекулы белка пересекают эндотелиум посредством трансэндотелиального клеточного пути, включающего в себя везикулоvasкулярные органеллы, возникающие под воздействием VEGF [56]. Другие исследовательские группы предполагают, что VEGF вызывает появление пор, которые предоставляют дополнительные возможности для выхода некоторых белков [57, 58], или что VEGF открывает соединения между прилежащими эндотелиальными клетками [59, 60]. Однако более современные данные позволяют предположить, что в повышении проницаемости участвует кальций-зависимый канал, который включает производство оксида

азота и активацией пути Akt увеличивает уровень cGMP [61] в дополнение к активации пути Erk1/2 стимуляцией простагландина PGI₂ [58].

Пролиферация. VEGF служит митогеном для эндотелиальных клеток. Есть все основания полагать, что пролиферация эндотелиальных клеток обусловлена активацией экстраклеточных киназ Erk1/2 и другого члена семейства MAP киназ, JNK/SAPK [57]. В митогенной активности VEGF также участвует сигнальный путь С-протеин-киназа, возможно, регулируемый частично NO. Однако следует отметить, что хотя VEGF является очень мощным митогеном для эндотелиальных клеток, есть и более сильнодействующие факторы [62], которым, правда, не хватает множественного действия сосудистого эндотелиального фактора роста, его плюрипотентности.

Инвазия и миграция. Деградация базальной мембраны является важным шагом в начале ангиогенеза, поскольку она необходима для миграции и распространения эндотелиальных клеток. VEGF привлекает множество ферментов и белков для решения этой задачи: металлопротеазы (MMPs), коллагеназа межклеточного пространства, активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) и активатор плазминогена тканевого типа (ТТРА). Активация этих компонентов ведет к созданию благоприятного окружения для начала ангиогенеза, а именно, миграции эндотелиальных клеток и формированию эндотелиальных «побегов» [63]. В этом исследовании также показано, что VEGF выступает в роли промотера экспрессии рецептора uPA (uPAR) на клетках сосудистого эндотелия. Учитывая роль системы плазмин-РА и, особенно, роль uPA-uPAR, это еще один аргумент в пользу про-ангиогенного действия VEGF. А поскольку сам uPA увеличивает экспрессию нескольких про-ангиогенных факторов, включая и VEGF, это дает основания предполагать существование аутокринной регуляторной петли.

Внутриклеточные механизмы, при помощи которых VEGF регулирует миграцию эндотелиальных клеток, пока до конца не ясны. Но, похоже, они связаны с активацией сигнальной системы FAK и участием оксида азота [63], который регулирует единство фокальной адгезии и тирозин-ФАК фосфорилирование.

Выживание. VEGF действует как фактор выживания по отношению к эндотелиальным клеткам *in vitro* и *in vivo* [64]. Показано, что *in vitro* VEGF подавляет апоптоз путем активации PI3K/Akt в

дополнение к повышению уровня анти-апоптотических белков, таких как bcl2 и A1. Это в свою очередь, подавляет активацию каспаз и приводит к увеличению уровня ингибиторов апоптоза, таких как сервавин и XIAP [65, 66]. Там же показано, что VEGF активирует киназы фокальной адгезии (ФАК) и связанные с ними белки, которые поддерживают направленные на выживание эндотелиальных клеток сигналы. In vivo подавление VEGF оказывает мощное апоптотическое действие на недоразвитые сосуды сетчатки мышей в эмбриональном и раннем постнатальном периодах, но не у взрослых животных. Вероятно, этот факт обусловлен наличием у зрелых сосудов «покрытия» из перицитов.

Активация. Эффекты действия VEGF на эндотелиальные клетки включают изменения в их морфологии, перестройку цитоскелета и стимуляцию к миграции и росту. VEGF вызывает повышенную экспрессию таких генов, как прокоагулянтный тканевый фактор, белки фибринолитической цепи, включая урокиназу, активатор плазминогена тканевого типа, ингибитор урокиназы, матриксные металлопротеазы, интегрины, синтазу оксида азота, разнообразные митогены. Известно, что VEGF вызывает расширение сосудов, повышая уровень оксида азота и простогландинов в эндотелиальных клетках.

1.2.3. Эпителиальный фактор роста и его рецептор

EGFR: структура, функции, активация. Эпителиальный фактор роста (EGF) - полипептид, состоящий из одной цепи в 53 аминокислоты с тремя дисульфидными мостиками, которые защищают его молекулу от действия протеинкиназ. EGF является потенциальным митогеном, стимулирующим пролиферацию многих типов клеток, включая фибробласты, кератиноциты и эпителиальные клетки. EGF и родственный ему трансформирующий фактор роста- α (TGF- α) имеют общий рецептор, который кодируется геном *c-erb*. Рецептор EGF (EGFR) представляет собой одновременно и тирозинкиназу, которая активируется при взаимодействии рецептора с лигандом. Рецепторная тирозинкиназа физически связана с фосфотирозинфосфатазой, эти два фермента не просто оказывают противоположное действие (тирозин-киназа фосфорилирует белки по тирозину, а фосфатаза дефосфорилирует), их согласованная активность обеспечивает тонкий баланс в передаче эффекторных сигналов, необходимых для клеточного роста и дифференцировки. Результатом фосфорилирования/дефосфорилирования могут быть их

активация/инактивация, открытие ионных каналов, экспрессия генов. Многие эффекты рецепторных тирозинкиназ опосредуются активацией проонкогена *ras*. EGFR также активирует проонкогены *c-fos* и *c-myc* [67].

Семейство рецепторов эпителиального фактора роста представлено 4 членами: собственно EGFR (также известен как ErbB1 или Her1), Her2 (ErbB2 или Neu), Her3 (ErbB3) и Her4 (ErbB4). Серии исследований показали, что нарушение функции этих мембранных рецепторов ведет к онкогенной трансформации, а нарушение регуляции EGFR и Her2 фактически связано со всеми ключевыми явлениями прогрессирования раковой опухоли, как то автономный рост клеток, инвазия, отдаленное метастазирование и ангиогенез.

Молекулярная структура семейства рецепторов EGF состоит из amino-терминального экстраклеточного домена, одного трансмембранного «заякоривающего» домена и карбоксил-терминального внутриклеточного домена с тирозин-киназной активностью [68, 69]. Экстраклеточный домен EGFR состоит из 621 аминокислотного остатка. Его основное предназначение выполняет лиганд-связывающий домен, который состоит из двух доменов L1 и L2. Роль трансмембранного домена, состоящего из 23 остатков, выяснена не конца; предполагается, что он способствует стабильности рецептора. Внутриклеточный домен EGFR состоит из 523 остатков и характеризуется тирозин-киназной активностью, которая способствует активации мишеней рецептора в цитоплазме. Связывание лиганда ведет к формированию гетеро- или гомо-димеров в строгой иерархической последовательности по отношению к лигандам. Известно, что нисходящие сигналы (пролиферация, миграция, повышение экспрессии VEGF), формирующие благоприятное для опухолевого ангиогенеза окружение, зависят не только от самих лигандов, но и от состава димеров. Так, замечено, что гетеродимеры EGFR-Her2 ассоциируется с более сильным и продолжительным пролиферативным сигналом по сравнению с гомодимером EGFR-EGFR.

Димеризация вызывает конформационные изменения EGFR, которые ведут к активации тирозин-киназных остатков и автофосфорилированию рецептора. Интересно, что у рецептора Her2 семейства EGF рецепторов отсутствует внутренняя тирозин-киназная активность, так что фосфорилироваться он может только при ди-

меризации с другими гомологами (EGFR, Her3, Her4). Это находится в соответствии с отличной от остальных белков семейства структурой экстраклеточного региона, которая имеет фиксированную конформацию, напоминающую лиганд-активированную структуру. Фосфорилирование EGFR ведет к формированию внутриклеточных докинг-сайтов для амплифицирующих молекул, содержащих SH2 домены или фосфотирозин-связывающие участки [70]. Затем эти молекулы активируют множество сигнальных молекул, включая фосфолипазу C- γ -1, MAPK, фосфатдилонизитол 3,4,5-киназу (PI3K)/протеин киназу B (PKB или же Akt), тирозин-киназу Src, стресс-активирующиеся тирозин-киназы, c-Jun киназу, а также сигнальные молекулы и активаторы транскрипции [71, 72, 73]. Из всего множества сигналов важнейшими представляется MAPK, поскольку он регулирует клеточные процессы, такие как пролиферация и транскрипция генов активацией многочисленных субстратов, расположенных в цитозоле, ядре и цитоплазматической мембране. Также важен комплекс PI3K/Akt, который повышает выживаемость клеток.

Связывание лиганда ведет также к интернализации рецептора спустя секунды после его активации. Таким образом, сигнал прерывается. После того, как комплекс лиганд-рецептор интернализован, он либо подвергается разрушению либо расщеплению и отправке на поверхность клетки для дальнейшего выполнения своей сигнальной функции.

Роль EGFR и Her2 в онкогенезе и ангиогенезе. Во многих опухолях установлены сверхэкспрессия EGFR или мутации в генах, кодирующих его, вероятно, ответственные за опухолевую трансформацию. При раке предстательной железы отмечается увеличение содержания мРНК EGFR, но уменьшение содержания самого белка при определении иммунохимическим методом. Повышенное содержание EGFR было выявлено в опухолях яичника, матки, молочных желез, желудочно-кишечного тракта и при раке кожи. Наиболее изучено клиническое значение EGFR при раке молочной железы. EGF стимулирует рост раковых клеток молочной железы и этим дополняет эстрогенстимулированный опухолевый рост. Установлено, что EGFRs опосредуют воздействие ЭФР и ТФР- α и являются прогностическими маркерами для опухолей молочной железы. В серии исследований было установлено, что высокое содержание EGFR часто коррелирует с низким уровнем эстрогенных и

прогестероновых рецепторов и сочетается с меньшей выживаемостью больных по сравнению с больными, имеющими EGFR-отрицательные опухоли. Экспрессия EGFR на клетках рака молочной железы является показателем не только неблагоприятного прогноза, но и низкой чувствительности к гормонотерапии, в частности, к тамоксифену.

Злокачественная трансформация как следствие нарушения регуляции EGFR может протекать по нескольким механизмам: сверхэкспрессия рецептора, активирующие мутации, нарушение процесса димеризации, активация аутокринных петель факторов роста, дефицит определенных фосфатаз. Часто с ролью EGFR в прогрессировании раковой опухоли связывается сверхэкспрессия гена без его амплификации, что обусловлено активацией с помощью TGF- α в аутокринной петле [74, 75]. Также недавно были обнаружены формы EGFR с мутацией в экстраклеточном домене, среди которых преобладающей для большинства форм рака является EGFR вариант III (EGFRvIII) [76, 77]. EGFRvIII получается вследствие перегруппировки или альтернативного сплайсинга мРНК, который ведет к потере 801 пары оснований (пары 275-1075) в экстраклеточном лиганд-связывающем домене, что приводит к появлению гликопротеина с постоянно действующей лиганд-независимой активацией тирозин-киназного домена. Такая делеция характерна для многих видов рака, в том числе, и для карциномы кишечника и шейки матки, но не для нормальных тканей. Эта особенность (наличие EGFRvIII только в раковых тканях) делает EGFR надежным маркером онкогенеза и благоприятных условий для ангиогенеза [78].

Her2 часто сверхэкспрессируется при раке груди, желудочно-кишечного тракта, яичников. Известно о его сверхэкспрессии при немелкоклеточном раке легких и глиомах, причем недавние исследования показали, что она ассоциирована с худшим прогнозом [75, 76].

В связи с важной ролью этих рецепторов при различных видах злокачественных образований вполне целесообразно их использование в качестве мишеней для противораковой терапии (идея была высказана более 20 лет назад группой под руководством Мендельсона). В настоящее время гипотеза подтверждена наличием двух классов препаратов, клинически активных при онкологических заболеваниях. Это моноклональные антитела, направленные против экстраклеточного домена и АТФ-конкурирующие ингибиторы тирозин-киназной активности [79].

I.2.4. Обзор современных препаратов, направленных против рецепторов семейства Her

I.2.4.1. Моноклональные антитела к белкам семейства Her (ErbB). Моноклональные антитела к белкам семейства Her включают направленные против связывания с лигандом и лиганд-зависимой активации (антитела к EGFR), лиганд-независимой активации (антитела к Her2, например, трастузумаб) и новый класс антител, который предотвращает гетеродимеризацию рецептора. Современные препараты этой категории представлены в Таблице 2. Антитела, блокирующие лиганд-зависимую активацию EGFR тестировались в многочисленных клинических сценариях, таких как моно-терапия и терапия на фоне общепринятых цитотоксических препаратов. Клиническая активность показана при целом ряде онкологических заболеваний, таких как немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, рак головы и шеи. Результаты, что вполне ожидаемо, оказались крайне чувствительны к виду терапии (совместная или моноагент), режиму химиотерапии, стадии болезни и продолжительности самих испытаний (крайние точки).

При раке ободочной кишки активность впервые была показана для препарата цетуксимаб (химерный иммуноглобулин G2, полученный на основе мышиного моноклонального антитела 225). Было замечено, что комбинированный режим с цетуксимабом снимает резистентность к химиотерапии при запущенном и устойчивом к ней заболевании [80]. Это наблюдение было подтверждено в последующих исследованиях, например, в работе Сальца и коллег, где показано, что комбинация цетуксимаба и ирринотекана клинически активна у пациентов, которые не отвечали на традиционную терапию ирринотеканом. Позже было проведено аналогичное исследование на большей группе пациентов (329 человек), где ответ на комбинированную терапию (цетуксимаб плюс ирринотекан) был примерно вдвое выше, чем на монотерапию ирринотеканом (22,9% против 10,8%). Эти результаты привели к тому, что комбинация «цетуксимаб плюс ирринотекан» была одобрена для использования при ирринотекан-резистентной карциноме ободочной кишки сначала в США, а затем и в Европе.

Карцинома головы и шеи – еще один пример EGFR-положительной опухоли. И здесь антитела против EGFR хорошо себя зарекомендовали. В клинических тестах цетуксимаба на больных, резистентных к терапии платиновыми солями (общепринятая

химиотерапия при карциноме головы и шеи), где цетуксимаб давался «в нагрузку» к последней, ответ был равен примерно 10% (выживаемость 6 месяцев). При этом в клинических испытаниях с аналогичными больными и цетуксимабом в качестве моноагента ответ был зафиксирован в 12% случаев, что даже превышает показатели совместной терапии. Поэтому разумным вариантом при этом типе опухоли и резистентности к традиционным протоколам химиотерапии представляется лечение цетуксимабом как моноагентом, что позволяет избежать токсичности химиотерапии и дает аналогичный процент ответа на терапию. Это подтверждается данными по схожей группе пациентов, где при лечении только солями платины ответ был 3,4% и выживаемость составляла 3 месяца. Цетуксимаб также показал хорошие результаты в комбинации с лучевой терапией (выживаемость 54 месяца против 28).

Таблица 2. **Моноклональные антитела против белков семейства EGFR в терапии онкологических заболеваний**

Агент	Характеристика	Мишень	Тип опухоли	Стадия исслед.
Цетуксимаб (cetuximab)	химерное	Her-1	КОК, ГШ, НМКРЛ, ПЖ	На рынке Фаза III
АВХ-EGF / Панитумумаб (Panitumumab)	человеческое	Her-1	КОК, ПЧ	Фаза III
EMD-7200 / Матузумаб (Matuzumab)	гуманизированное	Her-1	ГШ, ЯИ, КОК, ШМ	Фаза II
h-R3	гуманизированное	Her-1	ГШ	Фаза II
Пертузумаб (pertuzumab)	гуманизированное	Her-2	ГР, ЯИ, ПР, НМКРЛ	Фаза II
Трастузумаб (trastuzumab)/ Герцептин (herceptin)	гуманизированное	Her-2	ГР	На рынке

Сокращения: КОК – карцинома ободочной кишки, ГШ – рак головы и шеи, НМКРЛ – немелкоклеточный рак легкого, ПЖ – рак поджелудочной железы, ПЧ – рак почки, ЯИ – рак яичников, ШМ – рак шейки матки, ГР – рак груди, ПР – рак предстательной железы.

На поздних стадиях карциномы ободочной кишки показана клиническая активность АВХ-EGF (полноценное человеческое антитело, торговое название панитумумаб, II фаза). В этом исследовании 15 из 148 (т. е. 10%) пациентов, не ответивших на традиционную химиотерапию, достигли клинического ответа с применением панитумумаба. Аналогичный эффект наблюдался и при использовании гуманизированного антитела EMD-72000 (Матузумаб). Исследуется также новый класс антител, которые предотвращают димеризацию рецептора EGF. Примером может служить пертузумаб. Это антитело связывается с Her-2, стерически блокируя возможность формирования димеров с другими членами семейства белков Her, таким образом, предотвращая инициализацию каскада внутриклеточных сигналов (как указывалось выше, именно димеры с HER-2 связывают с наиболее активными проявлениями проонкологических сигналов). В настоящее время идут клинические исследования II фазы пертузумаба в качестве моно-агента (карцинома яичников, немелкоклеточная карцинома легкого, рак груди и предстательной железы).

1.2.4.2. Ингибиторы тирозин-киназной активности Her. Этот класс препаратов конкурирует с АТФ за связывание с тирозин-киназным доменом рецептора, таким образом, блокируя сигнальную последовательность EGFR. Основываясь на ранних исследованиях I фазы, изучение эффективности данных препаратов проходит, в основном, на немелкоклеточном раке легких. Два препарата этой группы, эрлотиниб (Tarceva, Genetech) и гефинитиб (Iressa, Astro-Zeneca), одобрены для применения в США и Европе. Они оба блокируют сигналы тирозин-киназ EGFR (Her-1). По каждому из них было проведено по классическому исследованию III фазы на большом числе пациентов с крайней стадией немелкоклеточного рака легких, однако, несмотря на все сходство результатов более ранних исследований, итоги получились разными. Оба исследования были рандомизированными, моноагент против плацебо. Исследование с эрлотинибом (BR.21) показало статистически значимое увеличение продолжительности жизни (6.7 мес. против 4.7 мес.) и жизни без прогресса болезни (2.2 против 1.8 мес.), ответ 8.9% (всего 731 пациент). Аналогичное исследование с гефинитибом (ирессой) показало похожий процент ответа, однако не выявило влияния препарата на увеличение продолжительности жизни по сравнению с плацебо. В настоящее время неясно, чем вызвано это расхожде-

ние. Клинический эффект gefinitiba и erlotiniba не вызывает сомнения, однако ясно, что в некоторых группах он выше, чем в остальных (у пациентов с бронхоальвеолярной карциномой, никогда не куривших, женщин и пациентов из Японии). Таким образом, напрашивается мнение, что результаты могут зависеть от выборки пациентов, точнее, от некоторых особенностей экспрессии EGFR этими опухолями. Совсем недавно была открыта соматическая мутация в экзонах 18-21, кодирующих тирозин-киназный домен EGFR. Возможно, дело в различном профиле активности препаратов типа эрлотиниба и gefinitiba по отношению к «нормальному» и «мутантному» EGFR и соотношении этих генотипов среди пациентов. В настоящее время ясно, что пациенты с «мутантным» EGFR более восприимчивы к терапии такого рода агентами, даже на крайней стадии заболевания (мутации наиболее часты как раз у никогда не куривших, у пациентов японского происхождения и среди прочих упомянутых выше групп). Таким образом, целесообразно дальнейшее деление пациентов на подгруппы для более полной оценки и понимания результатов клинических исследований. Наиболее перспективные ингибиторы тирозин-киназной активности белков семейства Her представлены в Таблице 3.

Таблица 3. **Ингибиторы тирозин-киназной активности белков семейства Her в терапии онкологических заболеваний**

Агент	Ингибирование	Мишень	Тип опухоли	Стадия исследования
Гефинитиб (Gefinitib)	Необратимое	Her-1	НМКРЛ	На рынке
Эрлотиниб (Erlotinib)	Необратимое	Her-1	НМКРЛ, ПЖ	На рынке
Лапатиниб (Lapatinib)	Необратимое	Her-1 / 2	ГР	Фаза III
CI-1033	Обратимое	Her-1 – Her4	РК	Фаза II
ЕКВ-569	Обратимое	Her-1	КОК	Фаза II
АЕЕ788	Необратимое	Her-1 / 2, анти VEGFR	-	Фаза I

Сокращения: КОК – карцинома ободочной кишки, НМКРЛ – немелкоклеточный рак легкого, ПЖ – рак поджелудочной железы, ГР – рак груди, РК – рак кожи.

1.2.5. Прочие про-ангиогенные факторы

Ангиопоэтины. Ангиопоэтины были открыты как лиганды к Tie-рецепторам, которые экспрессируются почти исключительно на клетках сосудистого эндотелия (аналогично VEGFR). Важнейшими факторами ангиогенеза являются Ang1 и Ang2, а также их общий рецептор Tie2. Было показано, что у нокаутных по Ang1 или Tie2 мышей формируется вполне нормальная первичная сосудистая сеть (при отсутствии VEGF или VEGFR она летально аномальна), которая, однако, не в состоянии перейти к дальнейшему росту и ремоделированию. Причиной дефектов является неспособность клеток эндотелия, на которых находится Tie рецептор, связываться с поддерживающими клетками, в норме предоставляющими Ang1. На основании этого был сделан вывод, что Ang1 оптимизирует интеграцию эндотелиальных клеток и клеток поддержки, позволяя им получать необходимые сигналы из своего окружения [81]. Трансгенная сверхэкспрессия Ang1 ведет, так же как и сверхэкспрессия VEGF, к гиперваскуляризации. Однако если в случае с VEGF увеличивается число сосудов, то при сверхэкспрессии Ang1 сосуды увеличиваются в размерах, то есть в диаметре. Таким образом, в то время как VEGF вызывает рост многочисленных эндотелиальных «побегов», Ang1 ведет к «росту в ширину». Более того, если при сверхэкспрессии VEGF формируются незрелые, «протекающие» и склонные к кровоизлияниям сосуды, то при сверхэкспрессии Ang1 они, наоборот, слишком «плотные». Это объясняется способностью Ang1 максимизировать взаимодействия между эндотелиальными клетками и окружающими поддерживающими клетками и матриксом.

Некоторое время считалось, что Ang2 является антагонистом Tie2. Действительно, его сверхэкспрессия вела к эффектам, схожим с эффектами в нокаутных по Ang1 или Tie2 мышях. Во взрослом организме экспрессия Ang2 повышена в случае, когда сосуды претерпевают активное ремоделирование (менструальный цикл у женщин или опухолевый ангиогенез) [83, 83]. Эти данные позволяют предполагать, что функцией Ang2 является дестабилизация сосудистой сети, в противоположность Ang1, который поддерживает ангиогенные процессы во взрослом организме в «спящем» состоянии. В ряде исследований показано, что Ang2 является одним из самых ранних маркеров ангиогенеза. Причем в отсутствие VEGF дестабилизация сосудов ведет к активации процессов апоптоза и их

разрушению, а в его присутствии – к ангиогенезу, то есть к «выпусканию» эндотелиальных побегов (ведь первой стадией ангиогенеза является деградация матрикса, что как раз и обеспечивает Ang2) [8]. Гипотеза о том, что при опухолевом ангиогенезе Tie2 рецептор заблокирован Ang2 и поэтому недоступен для Ang1-сигналирования, очень хорошо объясняет тот факт, что опухолевая сосудистая сеть является незрелой, склонной к «протеканию» и кровоизлияниям.

Выделенный из тромбоцитов фактор роста (PDGF). Выделенный из тромбоцитов фактор роста (PDGF) является митогеном для мезенхимальных клеток, но в некоторых исследованиях показано, что и эпителиальные и эндотелиальные клетки также могут отвечать на данный фактор роста. PDGF – димерный протеин, состоящий из связанных А и В полипептидных цепей, кодирующихся различными генами. Все три изоформы (AA, AB, BB) изолированы от источника и связываются двумя различными рецепторами. Рецептор PDGF- α связывает все три изоформы высокой и равной аффинитивностью, тогда как рецептор PDGF связывает только PDGF-BB с высокой аффинитивностью, а PDGF-AB – с низкой. Выявлено, что PDGF-B и PDGFR- α обнаружены в раковых и пограничных опухолях яичников, но не найдены в нормальном яичниковом эпителии. Кроме того, экспрессия PDGFR- α в опухолевых клетках значительно коррелирует со снижением продолжительности жизни, а PDGFR- β не обнаружен в эпителиальных опухолевых клетках [67].

Трансформирующий фактор роста (TGF). Структурным аналогом EGF, на 30% гомологичным по первичной структуре и взаимодействующим с EGFR, является TGF- α . Он конкурирует с EGF и проявляет сильное митогенное действие. Доказательством выраженных митогенных свойств является факт обнаружения EGF в половине образцов биоптатов рака эндометрия, а TGF- α – почти во всех образцах. TGF- α принимает участие в росте и стимуляции дифференциации фолликулов и пролиферации клеток гранулезы. Полагают, что TGF- α является одним из аутокринных факторов роста рака яичника; увеличение экспрессии этого фактора отмечается при инвазивном раке шейки матки [67].

Семейство TGF- β в настоящее время представлено фактором β 1 (впервые обнаружен в тромбоцитах), фактором β 2 (выявлен в тромбоцитах, костной ткани и в некоторых клеточных линиях) и фактором β 3 (обнаружен во многих клеточных линиях преимуще-

ственно мезенхимального происхождения). TGF- β – мультифункциональный пептид, который может как стимулировать, так и ингибировать клеточную пролиферацию и дифференциацию. Экспрессия TGF- β 1 возрастает при многих опухолях, в том числе при раке предстательной железы. В экспериментах с опухолевой трансформацией онкогенами *ras* и *myc* показана роль TGF- β 1 и TGF- β 2 в процессе перехода доброкачественной гиперплазии в злокачественную.

Фактор роста фибробластов. Фактор роста фибробластов (ФРФ, FGF) – представитель семейства ГСФР-1 (кислый ФРФ, или α -ФРФ), ГСФР-2 (основной ФРФ, или β -ФРФ), гена *int-2*, гена *hst* (ФРФ саркомы Капоши), а также ФРФ-5, ФРФ-6 и фактор роста кератиноцитов. Иммуногистохимически выявлено, что ФРФ локализуется на базальных мембранах средних кровеносных сосудов и на гладкомышечных клетках, на эндотелиальных клетках капилляров и базальной мембране многих тканей. Основной ФРФ был найден в экстрактах клеточных линий эндометриальной аденокарциномы, где их секреция регулировалась стероидными гормонами [84].

Матриксные металлопротеазы (MMPs). MMPs человека представляют собой семейство матрикс-разрушающих ферментов. MMPs обладают деградирующей способностью в отношении почти всех компонентов экстраклеточного матрикса, встречающихся в соединительных тканях (коллагена, фибронектина, ламинина, протеогликанов и др.). Помимо сходства на уровне аминокислотной последовательности, все MMP образуются из неактивных предшественников, которые превращаются в активные протеиназы под воздействием внеклеточных факторов. Источниками образования MMPs являются фибробласты, макрофаги, гладкомышечные клетки сосудистой стенки, нейтрофилы. Любая опухоль является мощным индуктором образования MMPs в клетках стромы. Способствуя инвазии опухолевого роста и метастазированию, MMPs в то же время являются мощными стимуляторами неоангиогенеза [84].

Селектины. Имеется достаточно доказательств в пользу того, что селектины не только обеспечивают перемещение лейкоцитов вдоль поверхности эндотелиальных клеток кровеносных сосудов к сайту воспаления, но также способствуют прогрессу и метастазированию опухолей. Е-селектин и Р-селектин участвуют в ангиогенезе [84]. В ряду исследований показано участие Е-селектина в

формировании капилляр-подобных трубочек и в хемотаксисе эндотелиальных клеток. *In vivo* рекомбинантный растворимый Е-селектин индуцирует неоваскуляризацию, если имплантирован в роговицу крысы, а Р-селектин способствует миграции эндотелиальных клеток дозово-зависимым способом, которая блокируется специфическими антителами.

I.3. Анти-ангиогенез и анти-ангиогенная терапия

I.3.1. Эндогенные анти-ангиогенные факторы

В норме во взрослом организме сосудистая сеть находится в «спящем» состоянии, и поэтому, согласно общепризнанной в настоящее время теории ангиогенного переключателя, должны существовать эндогенные анти-ангиогенные факторы, которые поддерживают ее в таком состоянии. Действительно, такие факторы имеются – это тромбоспондины, ангиостатин, эндостатин и другие. К настоящему времени описано более 40 эндогенных ингибиторов ангиогенеза. Они делятся на 4 категории: интерфероны, интерлейкины, тканевые ингибиторы металлопротеаз и протеолитические фрагменты. Последние приобрели значение в качестве терапевтических агентов. Рассмотрим их поподробнее. Большинство выделяют из компонентов экстраклеточного матрикса (коллаген, фибронектин) или из ферментов, таких как плазминоген или ММР-2, которые ремоделируют ЭКМ.

Ангиостатин. Анти-ангиогенный эффект этого фрагмента плазминогена с массой 38 kDa обусловлен, по крайней мере, частично, способностью уменьшать экспрессию VEGF в опухоли [85]. Также показано, что связывание ангиостатина с α/β субъединицами АТФ-синтазы на поверхности цитоплазматической мембраны эндотелиальных клеток замедляет АТФ-метаболизм, а значит, вызывает анти-ангиогенный эффект через снижение пролиферации и миграции клеток эндотелия. Вместе с этим ангиостатин вызывает митотический арест у эндотелиальных клеток, то есть пролиферация подавляется с привлечением сразу нескольких механизмов. Поскольку размножение и миграция клеток эндотелия являются одними из ключевых процессов ангиогенеза, действие этого эндогенного анти-ангиогенного фактора очень эффективно. Кроме по-

давления пролиферации ангиостатин еще приводит к апоптозу эндотелиальных клеток и, следовательно, к снижению плотности сосудов в опухоли [86, 87].

Эндостатин. Биологически активный С-терминальный фрагмент коллагена VIII с молекулярной массой 20 kDa относится к семейству коллагеноподобных белков. Доказано, что эндостатин подавляет пролиферацию эндотелиальных клеток, ангиогенез и даже замедляет или прекращает рост опухоли. Во-первых, это соединение блокирует фосфорилирование Flk-1/KDR рецептора VEGF. Во-вторых, эндостатин подавляет обусловленные действием VEGF сигналы через p38 MAPK и ERK, которые активируют размножение и миграцию эндотелиальных клеток. Также эндостатин напрямую связывается с рецептором Flk-1/KDR, блокируя тем самым действие VEGF. Таким образом, основные эффекты эндостатина направлены против миграции и пролиферации эндотелиальных клеток [12]. Он также способствует апоптозу, повышая уровень апоптотических белков (bcl-2) без изменения уровня антиапоптотических (BAX) [88].

Тромбоспондин-1 (TSP-1). Тромбоспондин-1 – естественный ингибитор ангиогенеза, который органичивает плотность сосудов в нормальных тканях и подавляет опухолевый рост. Его антиангиогенная активность обусловлена связыванием с CD36 рецептором, что активирует сигнальную цепь апоптоза эндотелиальных клеток. Вкратце, активированная p38 MAPK ведет к активации каспазы-3. Интересно, что апоптотический эффект TSP-1 проявляется только в образовавшихся в процессе ангиогенеза опухолевых сосудах и не затрагивает нормальные «спящие» сосуды [89]. Также через CD36 тромбоспондин-1 модулирует активность фокальной адгезивной киназы (ФАК) и таким образом, подавляет пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток.

I.3.2. Обоснование анти-ангиогенной терапии

Поскольку развивающаяся опухоль зависит от сосудов, предоставляющих ей кислород и питательные вещества, возможность успеха анти-ангиогенной (то есть направленной на подавление опухолевых сосудов) терапии была высказана еще в самых ранних работах по ангиогенезу [1, 90, 91]. И так как ангиогенез является ключевым процессом для роста опухоли, в настоящее время его

подавление признано одним из важнейших направлений в разработке эффективных лекарств против рака [92]. Опухолевый ангиогенез зависит от специфических факторов роста, наличия и активации соответствующих рецепторов на эндотелиальных клетках, пролиферативная активность эндотелиальных клеток и взаимодействие активно размножающихся клеток эндотелия с компонентами экстраклеточного матрикса. Все эти этапы могут блокироваться специфичными агентами.

Преимущества анти-ангиогенной терапии очевидны. Во-первых, она направлена не только против «основной» опухоли, но и против отдаленных метастазов, зачастую удерживая их в латентном состоянии длительное время (в теории – неограниченное). Поскольку основной мишенью анти-ангиогенных препаратов служат делящиеся эндотелиальные клетки, для которых характерна относительная стабильность геномного аппарата, то такая терапия не вызывает лекарственной резистентности. Также при антиангиогенной терапии отсутствуют характерные для химиотерапии побочные эффекты (угнетение кроветворения, реакция со стороны ЖКТ, выпадение волос и т. д.), поскольку она является скорее цитостатической, нежели цитотоксичной. Большинство анти-ангиогенных препаратов в небольших дозах можно вводить на протяжении длительного промежутка времени [93]. Дополнительно необходимо исследовать возможные побочные эффекты анти-ангиогенных препаратов, которые могут включать нарушения в заживлении ран, тромбозомболию и нарушения нормального овуляционного цикла у взрослых женщин.

Стоит заметить, что в клинических исследованиях монотерапия анти-ангиогенными препаратами показала хотя и достоверные, но весьма скромные результаты. Однако совместно с химиотерапией эффект оказывается куда более впечатляющим – например, антитело против VEGF («Авастин»), применяемое совместно с обычным курсом химиотерапии, вызвало беспрецедентное 5-месячное увеличение выживаемости у больных колоректальным раком [94]. Эти клинические данные подтверждают более раннюю гипотезу, предложенную Тейчером, о том, что комбинация двух терапий – химио- и анти-ангиогенной будет наиболее эффективна для раковых больных, поскольку будет одновременно направлена против двух важных составляющих – опухолевых клеток и эндотелиаль-

ных клеток. Химиотерапия убивает раковые клетки напрямую, а анти-ангиогенная – косвенным способом, лишая их питательных веществ и кислорода. Кроме того, поскольку некоторые опухолевые клетки экспрессируют рецепторы к про-ангиогенным факторам роста (VEGFR1, VEGFR2), то анти-ангиогенная терапия может вредить им и напрямую, вмешиваясь в их сигналы выживания или делая более чувствительными к другим агентам.

На сегодняшний день идентифицирован ряд основных анти-ангиогенных мишеней. Ключевым является ингибирование факторов роста, которые стимулируют размножение эндотелиальных клеток; ингибирование протеаз, необходимых эндотелиальным клеткам для проникновения через базальную мембрану для формирования новых сосудов; разрыв специфичных внутриклеточных сигнальных трансдукционных путей; стимуляция апоптоза эндотелиальных клеток либо ингибирование факторов их выживаемости; ингибирование предшественников эндотелиальных клеток; подавление взаимодействий интегринов $\alpha\beta_3$, играющих ключевую роль в сопутствующей неоваскуляризации адгезии эндотелиальных клеток к ЭКМ (экстраклеточному матриксу) [8, 95].

I.3.3. Обзор современных анти-ангиогенных препаратов

Моноклональные антитела против VEGF. Бевакузумаб (Bevacuzimab, Avastin) является гуманизированным моноклональным антителом против VEGF-A с доказанными в преclinical исследованиях анти-ангиогенными и анти-опухолевыми свойствами. В ряде работ (фаза I) показано, что препарат, не являясь токсичным в применяемых дозах, уменьшает проницаемость сосудов (исследование с помощью DEMRI) и количество свободного VEGF. Исследования фазы II показали, что бевакузумаб способствует регрессу опухоли или увеличивает время ее прогрессии по сравнению с плацебо или только цитотоксической терапией [92]. Рандомизированное исследование фазы III у 800 ранее не получавших лечения пациентов с метастатическим колоректальным раком, в котором сравнивались эффекты ИФЛ-терапии (ирринотекан, 5-флуорацил, лейковорин) и ИФЛ-терапии совместно с бевакузумабом показало увеличение ответа на химиотерапию, увеличение времени прогресса опухоли и значительное увеличение выживаемости при отсутствии тромбозэмболических побочных эффектов

[94]. Бевакузумаб (Авастин) на сегодняшний день является единственным клинически одобренным FDA (Food and Drugs Association, USA) моноклональным антителом против VEGF для лечения больных колоректальным метастатическим раком в комбинации с химиотерапией.

VEGF-trap представляет собой специфичный антагонист VEGF, который связывается и впоследствии инактивирует VEGF. Есть данные, что он имеет большее сродство к VEGF нежели моноклональные антитела и может вводиться подкожно. В настоящее время идут преклинические исследования этого препарата [96].

Антитела против VEGFR-2. Поскольку взаимодействие лиганд-рецептор VEGF и VEGFR-2 является ключевым моментом в процессе ангиогенеза, помимо блокирования VEGF разумным представляется и блокирование рецептора, VEGFR-2. Несмотря на это, антитела к VEGFR получают намного меньше внимания ученых, и пока известно только несколько пре-клинических исследований (фаза I). В небольшом исследовании Posey и коллег показано, что такой препарат, IMC-1C11, не является токсичным [97].

Ингибиторы тирозин-киназной активности рецепторов. В преклинических исследованиях SU5416 продемонстрировал антиангиогенные и противоопухолевые свойства, и стал первым низкомолекулярным ингибитором тирозин-киназной активности рецептора VEGF, с которым проводились клинические испытания. Однако в фазах I и II этот препарат вызывал рвоту и тромбоэмболические побочные эффекты, а также, несмотря на некоторые данные об уменьшении плотности микрососудов, его биологическая активность не была доказана в рандомизированном исследовании (фаза III) пациентов с метастатическим колоректальным раком, после чего дальнейшее развитие SU5416 было признано нецелесообразным. SU11248 является ингибитором тирозин-киназной активности широкого действия (VEGF, PDGF, c-Kit, Flt-3), который в исследованиях фазы I (14 или 28 дней терапии) привел к регрессу опухоли.

Таблица 4. Экспериментальные ингибиторы VEGF/VEGFR

Препарат	Тип	Мишень	Производитель
Бевакузумаб / Авастин (Bevacuzimab / Avastin)	Моноклональное антитело	VEGF-A	Genetech

IMC-1121B	Моноклональное антитело	VEGFR-2	ImClone Systems
CDP-791	ПЭГ-илированный ди-Fab-фрагмент	VEGFR-2	Celltech
2C3	моноклональное антитело	VEGF-A	Peregrine
PTK-787	ИТКА (ингибитор тирозин-киназной активности)	VEGFR-1,-2	Novartis
AEE788	ИТКА	VEGFR-2, EGFR	Novartis
ZD6474	ИТКА	VEGFR-1,-2,-3, EGFR	AstraZeneca
AZD2171	ИТКА	VEGFR-1,-2	AstraZeneca
SU11248	ИТКА	VEGFR-1,-2, PDGFR	Pfizer
AG13925	ИТКА	VEGFR-1,-2	Pfizer
AG013736	ИТКА	VEGFR-1,-2	Pfizer
CEP-7055	ИТКА	VEGFR-1,-2,-3	Cephalon
CP-547, 632	ИТКА	VEGFR-1,-2	Pfizer
VEGF-trap	растворимый гибридный рецептор	VEGF-A, PlGF	Aventis / Regeneron
GW786024	ИТКА	VEGFR-1,-2,-3	GalaxoSmithKline
Bay 93-4006	ИТКА	VEGFR-1,-2, PDGFR	Bayer / Onyx
AMG706	ИТКА	VEGFR-1,-2,-3	Amgen

Показана и биологическая активность препарата (уменьшение свободного VEGFR-2, увеличение уровня VEGF в сыворотке), однако эти позитивные эффекты сопровождались органичивающей дозу токсичностью (усталость, летаргия, миелосупрессия), а также двое пациентов умерли от вызванного препаратом сепсиса. В настоящее время идут исследования фазы II. Таблица 4 отображает перспективные препараты описываемого класса.

РТК787/ZK22854 – пригодный для перорального лечения агент, среди эффектов высокой дозы которого – боязнь высоты, атаксия, повышение давления. Биологическая активность была продемонстрирована с помощью DEMRI-анализа, который выявил зависимое от дозы уменьшение потока крови через опухоль. В настоящее время идут исследования фазы II и III комбинированного применения этого препарата с химиотерапией.

ZD6474 является ингибитором тирозин-киназной активности как VEGFR, так и EGFR. Побочные эффекты после длительного применения (ограничивающие дозу) состояли из повышения давления, токсичности для печени, кожной сыпи и диареи. Последние два симптома говорят о блокировании активности рецептора эпителиального фактора роста, что еще раз подтверждает широкий спектр действия этого агента.

Экспериментальные ингибиторы тирозин-киназной активности AG013736 и AG013925 (Pfizer, La Jolla) продемонстрировали эффективную регрессию эндотелиальных клеток с 70% уменьшением плотности сосудов.

Ингибиторы пролиферации эндотелиальных клеток. Тромбоспонгин-1 (TSP-1) является эндогенным ингибитором ангиогенеза, но так как это очень большая молекула, его использование в терапии ограничено. Его анти-ангиогенные эффекты обусловлены N-терминальной областью, что привело к появлению TSP-1-подобных белков с меньшей массой. АВТ-510 является представителем этого семейства, который может вводиться подкожно. Клинические испытания фазы I показали его отличную переносимость вне зависимости от дозы, начаты испытания фазы II (немелкоклеточная карцинома легкого и почечная карцинома). Также клинические испытания (фаза I) проводятся для ангиостатина и эндостатина [95].

Ингибиторы активности интегринов. Витаксин (Vitaxin) – антитело против интегрин $\alpha\beta3$, может вводиться подкожно (фаза I и II, последняя не показала антиопухолевую активность). Medi-522, гуманизированное антитело против $\alpha\beta3$ рецептора (фаза I) [98]. Силенгитид, низкомолекулярный ингибитор интегринов $\alpha\beta3$ и $\alpha\beta5$, в клинических испытаниях (фаза I) показал отличную переносимость и отсутствие побочных эффектов. Дальнейшие исследования продолжаются.

I.3.4. Гипотеза о нормализации сосудов. Потребность в надежных биомаркерах раннего ответа на анти-ангиогенную терапию

Как уже было сказано ранее, анти-ангиогенная терапия отлично сочетается с химиотерапией и лучевой терапией, почти всегда повышая их эффективность. Однако исследователь Ракеш Джейн заметил в этом парадокс – ведь если ингибиторы ангиогенеза разрушают сформировавшиеся в результате опухолевого роста сосуды, то должны ухудшиться доставка цитотоксических лекарств и повыситься уровень гипоксии, что не может не привести к уменьшению эффективности как химио-, так и лучевой терапии. Действительно, в некоторых исследованиях есть и такие данные [99, 100]. Как же объяснить эти противоречивые результаты? Джейн предположил, что при определенных (небольших) дозах анти-ангиогенные препараты способны вызвать «нормализацию» неэффективной, «протекающей» опухолевой сосудистой сети, делая ее более приближенной к таковой в здоровых тканях. Напомним, что опухолевые сосуды характеризуются нарушенной морфологией, перicyты прилегают слишком свободно и местами вообще отсутствуют (что обуславливает «протекание» сосудов), базальная мембрана крайне неравномерна, имеется много «тупиковых» ветвей, сами сосуды расширены и так далее. Эти аномалии вызваны сверхэкспрессией VEGF и других про-ангиогенных факторов. Значит, рассуждает Джейн, некоторая доза подавляющего активность VEGF и прочих факторов препарата способна «исправить» вызванные ими эффекты [101]. Именно поэтому во многих случаях терапия ингибиторами ангиогенеза способствует лучшим результатам химиотерапии (улучшаются каналы доставки лекарств) и лучевой терапии (ткань становится более насыщенной кислородом). Рассмотрим Рис. 8 более подробно. В первой строке (А) мы видим, что, в отличие от нормальной сосудистой сети, опухолевая структурно и функционально аномальна. В определенных дозах анти-ангиогенная терапия способна к ее «нормализации». Однако слишком большая доза препарата или слишком длительное применение ведет к разрушению сосудистой сети и ее полной неспособности к доставке кислорода и лекарств. В строке (В) показана динамика нормализации сосудистой сети в ответ на блокаду VEGFR-2. Слева – нормальная сосудистая сеть скелетной мышцы (оптическая микроскопия). Далее – сосуды карциномы ободочной кишки (последо-

вательно день 0, день 3 и день 5) после лечения VEGFR-2 – специфичным антителом. В строке (C) отображаются сопутствующие изменения прилегающих перицитов (красный цвет) и базальной мембраны (синий цвет). Наконец, строка (D) иллюстрирует предпологаемый баланс про- и антиангиогенных факторов в тканях, соответствующий приведенным выше изменениям в фенотипе сосудистой сети.

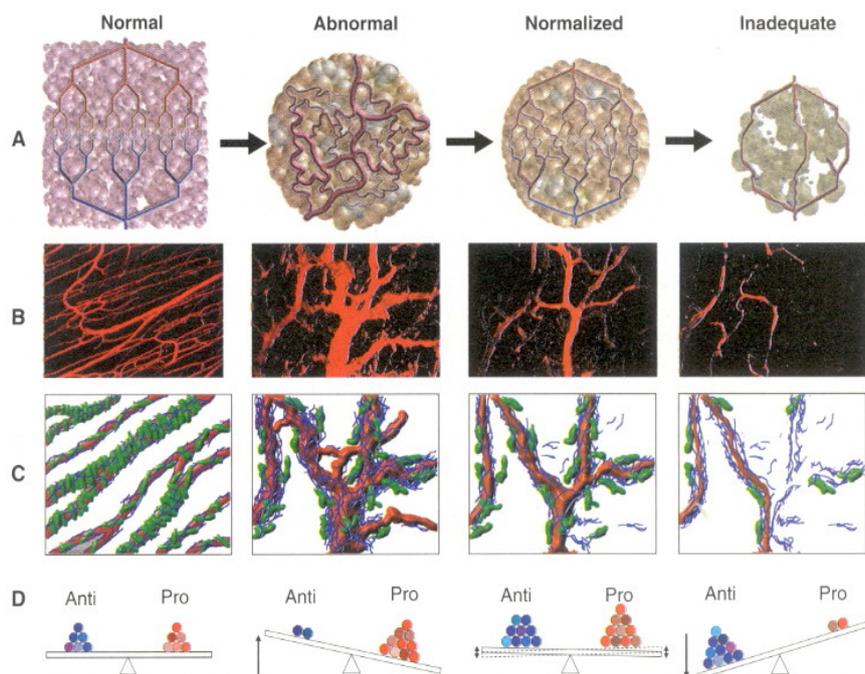


Рис. 8 [101]. Предложенный Р. Джейном механизм нормализации опухолевых сосудов в ответ на ингибиторы ангиогенеза

Р. Джейн предлагает альтернативу стандартной анти-ангиогенной терапии, направленную не на разрушение опухолевых сосудов, а на их нормализацию для улучшения условий доставки цитотоксичных препаратов и лучевой терапии. При этом, замечает он, если бы в настоящее время анти-ангиогенная терапия давала полную регрессию опухолевых сосудов без побочных эффектов, такой вопрос бы не ставился. Но, к сожалению, побочные эффекты

высоких доз ингибиторов ангиогенеза еще до конца не изучены и их безопасность в таких дозах не подтверждена. Ракеш Джейн предлагает «мягкую» терапию ингибиторами ангиогенеза, которая, нормализуя сосуды, готовила бы почву для химио- и лучевой терапии.

Прояснить ситуацию поможет эффективный мониторинг действия анти-ангиогенных препаратов при клинических испытаниях в целях определения оптимальной биологически активной дозы и «временного окна» для введения. Возникает потребность в определении надежных биомаркеров раннего ответа на анти-ангиогенную терапию [102]. Поскольку терапия ингибиторами ангиогенеза направлена на аномальные опухолевые сосуды, то естественно предположить, что роль маркеров призваны играть такие гемодинамические параметры, как объем крови в опухоли, поток крови через опухоль, проницаемость опухолевых сосудов и их плотность. Еще одним подходом является дизайн контрастных агентов, взаимодействующих с молекулярными маркерами ангиогенеза. Поскольку ингибиторы ангиогенеза специфичны по отношению к определенным ангиогенным молекулам (VEGF, EGFR, $\alpha v\beta 3$) или же косвенным способом направлены на подавление их активности, то оценка изменения количества в опухоли даст представление о ходе терапии. Также показано, что эти факторы могут представлять собой диагностическую и прогностическую ценность. Помимо прочего, для индивидуализации терапии было бы крайне ценным так называемое «типирование» опухолей, то есть создание индивидуального профиля по ключевым молекулярным маркерам. Мониторинг этих факторов в процессе лечения был бы также крайне полезен. Магнитно-резонансная томография (МРТ) — это неинвазивная методика, позволяющая получать информацию как о гемодинамических параметрах (объем крови в опухоли, поток крови и т. д.), так и о распределении молекулярных маркеров в опухоли. МРТ весьма практична в том смысле, что изначально используется при диагностике и мониторинге раковых заболеваний. В настоящее время в МРТ ангиогенеза существует ряд подходов с применением различных контрастных агентов.

Глава II МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

II.1. Клеточная культура

Линия человеческих клеток карциномы ободочной кишки MV522 была предоставлена Pfizer Global Research and Development (La Jolla, CA) и культивировалась в среде RPMI (Cellgro, Mediatech, Washington, DC) согласно общепринятому протоколу. Флуоресцирующая в красном диапазоне линия клеток, стабильно экспрессирующая DsRed2 (MV522-DsRed2) была получена, как описано в источнике [103].

A431 – клеточная линия эпидермоидной карциномы, выделенная из тканей 85-летней женщины (D.J. Giard et al). Формирует быстрорастущие подкожные опухоли у атимусных мышей и колонии в мягком агаре. Культивировалась в среде DMEM согласно общепринятому протоколу. Экспрессирует большое количество как EGFR (9×10^5), так и антигена L6 ($1,5-2 \times 10^6$) рецепторов на клетку [104, 105].

MDCK – линия клеток, выделенная из эпителия почки здоровой собаки (коккер-спаниэля) в 1958 году. Культивировалась в среде MEM согласно общепринятому протоколу. Уровень экспрессии EGFR низок.

II.2. Флуоресцентные пробы

F(ab')₂ фрагменты дигоксигенина (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) были помечены Су3-моносукцинимидным эфиром (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) [103]. Лектин помидора (*L. esculentum*) был помечен Alexa Fluor 488-гидросукцинимидным эфиром (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). Флуоресцентные конъюгаты были очищены на колонках Bio-Spin P-30 (Bio-Rad, Hercules, CA).

II.3. МР-контрастные агенты в магнитно-резонансной томографии

Магнитно-резонансная томография (МРТ) – визуализирующий метод, который широко применяется как в клинике, так и в иссле-

довательских целях. Несомненными достоинствами МРТ являются неинвазивность, отсутствие ионизирующих излучений, таких как при компьютерной рентгеновской или позитрон-эмиссионной томографии, а также высокое пространственное разрешение и глубина проникновения. Источником внутреннего контраста между мягкими тканями служит разница в таких параметрах, как содержание воды (протонов), времена релаксации, характеристики диффузии. МРТ реализуется благодаря небольшой неравномерности в распределении спинов протонов, помещенных во внешнее магнитное поле при тепловом равновесии. Она создает небольшую суммарную намагниченность. Равновесие может быть нарушено импульсом определенной (резонансной) частоты, равной частоте прецессии атомов в магнитном поле. РЧ импульс приводит систему в возбужденное состояние, но когда это поле выключается, система приходит к исходному равновесию посредством процесса, называемого релаксацией. После выключения РЧ-воздействия в системе будут параллельно протекать два процесса: восстановление намагниченности вдоль исходного направления (продольная релаксация) и потеря когерентности («расфокусировка») прецессирующих спинов в перпендикулярной ему плоскости (поперечная релаксация). За время T_1 (определяющееся взаимодействием спинов с решеткой) продольная компонента намагниченности изменяется в e раз (достигает 63% своего начального значения M_0). T_2 (время поперечной релаксации) является результатом взаимодействия между спинами, приводящего к потере поперечной намагниченности. В плоскости xy за время T_2 намагниченность уменьшается в e раз (теряет 63% своей первоначальной величины). Времена релаксации T_1 и T_2 , а также протонная плотность являются теми параметрами, которыми отличаются друг от друга ткани и жидкости, как нормальные, так и патологические [106].

Однако внутреннего МР-контраста тканей часто бывает недостаточно для поставленных перед исследователем целей (визуализации патологии, дифференцированного диагноза, оценки эффективности терапии, визуализации процессов, происходящих на молекулярном и клеточном уровне). Специфичность контраста может быть усилена при помощи вводимых внешних (экзогенных) контрастных агентов, которые изменяют интенсивность МР-сигнала. Чаще всего они вводятся внутривенно, хотя для определенных приложений необходима их интернализация клетками, которые впоследствии имплантируют локально (стволовые клетки, островки

Лангерганса и т. д.). По типу контраста агенты можно разделить на 2 группы: суперпарамагнитные T2-агенты, которые уменьшают интенсивность МР-сигнала на T2-взвешенных изображениях: монокристаллические частицы оксида железа (MION), ультрамалые и малые суперпарамагнитные частицы оксида железа (USPIO и SPIO) и парамагнитные T1-агенты, увеличивающие интенсивность МР-сигнала на T1-взвешенных изображениях (как правило, это агенты на основе гадолиния). В настоящее время по обоим направлениям ведутся интенсивные исследования. В данной работе использовались, в основном, контрастные агенты на основе гадолиния. Тому есть несколько причин: во-первых, позитивный сигнал легче обнаружить и соотнести с ожидаемым эффектом, в то время как уменьшение интенсивности сигнала может быть вызвано разнообразными причинами; во-вторых, малый размер агентов на основе гадолиния способствует их лучшему проникновению из сосудов в окружающие ткани. По специфичности T1 и T2 агенты можно условно разделить на а) неспецифичные (как правило, это низкомолекулярные агенты на основе гадолиния – к ним принадлежит большинство используемых в настоящее время в клинике агентов – или высокомолекулярные агенты сосудистого пула; см. Табл. 5); «прицельные» (англ. targeted) – агенты, связывающиеся/накапливающиеся в области цели (интересующего белка, пептида); «умные» (англ. smart) – изменяющие интенсивность МР-сигнала только в присутствии цели (белка, пептида интереса); «маркировочные» (англ. labeling) – интернализуются клетками, которые затем вводят в организм и следят за их дальнейшей судьбой.

Таблица 5. **Клинически одобренные контрастные агенты для МРТ на основе комплексов гадолиния**

Комплекс	Торговое название	Компания	Log K
GdDTPA	Magnevist	Schering	22.5
GdDOTA	Dotarem	Guerbet	24.7
GdHPDO3A	ProHance	Bracco	23.8
GdHPDO3A-butrol	Gadovist	Schering	20.8
GdDTPA-BMA	Omniscan	Nycomed-Amersham	16.8
GdDTPA-BMEA	OptiMARK	Mallinckrodt	16.8
GdBOPTA	MultiHance	Bracco	22.6
GdEOB-DTPA	Eovist	Schering	23.5

В настоящее время в клинической практике используются более десятка контрастных агентов на основе гадолиния; все они принадлежат к первой группе, то есть являются неспецифическими. «Прицельные», «умные» и «маркировочные» агенты пока находятся в стадии интенсивной разработки. Именно они позволят проводить так называемую «молекулярную визуализацию» (англ. molecular imaging) – наблюдать процессы, происходящие на молекулярном и клеточном уровне в живом организме.

Дизайн и разработка новых контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ) является быстро развивающимся исследовательским направлением на стыке нескольких наук – химии, биохимии, биофизики, молекулярной биологии, фармакологии. К контрастным агентам предъявляются высокие требования. Это:

- а) растворимость в воде
- б) химическая стабильность и возможность длительного хранения в форме для клинического использования
- в) низкая токсичность и высокая стабильность *in vivo* (свободный гадолиний обладает высокой токсичностью)
- г) быстрое выведение агента из организма
- д) создание/изменение значительного МР-контраста при введении (высокая чувствительность)
- е) Оптимальные фармакокинетические характеристики в зависимости от клинического приложения (специфичное связывание, маркировка клеток и т. д.).

Мерой эффективности (чувствительности) контрастного МР-агента является его релаксивность. Она определяется как изменение продольного (T1) или поперечного (T2) времени релаксации на единицу концентрации контрастного агента (R1 и R2 соответственно); единица измерения $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Соотношение R1 и R2 определяет, использовать ли конкретный агент для получения T1-взвешенных или T2-T2*-взвешенных МР-изображений. Так называемые T1 агенты (чаще всего это хелаты ионов гадолиния) характеризуются низким отношением R2 к R1 и создают положительный контраст (усиление интенсивности сигнала в области накопления), в то время как у T2 агентов это соотношение велико, что приводит к уменьшению интенсивности сигнала – негативному контрасту.

T1-агенты обычно содержат ионы парамагнитных металлов. Ионы металла должны уменьшать T1 без существенного уширения линии. Этому условию удовлетворяют ионы гадолиния, а также

ионы магния и железа. В присутствии T1-контрастного агента можно выделить две составляющих релаксивности, диамагнитную и парамагнитную:

$$R1 = R1_{dia} + R1_{para},$$

где $R1_{dia}$ – внутренняя релаксивность ткани без контрастного агента, а $R1_{para}$ – вклад контрастного агента.

Последняя составляющая может быть выражена как

$$R1_{para} = r1 [CA],$$

где $r1$ – релаксивность в $[mM^{-1}s^{-1}]$, а $[CA]$ – концентрация контрастного агента.

Учитывая, что $r1 = 1/T1$, приходим к известному выражению

$$1/T1 = 1/T1_{dia} + r1 [CA],$$

из которого следует, что уменьшение T1 (то есть релаксивность) прямо пропорционально концентрации агента (см. Рис. 9 в качестве примера). Следует заметить, что *in vivo* линейность этой зависимости может нарушаться (например, в случае, если контрастный агент связывается с белками плазмы или интернализуется клетками). Чем выше релаксивность, тем больше изменение времен релаксации и контраста МР-изображения, и следовательно, тем выше чувствительность метода.

$$\vec{R}_i = [\vec{C}\vec{A}]r_{ip} + \vec{R}_{iw}, \quad i = 1, 2.$$

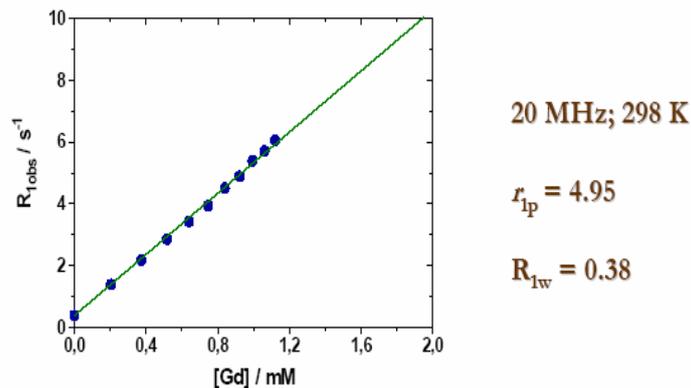
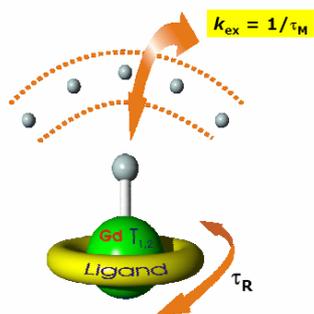
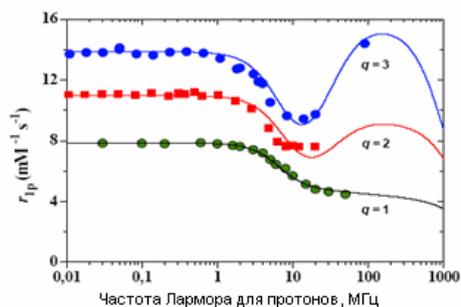


Рис. 9. Пример линейной зависимости релаксивности R1 от концентрации контрастного агента

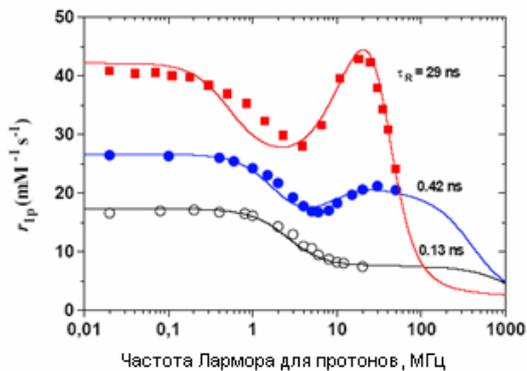
Увеличить релаксивность агента можно двумя способами: 1) усиление релаксивности в расчете на атом гадолиния путем создания комплекса с лучшими характеристиками или 2) увеличение числа атомов гадолиния на единицу контрастного агента, называемое еще «амплификацией метки» (например, если речь идет об антителе, которое специфично связывается с рецептором, то это означает «привязывание» к нему не одного, а нескольких десятков или сотен атомов гадолиния). Рассмотрим вначале первый способ (увеличение релаксивности комплекса гадолиния). Для этого нужно в общих чертах обрисовать факторы, влияющие на релаксивность. В релаксивность вносят вклад три компонента: вода (протоны), непосредственно координированная с ионом Gd (так называемая «внутренняя сфера»), молекулы воды, испытывающие влияние иона Gd, но непосредственно с ним не координированные («вторая сфера») и остальные молекулы воды («внешняя сфера»). Для различных агентов вклад каждой из составляющих может быть разным. Вклад внутренней сферы описывается теорией Соломона–Блумбергера–Моргана. На нее оказывают влияние такие параметры как q (число молекул воды, непосредственно координированных с ионом Gd), t_m (корреляционное время обмена), t_r (корреляционное время вращения) и t_d (корреляционное время диффузии, характеризующее передачу релаксации окружающим комплекс молекулам воды). Особое значение имеет t_r : замедление вращения комплекса приводит к увеличению релаксивности. Этого эффекта, например, можно добиться увеличением размера комплекса путем связывания с макромолекулой белка. Релаксивность также прямо пропорциональна q (для широко используемого комплекса Gd-DTPA $q=1$), поэтому увеличение числа координированных с ионом гадолия молекул воды является перспективным направлением в разработке T1-контрастных агентов с высокой релаксивностью. Желательно также, чтобы комплекс отличался быстрым обменом (характеризующимся t_m), поскольку в этом случае большее число молекул воды будет испытывать релаксацию. Все эти параметры взаимосвязаны и зависят от величины магнитного поля. Затрудняет дизайн T1-контрастных агентов то, что часто при оптимизации одного параметра в худшую сторону изменяется значение другого. Зависимость T1-релаксивности от параметров q , t_m и t_r при различных значениях магнитного поля приведена на Рис. 10.



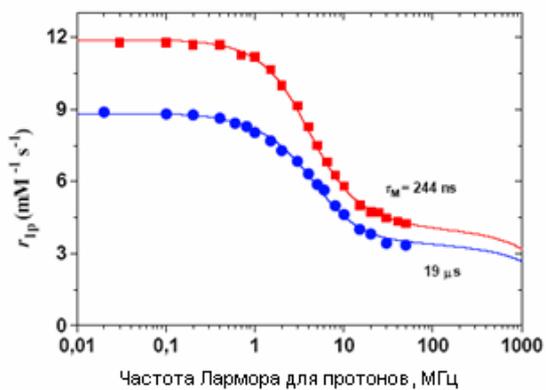
a



b



c



d

Рис. 10. Влияние внутренней сферы на релаксивность (r_1). (а) Схематическое изображение комплекса гадолиния. (б) Зависимость r_1 от напряженности поля при $q=1, 2, 3$. (в) Зависимость r_1 от напряженности поля при трех различных значениях τ_R . (д) Зависимость r_1 от напряженности поля для двух значений τ_M

Как уже было сказано выше, вторым способом увеличения чувствительности контрастного агента является так называемая «амплификация метки». Концентрация молекулярных маркеров – мишеней для молекулярной МРТ даже в наиболее благоприятных случаях является достаточно низкой (10^{-9} - 10^{-13} моль/г ткани, 10^3 – 10^6 рецепторов на клетку). Наиболее же используемые в настоящее время комплексы гадолиния (такие как Gd-DTPA) имеют чувствительность всего 10^{-7} моль/г ткани. Но если с одним рецептором будут связываться не один, а десятки или даже сотни или тысячи ионов гадолиния, то создание достаточной для визуализации концентрации контрастного агента вполне возможно (Рис. 11).

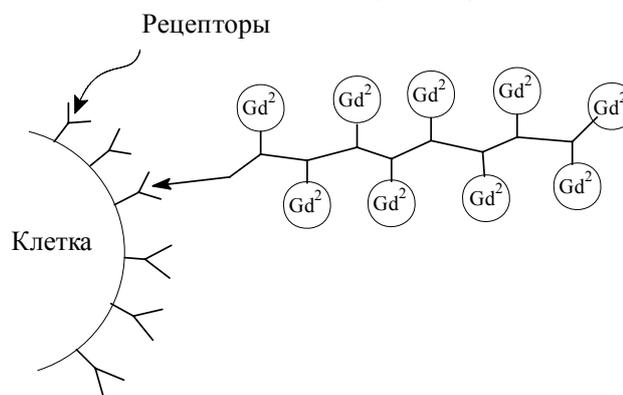


Рис. 11. Идея «амплификации метки». С одним рецептором специфично (например, через взаимодействие антиген-антитело) связывается контрастный агент, несущий большое количество хелатов гадолиния

В качестве «носителей» комплексов гадолиния используют белки (человеческий альбумин плазмы, поли-L-лизин), дендримеры (РАМАМ-G5, Gadomer-17), апоферритин, мицеллы и липосомы, фуллерены, углеродные нанотрубки и так далее. В настоящее время ведутся активные исследования в области создания и испытания этих контрастных агентов нового типа.

II.3.1. Gd-DTPA: общеупотребительный в клинике контрастный агент

«Магневист» – первое парамагнитное контрастное средство, разработанное специально для МР-томографии. В 1 мл препарата содержится 469 мг димеглюминовой соли гадопентетеновой кисло-

ты в водном растворе. «Магневист» зарегистрирован Министерством здравоохранения России (регистрационное удостоверение П-8-242 №003187 от 04.08.93). Действующим веществом препарата является Gd-DTPA, представляющий собой комплекс иона редкоземельного металла гадолиния (Gd^{3+}), относящегося к классу лантаноидов, в виде димеглюминовой соли гадопентетеновой кислоты (гадопентетат димеглюмина). Благодаря наличию семи неспаренных электронов гадолиний проявляет ярко выраженные парамагнитные свойства, наиболее сильно влияя на время релаксации T1. Ион гадолиния имеет девять координированных жестких связей: три с аминным азотом и пять с карбоксильным кислородом. Одна связь остается свободной для обмена молекулами воды (см. Рис. 12).

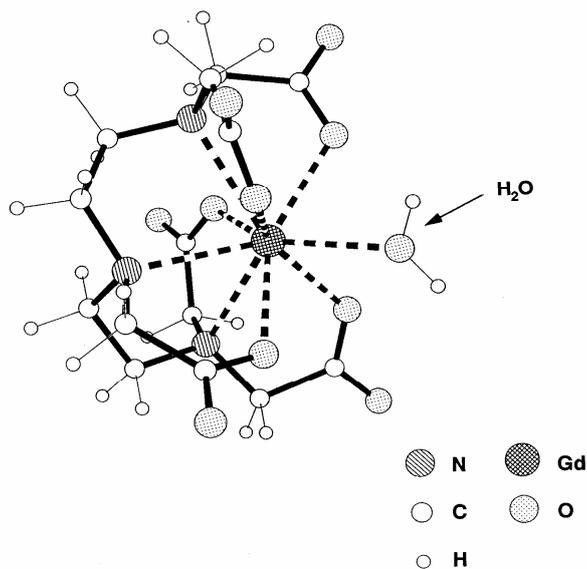


Рис. 12. Структура Gd-DTPA

При использовании хелатов металлов обычно наибольшее беспокойство вызывает возможное разрушение комплекса. Что касается Gd-DTPA, то это весьма прочный комплекс ($\log K = 22-23$), обладающий исключительно высокой стабильностью как в живом организме, так и в процессе хранения, и не требующий дополнительного введения химических стабилизаторов для предотвращения распада. Gd-DTPA является хорошо растворимым в воде со-

единением, имеющим высокую гидрофильность. С увеличением количества комплекса величина T1 уменьшается за счет диполь-дипольного взаимодействия, имеющего место благодаря значительному магнитному моменту, создаваемому неспаренными электронами парамагнитного иона [107]. На Рис. 13 показано, как концентрация парамагнитного комплекса гадолиния влияет на интенсивность сигнала SE-последовательности в магнитном поле 1.0 Тл (TR = 600 мс, TE = 15 мс) и 1.5 Тл (TR = 640 мс, TE = 20 мс) [108].

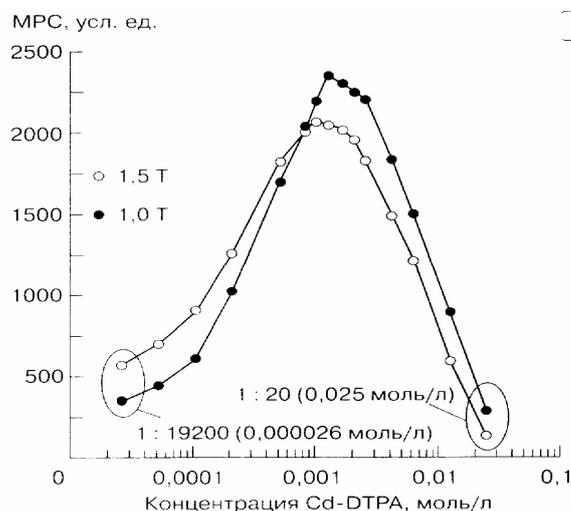


Рис. 13. [108]. Влияние концентрации парамагнитного комплекса гадолиния на интенсивность сигнала в магнитном поле 1.0 и 1.5 Тл (последовательность SE)

Особенности Gd-DTPA: неспецифичен, быстро вымывается из сосудистого русла.

II.3.2. PGC-Gd: внутрисосудистый контрастный агент

Защищенный графт ко-полимер (метилокси-поли (этиленгликоль) – поли-l-лизин, PGC-Gd), несущий ковалентно соединенные остатки гадолиний-диэтилентриаминопентауксусной кислоты, был синтезирован и очищен, как описано ранее [109, 110]. Партии PGC-Gd были охарактеризованы на колонке для высокоскоростной жидкостной хроматографии (TSK3000SW, Supelco, Bellefonte, PA) и концентрация гадолиния была определена элементарным анализом.

Полимер растворили в фосфорном буфере Далбекко pH 7,0 (Dulbecco's PBS) до конечной концентрации 50 ммоль/мл при концентрации гадолиния 13 ммоль/л и стерильно профильтровали.

Особенности: строго внутрисосудистый агент, по причине большого гидродинамического диаметра (150кДа) находится в кровотоке без утечки в интерстициальное пространство более 45 минут.

II.3.3. Gd-DTPA-diSer

Производное Gd-DTPA, несущее два ковалентно присоединенных остатка серотонина (5-гидрокситриптамин) было синтезировано на основе циклического ангидрида DTPA (диэтилтриаминопентауксусной кислоты). Синтез разработан М. Керолом [111]. DTPA была выбрана в качестве хелатной основы по причине того, что ее бис-монометил-амидные производные признаны нетоксичными и одобрены FDA для клинического использования. Свежеприготовленный ангидрид Gd-DTPA реагировал с 5-гидрокситриптамимином в DMF в присутствии избытка триэтиламина (см. Рис. 14). Из маточного раствора продукт был выделен с помощью рекристаллизации из метанола и ацетона и был использован без дальнейшей очистки.

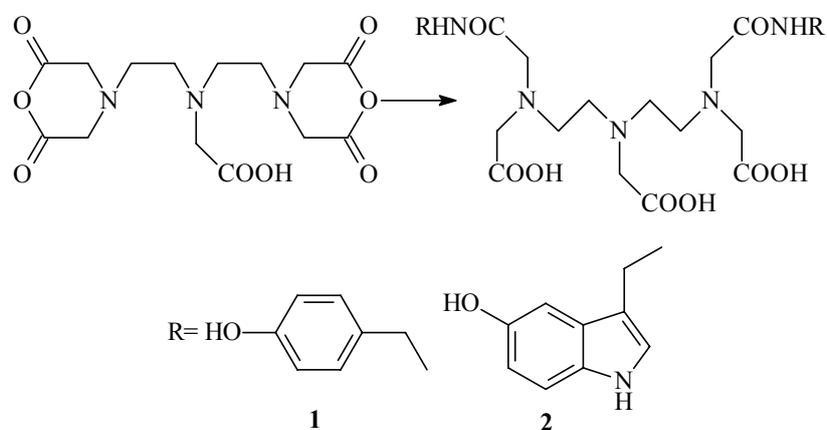


Рис. 14. [111]. Схема синтеза субстрата Gd-DTPA-diSer (радикал 2)

Особенности Gd-DTPA-diSer: олигомеризуется в присутствии оксидоредуктаз (пероксидаза хрена, миелопероксидаза) и перекиси водорода (см. Рис. 15).

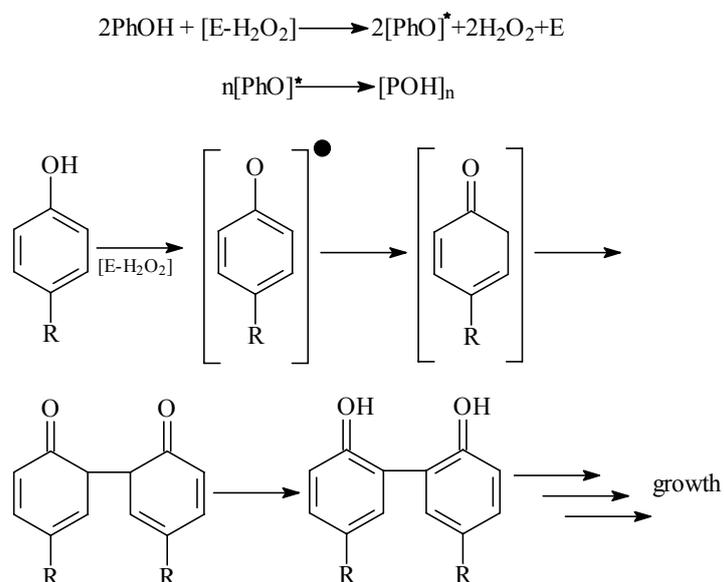


Рис. 15. Общая схема обусловленной оксидоредуктазами фенольной олигомеризации

II.4. МР-релаксометрия в излучении ангиогенеза

Магнитно-резонансная томография является чрезвычайно эффективным инструментом для исследования ангиогенеза и антиангиогенеза. Она предоставляет возможность исследовать эти явления на нескольких уровнях. Первый уровень – морфометрический. Это, прежде всего, локализация, измерение и мониторинг объема опухоли во время диагностики и лечения. Однако морфологические изменения (например, регрессия опухоли при антиангиогенной терапии) могут быть выражены слабо или неявно. В этом случае бывает уместным обратиться к релаксометрии – измерению времен релаксации в нормальных и патологических тканях. Процессы, проходящие при эволюции опухоли и при ее регрессии, могут изменять состав ее вещества, и детектируются при помощи релаксометрических методов. Также при помощи этой стратегии можно исследовать и оценивать эффективность действия новых контрастных агентов.

II.4.1. Метод релаксометрии

Релаксометрией называется измерение магнитных релаксационных свойств образца (времена спин-решеточной и спин-спиновой релаксации). Реальный образец в МРТ – это всегда макроскопический объект (капля воды, например, содержит порядка 10^{21} ядер). Макроскопическую намагниченность объекта исследования составляет сумма магнитных моментов ядер водорода H^1 .

Исследуемый образец возбуждается радиочастотным излучением (переменное магнитное поле B_1). После выключения радиочастотной последовательности регистрируется отклик, зависящий от магнитных релаксационных свойств системы. Для детектирования РЧ-отклика (сигнала ЯМР) используется приемная катушка, расположенная перпендикулярно направлению постоянного магнитного поля B_0 .

Изменение вектора намагниченности со временем описывается уравнением Блоха

$$\frac{d\vec{M}(t)}{dt} = \gamma(\vec{M}(t) \times \vec{B}) - \frac{M_x(t)}{T_2} \vec{i} - \frac{M_y(t)}{T_2} \vec{j} + \frac{M_0 - M_z(t)}{T_1} \vec{k}, \quad (1)$$

где T_1 – время спин-решеточной релаксации, T_2 – время спин-спиновой релаксации, M_0 – намагниченность в начальный момент времени.

Для продольной и поперечной компоненты справедливы уравнения

$$\begin{aligned} \frac{dM_{xy}}{dt} &= -\frac{M_{xy}}{T_2} \\ \frac{dM_z}{dt} &= -\frac{M_z - M_0}{T_1} \end{aligned} \quad (2)$$

В простейшем случае (после воздействия на систему 90° -импульса) решения записываются в виде

$$M_{xy}(t) = M_0 \exp\left(\frac{-t}{T_2}\right) \quad (3a)$$

для поперечной составляющей намагниченности и

$$M_z(t) = M_0 \left[1 - \exp\left(\frac{-t}{T_1}\right) \right] \quad (3b)$$

для продольной составляющей.

При этом решение относительно поперечной составляющей намагниченности можно записать в виде суммы экспонент в случае, если сигнал демонстрирует мультиэкспоненциальный характер спада:

$$M_{xy}(t) = \sum_i s_i \exp\left(\frac{-t}{T_2^{(i)}}\right). \quad (4)$$

Времена релаксации в разной мере определяются окружением (степенью структурированности решетки), статическим полем томографа и резонансной частотой прибора (то есть напряженностью переменного магнитного поля B_1). Кроме этого, на них оказывают влияние тип ядра, температура, подвижность (микровязкость), а также наличие крупных молекул и парамагнитных ионов (молекул). Изменяя эти параметры, можно влиять на времена релаксации, и как следствие, на интенсивность сигнала ткани.

Релаксометрия может решать два вида задач. Во-первых, непосредственные измерения времен релаксации дают очень важную информацию о состоянии ткани – как о ее биохимии, так и о процессах (отек, воспаление), которые в ней происходят. Это актуально при онкологических заболеваниях, инсультах, демиелизирующих заболеваниях. Наряду с этим релаксометрия служит мощным научным инструментом для исследований в области новых контрастных агентов, в частности, широко применялась в описанных здесь исследованиях.

II.4.2. Описание РЧ-последовательностей для релаксометрии

Последовательности для T2 и T1 релаксометрии должны удовлетворять определенным требованиям. Во-первых, томографическое обследование пациента обязано быть максимально информативным за минимальное время исследования. Во-вторых, пока подаются радиочастотные импульсы, пациент должен быть неподвижен во избежание артефактов (искажений) движения, что ограничивает время отдельного исследования 10-15 минутами. Изображения, получаемые при помощи последовательностей для релаксометрии, должны иметь ярко выраженную T1 или T2 взвешенность для упрощения последующей аппроксимации сигнала при определении времен релаксации [112, 113].

T1-взвешенное изображение, удовлетворяющее перечисленным выше требованиям, получается при использовании ряда последовательностей; из них базовым является метод спинового эхо (SE). После 90°-импульса спины в плоскости xy начинают расфазировываться. Через время τ подается 180°-импульс, обращающий этот процесс, в результате чего через время 2τ регистрируется так называемый эхо-сигнал. Таким образом, параметрами этой последовательности являются время эхо TE, равное 2τ , и интервал, спустя который следует новый 90°-импульс, т. е. время повторения TR.

Интенсивность сигнала последовательности SE определяется по следующей формуле:

$$SI = K\rho[1 - \exp\{(TR - TE)/T1\} \exp(-TE/T2)],$$

где K – коэффициент, учитывающий влияние потока, диффузии и перфузии.

При больших значениях TR и TE (например, 100-200 мс и 2000-3000 мс соответственно) получается T2-взвешенное изображение. Если время эхо мало (15-30 мс), а TR=200-500 мс, будет преобладать влияние T1; в случае дальнейшего уменьшения TR на первое место выйдет протонная плотность, но к примеру, контраст между белым и серым веществом мозга будет плохим. Он значительно улучшится, если TE оставить в районе 15-30 мс, а TR увеличить до 2000 мс. Для одного среза толщиной 6 мм эта последовательность занимает порядка 4-8 секунд для малых TR и 3-4 минуты для больших TR.

Для сравнения в экспериментах по релаксометрии использовалась также последовательность IR-RARE, контраст которой по T1 и T2 оценить довольно сложно, поскольку он является смешанным. Однако эта последовательность находит очень широкое применение и без нее не обходится ни одно рутинное исследование. Поведение контраста похоже на изображения спин-эхо (другое название RARE – мульти-спин-мульти-эхо), однако в отличие от SE, интенсивность сигнала жира (липидов) на RARE-томограммах всегда высока [106, 113]. Последовательность FSE (модификацию MSE и RARE) некоторые авторы предлагают в качестве усовершенствованного варианта для количественного анализа в T2-релаксометрии.

Во многих клинических случаях из-за интенсивного сигнала от жировой ткани или воды патология может остаться невыявленной. Проблемы такого рода возникают при диагностике онкологических заболеваний, дифференциации заболеваний костей и костного мозга, исследовании жировой инфильтрации печени, сердца. Оказывается, сигнал от жировой ткани или воды можно подавить, причем несколькими способами. Один из них – FLAIR основан на химическом сдвиге между жиром и водой. Из-за различного молекулярного строения магнитные моменты ядер водорода в этих веществах прецессируют на слегка различающихся частотах. В поле 1 Тл химический сдвиг между водой и жиром составляет 145 Гц. Во вращающейся системе координат будет наблюдаться вращение «сдвинутого» момента ядер жира относительно стационарного момента ядер воды. В поле 1,5 Тл полный оборот совершается за 4,4 мс. Поэтому, если TE кратно этому времени, сигналы воды и жира будут в фазе, а если нечетно кратно 2,2 мс, то в противофазе. Выбирая соответствующий эхо-интервал, можно увеличить или ослабить влияние сигнала от воды. Его можно полностью устранить путем суммирования двух усреднений, в одном из которых использованы сигналы в фазе, а в другом – в противофазе [106, 113].

Для T2-релаксометрии чаще всего используется последовательность Multi Spin Echo (MSE), более известная в зарубежной литературе как последовательность Carr-Purcell (Карра-Парселла) или ее модификация Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Она также встречается под названием T2map, поскольку часто используется для создания T2-карт. Последовательность Carr-Purcell (CP) представляет собой 90°-РЧ импульс, за которым следует дуг повторяющихся 180°-импульсов, создающих соответствующий дуг спин-эхо сигналов. Ее модификация (то есть последовательность CPMG) заключается в применении фазового сдвига во вращающейся системе координат между первым 90°-импульсом и последующими 180°-ми, что уменьшает влияние неточностей настройки 180°-импульсов. Другой вариант уменьшения такого накопления ошибок – чередование фаз на 180° градусов в каждой паре 180°-импульсов [113, 114].

II.5. МР-оценка изменения объема крови в опухоли, проницаемости сосудов и прочих параметров методами МРТ

II.5.1. T1-метод оценки гемодинамических параметров. Описание последовательности SPGR

Изменение объема крови в опухоли может быть оценено при помощи нескольких фундаментально отличных техник МРТ. Внутрисосудистые T1-агенты (то есть влияющие, в основном, на продольное время релаксации), позволяют количественно оценивать абсолютный объем крови в опухоли. Агенты, оказывающие влияние на T2 (спин-спиновую релаксацию) – болюсные хелаты парамагнетиков или суперпарамагнитные наночастицы тоже позволяют измерить Vb по количеству расфазированных протонов. В общем случае, усиление сигнала, вызванное внутрисосудистыми T1-агентами, обусловлено объемом крови и водным обменом через стенку сосудов. С другой стороны, уменьшение сигнала, вызванное T2-агентом, зависит от объема крови и геометрии сосудистой сети (радиус сосудов и так далее). По сравнению с T2-техникой, использование строго внутрисосудистого T1-агента при необходимых условиях протонного обмена через стенку сосудов дает информацию об абсолютном объеме крови, которая не зависит от геометрических факторов.

Для оценки гемодинамических параметров применяются последовательности на основе градиентного эха (GRE).

После РЧ-импульса сигнал спадает из-за совместного влияния T2-спада и локальных неоднородностей поля. Этот комбинированный эффект описывается временем T2*. Изменяя полярность градиента (вместо подачи рефокусирующего 180°-го импульса в последовательности SE), мы изменяем направление индуцированной прецессии, спины начинают рефокусироваться и через время TE вырастает сигнал градиентного эха. Чтобы создать такое эхо мы должны уравнивать площади градиентных импульсов разной полярности. При этом измеряется задержанный, но полностью восстановленный сигнал спада свободной индукции (задержка обусловлена переключением градиентов). Преимущество быстрых GRE-последовательностей обусловлено особенностями насыщения спиновой системы при сокращении TR [104].

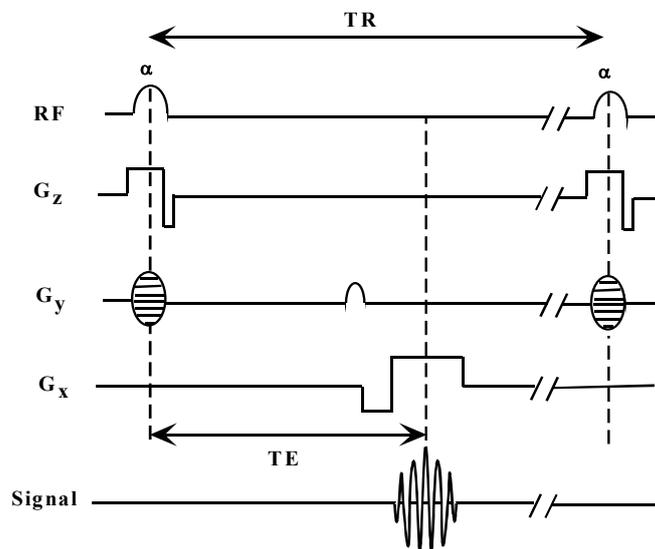


Рис. 16. Последовательность градиентных эхо-сигналов

Интенсивность сигнала после 90° -импульса убывает до тех пор, пока не наступает равновесие, то есть полное насыщение, если $TR \ll T_1$. В настоящее время сокращение TR до 50 мс и даже до 5 мс сохраняет возможность получения изображения с хорошим соотношением сигнал/шум. Если TR будет настолько коротким, то между периодами TR будет наблюдаться неполная T1 и T2 релаксация. После нескольких РЧ-импульсов установится так называемое стационарное состояние. Таким образом, уменьшение TR до значений, меньших T1 или T2 ведет к появлению «остаточных» поперечных намагниченностей, которые могут быть либо отброшены, либо рефокусированы. Остаточная намагниченность обуславливает яркое изображение тканей с длинным T2 (для жидкостей). Остаточная поперечная намагниченность может быть когерентной и некогерентной (расфазированной). В последовательностях, подобных используемой в этой работе SPGR, применяются рефазировующие спад свободной индукции градиенты. Эта последовательность дает взвешивание по T1 и протонной плотности, характеризуется высоким отношением сигнал/шум, обеспечивает хороший контраст при высокой скорости получения изображения. От остаточной намагниченности можно избавиться градиентной или радиочастотной очисткой. Чтобы максимизировать T1-эффекты

следует применять очень короткие TE [106, 113]. Интенсивность сигнала быстрой последовательности ($T_2 < TR < T_1$) можно рассчитать из следующего уравнения:

$SI = \rho \sin \alpha (1 - \exp(-TR/T_1)) \exp(-TE/T_2) / (1 - \cos \alpha \exp(-TR/T_1))$,
 где α – угол отклонения (флип-угол), TR – период повторения, T1 и T2 – времена релаксации.

Таблица 6. Управление контрастом последовательности SPGR

Параметр	Чем он управляет	Видимый эффект
Период повторения (TR)	Определяет оптимальный флип-угол (угол Эрнста), который уменьшается с уменьшением TR	Если флип-угол правильно масштабирован, эффект на контраст невелик. Но увеличение TR увеличивает отношение сигнал/шум

II.5.2. Опухолевые модели

Эктопическая модель карциномы ободочной кишки человека (MV522-DsRed2). Ксенографты человеческой аденокарциномы кишечника были эктопически выращены в атимусных мышцах (nu/nu, возраст 6-8 недель, вес 20-25 г), как описано в [115, 116]. Вкратце, клетки MV522 собрали при помощи фермента трипсина по достижении монослоя. Инъекции двух миллионов клеток в 100 мкл клеточной среды (без сыворотки) были сделаны мышам подкожно в область бедра. Через 7 дней после имплантации клеток и при размерах опухоли примерно 4 мм животные были разделены на две группы, экспериментальную (лекарственную) и контрольную. Животные контрольной группы (группа 1, $n = 3$) получали плацебо в виде 0,5% раствора карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), животные лекарственной группы (группа 2, $n = 3$) получали 2 дозы ингибитора VEGF-TKI2 - AG013925, гомогенизированного в 0,5% КМЦ из расчета 25 мг/кг. Перерыв между дозами составлял 12 часов, как для лекарства, так и для плацебо. Животные получали лекарство перорально, путем введения в пищевод при помощи специального наконечника. Объем опухолей рассчитывался калиперным методом (мерный циркуль). Дополнительные группы животных были подвергнуты более длительной анти-ангиогенной терапии в течение 6-8 дней (группа 4, $n = 3$, 12-14 приемов препарата). Результаты терапии этой группы сравнивались с контрольной группой (группа 3,

$n = 3$), которая получала КМЦ в течение 6-8 дней (всего 12-14 приемов препарата). Имело место три независимых эксперимента (всего 36 животных). После окончания курса терапии животных обследовали при помощи магнитно-резонансной томографии [116].

Ортотопическая модель карциномы ободочной кишки человека (MV522-DsRed2)

Для ортотопической имплантации (то есть в орган, который может быть поражен раком данной клеточной линии) в ободочную кишку использовалась флуоресцентная линия аденокарциномы человека MV522-DsRed. Имплантация проходила под газовой анестезией (изофлуран). Брюшная полость хирургически открывалась, нисходящая ободочная кишка изолировалась и под непосредственным наблюдением с помощью микроскопа в ее стенку вводили два миллиона клеток в 20 мкл солевого раствора Хэнкса (HBSS). Хирургическое вмешательство выполнялось Ж.-Л. Фигуэредо при ассистировании А. Юдиной. Через три недели после имплантации рост опухоли оценивался при помощи флуоресцентной колоноскопии (аналогично [117]). После того локализации опухолей в видимом и флуоресцентном свете, животные были разделены на две группы (в каждой группе $n = 4$) и прошли лечение ингибитором VEGFR2-ТКИ либо плацебо, как описано выше. После этого обе группы были обследованы на приборе Bruker Biospec с напряженностью поля 9,4 Тл.

II.5.3. Магнитно-резонансное исследование мышей и анализ данных

Анестезия мышей проводилась при помощи интрабрюшинной инъекции смеси кетамина (80 мг/кг) и зайлазина (9 мг/кг). Животных укладывали на пластиковую флягу, наполненную теплой водой. Это преследовало две цели – усилить МР сигнал и уберечь мышей от гипотермии (атимусные мыши очень чувствительны к пониженной температуре). В хвостовую вену вводился самостоятельно изготовленный катетер 30 G, который был присоединен к капельнице с гепарином в солевом растворе (чтобы избежать тромбирования вены). Находящиеся под наркозом животные помещались в томограф так, чтобы 3х-дюймовая поверхностная катушка находилась по центру опухоли. МР-исследование проводилось на клиническом томографе Signa 1,5 Тл (General Electric Medical

Systems, Milwaukee, WI) при помощи последовательности SPGR. Этот эксперимент был проделан совместно с Йонгро Кимом [116]. При одних и тех же параметрах сначала получали пре-контрастное изображение, а затем, после внутривенной инъекции Gd-PGC (50 мкмоль Gd/кг in 0,1 мл солевого раствора), пост-контрастное. Для измерения V_b (абсолютного объема крови) были получены изображения со следующими параметрами: матрица 256x256, поперечные срезы с толщиной среза 0,7 мм, TR = 30 мс, TE = 4,1 мс, флип-угол 40°, 60°, 80°, FOV 10 см. Для выполнения всего протокола требовалось примерно 45 минут. Во избежание погрешностей измерения, обусловленных кровотоком на границе изображения, данные собирались только с центральных срезов. Пре- и пост-контрастная интенсивность сигнала в крови измерялась только в достаточно крупных сосудах (40-60 вокселей). Выбор области интереса и анализ данных был проведен при помощи находящегося в свободном доступе программного обеспечения AFNI [118]. Время продольной релаксации T1 было получено путем аппроксимации данных релаксометрии с использованием программы Матлаб (The Mathworks, Inc., Natick, MA).

Аналогичным образом проводилось и МР-исследование мышечной с ортотопически имплантированной аденокарциномой ободочной кишки на томографе Bruker Biospec 9,4 Тл. Во время подготовки животных к эксперименту сразу же использовалась газовая анестезия Изофлуран (Isoflurane). Толщина срезов составляла 0,5 мм, а TR и TE – 40 мс и 5,5 мс соответственно. Дополнительные спин-эхо изображения с матрицей 512 x 512, толщиной среза 0,5 мм, TR/TE = 3000/30 мс использовались для точной локализации опухоли. Во время исследования мышцы находились при температуре 37°C под газовой анестезией (Изофлуран). Объем крови в тканях рассчитывался по следующей формуле (вывод см. [119]):

$$V_b = (SI_{\text{post_tissue}} - SI_{\text{pre_tissue}}) / (SI_{\text{post_blood}} - SI_{\text{pre_blood}}) \quad (5)$$

где $SI_{\text{pre_blood}}$ и $SI_{\text{pre_tissue}}$ – интенсивность сигнала в крови и ткани до введения контрастного агента, а $SI_{\text{post_blood}}$ и $SI_{\text{post_tissue}}$ – интенсивность сигнала в крови и ткани после инъекции PGC-Gd.

Расчет абсолютного объема крови по формуле (5) возможен лишь при выполнении нескольких условий: а) концентрация PGC-

Gd в крови близка к постоянной в течение 45 минут после внутривенной инъекции [109]; б) полное исключение PGC из эритроцитов; в) быстрый обмен протонами через плазматическую мембрану эритроцитов; г) медленный обмен протонами через эндотелиальный барьер. Влияние скорости обмена протонами на значение Vb (абсолютный объем крови), определяемое по данному методу, зависит от параметров радиочастотной последовательности при МР-исследовании. Таким образом, варьируя эти параметры (в данном случае, это флип-угол), можно оценить скорость обмена через сосудистый барьер, как это было описано ранее [120, 121].

II.5.4. Радиоизотопное исследование по определению фракции эритроцитов для коррекции значений абсолютного объема крови

Содержание эритроцитов в сосудах мышечной ткани и опухоли определялось при помощи набора UltraTag kit (Mallinckrodt Medical, St. Louis, MO), предназначенного для ex vivo маркировки красных кровяных телец ^{99m}Tc пертехнетатом. Вклад в эту часть работы внесли Вилфрид Райнхарт и Дана Ху-Лоу [116]. Красные кровяные клетки были выделены из 1-1,5 мл крови сингенных мышей. Кровь маркировалась согласно инструкции производителя (маркировочная реакция 1 мКи ^{99m}Tc). Промаркированные ^{99m}Tc эритроциты были очищены центрифугированием (Нураque-1077; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), после чего были отмыты в солевом растворе Хенкса. В этом эксперименте использовались две независимые группы мышей (9 из лекарственной группы и 12 из группы плацебо согласно данным выше определениям). В общей сложности 100 мКи ^{99m}Tc было введено через хвостовую вену 9 мышам из лекарственной группы и 12 мышам из контрольной группы. Через 10 минут после инъекции образцы мышечной ткани и опухолей были взяты у находящихся под анестезией животных. Видимые сосуды были немедленно электрокоагулированы (при помощи биполярного инструмента Elmed 50/Micro output, Addison, IL) во избежание потери крови из тканей. Также контрольные образцы по 10-20 мкл были взяты методом сердечной пункции. Радиоактивность ^{99m}Tc определялась при помощи γ -счетчика Wallac 1480 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA), предварительно откалиброванного на стандартах ^{99m}Tc . Количественная оценка гематокрита индиви-

дуальных тканей была произведена с использованием стандартов мышинной крови и при пребрежении малым мгновенным изменением гематокрита при инъекции маркированных ^{99m}Tc эритроцитов.

II.5.5. Коррекция значений Vb

Мы предположили, что объем эритроцитов оказывает влияние на время продольной релаксации T1, поскольку контрастный агент PGC-Gd распределяется почти исключительно в плазме. Времена продольной релаксации T1 были получены путем моноэкспоненциальной аппроксимации значений интенсивности сигнала крови при использовании следующей формулы для МР-последовательности 3D SPGR (уравнение 6):

$$SI_{post_blood} = M_0 \frac{1 - \exp(-TR/T1_{post_blood})}{1 - \cos \alpha \exp(-TR/T1_{post_blood})} \sin \alpha, \quad (6)$$

где M_0 – локальная протонная плотность, а α – флип угол. Предполагая быстрый обмен через мембрану эритроцитов, T1 определяется по формуле (уравнение 7):

$$\frac{1}{T1_{post_blood}} = (1 - \lambda) \frac{1}{T1_{post_plasma}} + \lambda \frac{1}{T1_{RBC}}, \quad (7)$$

где λ – определенный в радиоизотопном эксперименте объем красных кровяных клеток. Поскольку PGC-Gd распространяется только в плазме, не проникая в красные кровяные клетки, то (уравнение 8):

$$\frac{1}{T1_{post_plasma}} = \frac{1}{T1_{pre_plasma}} + r[C], \quad (8)$$

где r – релаксивность контрастного агента ($1/(c \cdot M)$), а C – концентрация контрастного агента (M). Учитывая, что r и C известны, $1/T1_{post_blood}$ зависит единственно от локального объема фракции эритроцитов, поскольку значения $1/T1_{pre_plasma}$ и $1/T1_{RBC}$ примерно одинаковы (для мышей, T1 эритроцитарной массы составляло 980 мс, а T1 плазмы равнялось 1037 мс). Параметр λ определяется экспериментально путем маркированных ^{99m}Tc эритроцитов (см. выше). Итак, получается, что после инъекции PGC-Gd для 3D SPGR интенсивность сигнала зависела от объема фракции эритроцитов (аналогично и для пре-контрастной интенсивности сигнала).

Обосновав таким образом необходимость поправки на объем эритроцитов, мы одновременно указали способ ее вычисления и интеграцию в уравнение (6).

II.5.6. Гистологические методы подтверждения соответствия данных МРТ происходящим в тканях процессам

Для получения параллельных срезов образец ткани заливался жидкостью для гистологии (HistoPrep, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) и помещался в морозильную камеру (температура -80°C). После заморозки на криостате Microtom нарезались срезы толщиной 5-15 микрон (в зависимости от типа окрашивания). «Кольцеобразные» препараты ободочной кишки были получены следующим оригинальным способом. После выделения ободочная кишка промывалась водой и завязывалась шовным материалом с одного конца, после чего заполнялась жидкостью для гистологии и завязывалась с другого конца. Пинцетом препарат держали несколько минут над емкостью с сухим льдом, а когда он затвердевал, края обрезали и препарат клали в заранее подготовленный контейнер с жидкостью для гистологии, следуя обычному протоколу далее. В результате гистологические препараты имели вид, аналогичный МР-изображению ободочной кишки живой мыши [116]. Это дало возможность напрямую произвести верификацию МР-изображения, то есть непосредственно соотнести иммуногистохимическое окрашивание и томограмму (оценить форму и размер опухоли, и так далее).

Окраска гематоксилином и эозином для установления границ опухоли на обычных и «кольцеобразных» препаратах ободочной кишки выполнялась согласно протоколу. Чтобы оценить потенциальную проницаемость кровеносных сосудов по отношению к контрастным агентам со сравнимым с PGC-Gd гидродинамическим диаметром за 20 минут до эвтаназии нескольким животным сделали инъекции монокристаллических наночастиц оксида железа (диаметр 20 нм, [110]). Опухоли были выделены, заморожены, нарезаны на 10-микронные секции и окрашены по Перлу (реакция с прусским голубым) на железо. Окрашивание эндотелиальных клеток в опухолях было выполнено с использованием антител к CD31 (крысиные анти-мышинные моноклональные, MEC13.3, BD Pharmingen, San Diego, CA), помеченных дигоксигенином. Связи-

вание антител визуализировалось с помощью анти-дигоксигенин $F(ab')_2$ фрагментов, конъюгированных со щелочной фосфатазой (Roche Diagnostics). Образцы опухоли для флуоресцентной микроскопии были приготовлены как описано в [97] с некоторыми модификациями. За 15 минут до эвтаназии несущим опухоли мышам была сделана инъекция лектина томатов с флуоресцентной меткой Alexa 488 (50-80 мкг на животное в 100 мкл солевого раствора). Опухоли выделили, заморозили и нарезали на секции толщиной 8 мкм. Геномная фрагментация ДНК (окрашивание на апоптоз) оценивалась TUNEL-методом. Он основан на достраивании на концах разрывов ДНК цепочек из меченого нуклеотида с помощью фермента терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы, которая осуществляет независимую от матрицы полимеризацию находящихся в смеси нуклеотидтрифосфатов, используя в качестве затравки свободный 3-ОН конец разрыва ДНК. Высокая специфичность, острая кинетика включения нуклеотида, линейная зависимость между количеством включенной метки и числом разрывов и возможность использования одного дезоксинуклеотидтрифосфата вместо четырех, делают TUNEL-метод чрезвычайно удобным для использования в лабораторной практике. Последний этап окрашивания был проведен с помощью $Cy3$ -меченных анти-дигоксигенин $F(ab')_2$ фрагментов (Roche Diagnostics). Флуоресцентная микроскопия проводилась на микроскопе Zeiss Axiovert 100 TV (Wetzlar, Germany) с соответствующим набором фильтров (Omega Optical, Brattleboro, VT). Изображения были получены с помощью камеры Cool-Snap HQ-M CCD (Photometrics, Tucson, AZ) и обработаны при использовании программного обеспечения IP LabSpectrum (Signal Analytics, Vienna, VA).

II.6. Визуализация молекулярных маркеров ангиогенеза и онкогенеза методом магниторезонансной амплификации

II.6.1 Метод магнитно-резонансной амплификации

Метод магнитно-резонансной амплификации – стратегия, разработанная А. А. Богдановым-младшим, основанная на эффекте

быстрого окисления и олигомеризации парамагнитных субстратов (например, Gd-DTPA-diSer) в присутствии каталитически активных форм оксидоредуктаз (например, пероксидазы хрена, миелопероксидазы) и перекиси водорода (см. Рис. 17). Олигомеры характеризуются более высокой релаксивностью по сравнению с мономерами. Этот эффект наблюдается как усиление сигнала на томограмме в месте накопления контрастного агента при использовании T1-взвешенных РЧ последовательностей [122].

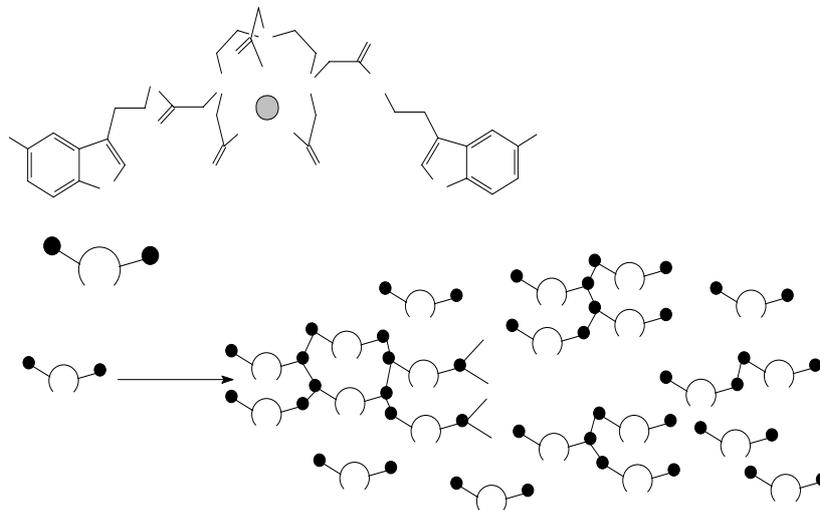


Рис. 17 [122]. Gd-DTPA-diSer (вверху); предложенный механизм реакции Gd-DTPA-diSer в присутствии пары оксидоредуктаза / перекись водорода (внизу)

Для визуализации молекулярных мишеней – биомаркеров ангиогенеза и онкогенеза нами предложена следующая схема, базирующаяся на эффекте магнитно-резонансной амплификации. За 6 часов до магнитно-резонансного исследования с парамагнитным субстратом Gd-DTPA-diSer животным предлагается сделать инъекцию двух биоконъюгатов фермент-антитело. Это антитело высоко-специфично к экспрессирующемуся на поверхности клетки молекулярному маркеру, который надо визуализировать. Для оптимизации

ции метода мы использовали анти-L6 (маркер карциномы) и далее mAb425 / Матузумаб (антитела против EGFR, маркер ангиогенеза и онкогенеза). Последнее антитело также проходит клинические испытания в качестве противоракового средства. Таким образом, визуализация рецептора эпителиального фактора роста (EGFR) сопровождается терапевтическим воздействием. Такой подход получил название «терагностика», то есть сочетание терапии и диагностики. В настоящее время эта парадигма представляется очень перспективной. В паре с антителом находятся ферменты – пероксидаза хрена (ПХ) и глюкозооксидаза (ГО). Антитело селективно связывается со своим антигеном (маркером, который необходимо визуализировать), доставляя к районам его экспрессии необходимые для олигомеризации (вследствие эффекта магнитно-резонансной амплификации) ПХ и перекись водорода (которая генерируется *in situ* глюкозооксидазой в присутствии глюкозы). Через несколько часов несвязавшиеся конъюгаты «вымываются» кровотоком и после инъекции парамагнитного субстрата Gd-DTPA-diSer олигомер образуется только при наличии маркера (в нашем случае, EGFR или L6). Таким образом, мы предполагаем, что локальное усиление сигнала (уменьшение T1) отображает распределение искомого молекулярного маркера (EGFR, L6 и т. д.) в ткани опухоли [105].

II.6.2. Синтез конъюгатов на примере HRP-mAb425 и GO-mAb425 (mAb Clone 425, anti-EGFR, Merck R&D)

Для синтеза конъюгатов антитело-фермент мы выбрали совместимую с водой систему HydraLink (Solulink–EMD). В нее входит модификация антитела при помощи «альдегидного компонента» 6C-сукцинимидил-4-формилбензоата (6C-SFB) и модификация ферментов посредством «гидразинового компонента» - сукцинимидил 2-гидрозинокотинат гидрохлорида (SHNF). При реакции между собой эти модифицированные реагенты формируют устойчивый замещенный гидразон (Рис. 18). Такая стратегия синтеза конъюгатов характеризуется высокой селективностью, низким неспецифическим связыванием и устойчивостью производных молекул в водных растворах [123].

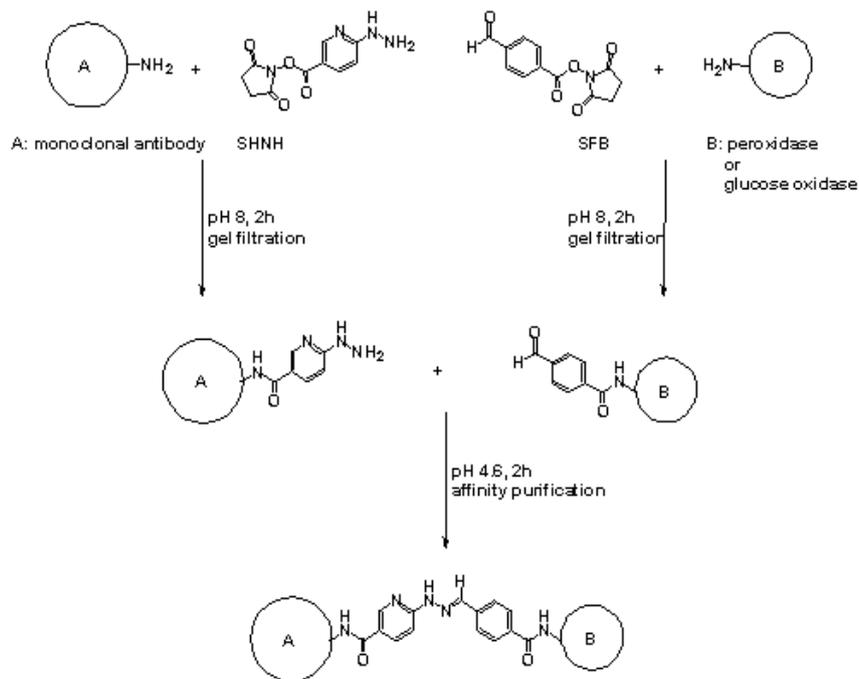


Рис. 18. Схема синтеза конъюгатов GO-mAb425 и HRP-mAb425. Вместо стандартного SFB в нашей схеме применяется 6C-SFB (с углеводородным линкером)

Протокол синтеза конъюгатов HRP-mab425 и GO-mAb425 (mAb Clone 425, anti-EGFR, Merck R&D) (Протокол 1):

При получении конъюгатов использовались: моноклональные антитела против EGFR (mAb Clone 425, anti-EGFR, Merck R&D), пероксидаза хрена, глюкоксидаза. Все расчеты велись на 550 мкл антитела и 275 мкл пероксидазы (HRP) / глюкоксидазы (GO). Общий выход конъюгатов HRP-mAb425 и GO-mAb425 планировался около 500 мкл каждого.

SHNH-модификация. На первом этапе проводилась SHNH-модификация, для чего приготовили сток-раствор SHNH ($M=323,2$) в DMF в концентрации 10 мг/мл (30940,5 нмоль/мл). Схема постановки метода включала следующие стадии:

1. Приготовление 275 мкл 15 мг/мл раствора глюкоксидазы ($M=186\ 000$) и 12 мг/мл раствора пероксидазы хрена ($M=40\ 000$) в 0,1М фосфатном буфере.

2. Во время оптимизации метода оптимальное соотношение GO-модифицирующий агент установлено равным 1:20. В 275 мкл GO 22,17 нмоль, значит требуется $22,17 \times 20 = 443,3$ нмоль SHNH, что составляет 14,3 мкл 10 мг/мл раствора. Реакция модификации глюкоксидазы выглядела следующим образом:

275 мкл GO в фосфатном буфере pH 8,0 + 14,3 мкл SHNH (10 мг/мл) в DMF

(при более низком pH в районе 7,2 для завершения реакции потребуется 3 часа. При pH 8,0 достаточно подождать 1 час). Аналогично для пероксидазы хрена

275 мкл HRP в фосфатном буфере pH 8,0 + 55,6 мкл SHNH (10 мг/мл) в DMF

3. Инкубация в течение 1 часа.

6C-SFB-модификация. Перед 6C-SFB-модификацией была проведена очистка антитела на колонке PD10: колонку промыли 1 раз 0,1М фосфатным буфером pH 8,0 с 0,1% Tween, потом 2 раза 0,1М фосфатным буфером pH 8,0, убрали фильтр, промыли 1 раз 0,1М фосфатным буфером pH 8,0, затем центрифугировали на 2500 rpm, 5 минут. После нанесения антитела на колонку центрифугировали 5 минут на 2500 rpm. Приготовили 2,5 мг/мл раствор 6C-SFB из 18 мг/мл сток-раствора

Применялся избыток модифицирующего агента 4:1 (концентрация антитела 5 мг/мг):

550 мкл mAb-425 + 10 мкл 6C-SFB в DMF (2,5 мг/мл)

Реакционную смесь инкубировали 30 минут при комнатной температуре

Очистка промежуточных продуктов фермент-SHNH и антитело-SFB на колонке PD10. Колонку PD10 однократно промыли 0,1М ацетатным буфером pH 4,8 с 0,1% Tween, потом 2 раза 0,1М ацетатным буфером pH 4,8. Убрали фильтр, промыли 1 раз 0,1М ацетатным буфером pH 4,8, после чего центрифугировали на 2500 rpm 5 минут. Нанесли образец на колонку, центрифугировали 5 минут на 2500 rpm.

BCA анализ, гель-электрофорез и определение молярного соотношения замещения (Molar Substitution Ratio - MSR) - см. п. II.6.3-II.6.5

Конъюгация.

HRP: 0,250 мл L6-SFB + 0,250 мл HRP-SHNH
GO 0,250 мл L6-SFB + 0,250 мл GO-SHNH

Очистка конъюгатов. Для очистки конъюгатов была применена гель-фильтрация на хроматографе HPLC в ацетате аммония. Собирали первый и второй пик. Фракции с высоким содержанием ферментов были определены при помощи ТМБ-теста (с субстратом тетраметилбензидин, см. ниже). После анализа BCA фракции с высоким содержанием белка были диализованы против фосфатного буфера (PBS) в течение 24 часов и сконцентрированы до объема 20-30 мкл посредством Slide-A-Lyzer, Pierce.

II.6.3. Определение концентрации белка методом BCA

Для определения концентрации белка использовался набор реагентов Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce). В основе данного метода анализа лежит биуретовая реакция: в щелочном растворе ионы меди реагируют со всеми соединениями с двумя амидными или пептидными связями, соединенными или непосредственно или через атом углерода, образуя растворимый в воде комплекс фиолетового цвета. Интенсивность окраски (поглощение на $\lambda=562$ нм) этого комплекса прямо пропорциональна концентрации белка в образце.

Протокол 2:

Для приготовления рабочего раствора BCA в 26 объемов реагента В (2,6 мл) был добавлен 1 объем реагента С (0,1 мл) и после перемешивания добавлено 25 объемов реагента А (2,5 мл). В лунки первых двух колонок планшета были нанесены стандарты - бычий сывороточный альбумин (BSA, 2 мг/мл), третьей и четвертой колонок - образцы, после чего лунки заполнили до 100 мкл 0,1% раствором додецилсульфоната (SDS) и добавили 200 мкл рабочего раствора BCA. Инкубировали в течение 1 часа при температуре 37°C, после чего измерили поглощение на 562 нм.

	1	2	3	4
A	0	0	1 мкл mAb425	GO-SHNH
B	0,25 мкл BSA	0,25 мкл BSA	1 мкл mAb425	GO-SHNH
C	0,5 мкл BSA	0,5 мкл BSA	1 мкл mAb425- обессол.	HRP-SHNH
D	1 мкл BSA	1 мкл BSA	1 мкл mAb425- обессол.	HRP-SHNH
E	2 мкл BSA	2 мкл BSA	1 мкл mAb425-SFB	GO-mAb425
F	4 мкл BSA	4 мкл BSA	1 мкл mAb425-SFB	GO-mAb425
G	8 мкл BSA	8 мкл BSA	1 мкл ацетат- ный буфер	HRP- mAb425
H	10 мкл BSA	10 мкл BSA	1 мкл ацетат- ный буфер	HRP- mAb425

II.6.4. Электрофорез SDS-PAGE (с додецилсульфонатом натрия)

В основе метода лежит способность детергента додецилсульфоната натрия (SDS) реагировать и денатурировать широкий спектр белков одинаковым образом. Нативные белки, имеющие различные форму молекулы, заряд и размеры в процессе взаимодействия с SDS превращаются в комплексы с ним, имеющие постоянное соотношение заряда на единицу массы (так как заряд SDS маскирует заряды протеинов) и идентичную конформацию, которая варьирует в размере прямо пропорционально молекулярной массе субъединицы. При неизменных условиях электрофореза (рН, напряжение, время, концентрация геля и т.д.) электрофоретическая подвижность белка зависит от его плотности заряда, массы и формы. Поскольку большинство комплексов протеин-SDS имеют постоянные соотношения «заряд-масса» и идентичную форму, их подвижность зависит исключительно от размера.

Протокол 3:

В качестве красителя использовался бромфеноловый синий. Расчеты для приготовления образцов были следующими: на одну дорожку белок (10 мкг) + 8 мкл буфера, до 30 мкл 10% SDS. Денатурация проводилась в течение 2 минут при 90°C, центрифугирование в течение 5 минут при 2500 гpm. Электрофорез проводился в градиентном 4-15% геле (BioRad).

II.6.5. Определение молярного соотношения замещения

Протокол 4 (определение молярного соотношения замещения (Molar Substitution Ratio – MSR) для промежуточных продуктов GO-SHNN, HRP-SHNN, mAb-SFB):

1. Приготовить 50мМ сток-растворы 2-гидразинопиридина · HCl и п-нитробензальдегида
2. Приготовить растворы 0,5 мМ растворы 2-гидразинопиридина · HCl и п-нитробензальдегида в ацетатном буфере (pH 4,8).
3. Приготовить образцы для теста из расчета 60 мкг белка на кювету 600 мкл.

BL1: 23 мкл ацетатный буфер	577 мкл 2-гидразинопиридин
23 мкл mAb425-SFB	577 мкл 2-гидразинопиридин
BL 2: 13 мкл ацетатный буфер	587 мкл п-нитробензальдегид
11 мкл GO-SHNN	589 мкл п-нитробензальдегид
13 мкл HRP-SHNN	585 мкл п-нитробензальдегид

4. Инкубировать 1 час при 37°C. Измерить поглощение по отношению к BL1 и BL2 на 350 нм и 380 нм соответственно.

5. Определить MSR по формуле
 $MSR = (Abs(\text{sample}) - Abs(\text{blank})) / (\text{Концентрация белка в р-ре} \times 18000 \times \text{длина пути кюветы})$ для mAb425-SFB

и
 $MSR = (Abs(\text{sample}) - Abs(\text{blank})) / (\text{Концентрация белка в растворе} \times 22000 \times \text{длина пути кюветы})$ для GO-SHNN и HRP-SHNN.

II.6.6. Гель-фильтрация (гель-хроматография)

Для отделения непрореагировавшего (свободного) антитела от конъюгата использовалась гель-фильтрация (колонка Superdex 200, GE). Это метод разделения веществ с разной молекулярной массой, основанный на различии скорости их диффузии в гелях. Сорбентом в данном методе служит гель – мелкие частицы размером 10-500 мкм, пронизанные нитями (фибриллами). Диффузия внутрь этих частиц ограничена размерами, то есть подвижностью молекул, которая зависит от их молекулярной массы. Чем меньше молекулы, тем легче они способны проникать вовнутрь гранул геля; соответственно более тяжелые частицы практически не проникают в гранулы, так как менее подвижны. Частицы попавшие внутрь гранул под действием диффузии движутся внутри и с равной вероятностью могут выйти наружу, но пространство внутри гранул геля пронизано нитями и молекулы претерпевают многочисленные столкновения с сетью фибрилл и способны надолго задерживаться внутри гранул. Таким образом, очевидно, что более легкие молекулы способны надолго задерживаться внутри гранул, и их скорость продвижения будет меньше скорости движения более тяжелых молекул. Описанный метод очень эффективен для разделения белков и других высокомолекулярных соединений.

Полученные конъюгаты очищали партиями по 250-300 мкл (элюент-ацетат аммония). Время задержки от начала появления пика до реального появления фракции на конце трубки измерили при помощи окрашенного образца – оно составило 2 секунды. Благодаря этому уточнению мы собирали не только первый пик (собственно, конъюгат), но и захватывали часть второго.

Из собранных фракций при помощи TMB-ELISA (1-Step Slow TMB-ELISA, Pierce Biotechnology) на пероксидазу хрена (HRP) отобрали содержащие максимальное количество ферментов. Тетраметилбензидин (ТМБ) – хромогенный субстрат для определения пероксидазы хрена. Продукт окисления ферментом имеет голубой цвет и поглощает на 370 и 652 нм. Добавление серной или фосфорной кислоты изменяет цвет продукта на желтый, который поглощает на 450 нм, тем самым улучшая чувствительность метода. Тест на глюкоксидазу проводился аналогично (непрямым методом) при помощи добавления пероксидазы хрена и глюкозы.

После объединения фракций и обнаружения белка посредством микро-ВСА ставили диализ против буфера Трис-борат ЭДТА (4 л, 24 часа). Затем конъюгаты были сконцентрированы при помощи системы Slyde-A-Lyzer (Pierce Biotechnology). Для проверки, осталось ли в конъюгатах свободное антитело, проводили электрофорез.

II.6.7. Количественное определение EGFR на клеточной культуре (методом ELISA)

Целью испытаний конъюгатов на клеточной культуре было убедиться, что ферменты и антитело в конъюгате сохраняют свою активность и специфичность, а также определить оптимальные соотношения конъюгатов с пероксидазой хрена и глюкозооксидазой.

Для эксперимента использовались: стерильно профильтрованный 2% раствор бычьего альбумина в солевом растворе Хенкса, забуференный 10мМ HEPES (pH 7,5); стерильно профильтрованный 2% раствор бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере (PBS), забуференный 10мМ HEPES (pH 7,5); конъюгаты пероксидазы хрена и глюкозооксидазы с моноклональным антителом против EGFR, синтезированные и очищенные как описано выше.

Протокол 5: За 24 часа до эксперимента из стандартных флаконов 75Т клетки A431 и MDCK (контроль) были высажены на 96-луночный планшет (50 тыс. клеток / лунка). Концентрацию конъюгатов варьировали методом последовательных двукратных разведений в диапазоне 0,5 – 100 мкг/мл/лунка (по антителу), после чего инкубировали в течение 30 минут. Отмывали 4 раза в 2% растворе бычьего альбумина в солевом растворе Хенкса (BSA/Hanks). В качестве субстрата для бинарной системы использовался орто-фенилендиамин (0,05М цитратный буфер, 10 мг ОФД и 20 мг глюкозы на 20 мл буфера). В каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата, реакцию останавливали 3М серной кислотой, результат получали спектрофотометрически на 490 нм.

II.6.8. Тест конъюгатов на клеточной культуре посредством магнитно-резонансной томографии (МРТ)

Задачей эксперимента было показать возможность специфичной визуализации экстраклеточного маркера (рецептора эпителиального фактора роста или L6) при помощи метода магнитно-

резонансной амплификации. Этот эксперимент проводился на суспензии клеток A431 (карцинома яичников), экспрессирующих EGFR и L6 в больших количествах (ранее, используя помеченное ¹²⁵I антитело, мы выяснили, что A431 экспрессируют в среднем 910 000–920 000 рецепторов на клетку). В качестве стандартов использовались растворы субстрата в среде с добавлением либо без добавления бинарной системы фермент-антитело [104].

Протокол 6: Клетки трипсинизировали и приготовили суспензию с концентрацией 10 млн. в мл в обычной среде (всего 3,5 мл). Чтобы восстановить экспрессию EGFR клетки поместили в CO₂ инкубатор на 30 минут, встряхивая через каждые 10 минут. Далее суспензию клеток разместили в пробирки согласно Табл. 7. (справа). В четные ряды (2 и 4) добавлялась бинарная система фермент-антитело, в нечетные (1 и 3) – нет.

Таблица 7. Схема размещения образцов в 96-луночном планшете для МРТ-эксперимента с суспензией клеток (справа). В качестве контроля – субстрат в разных концентрациях (слева)

Только субстрат

Контроль	Бинарная система фермент-антитело
0,1 М	0,1 М + БС
0,2 М	0,2 М + БС
0,5 М	0,5 М + БС

Клеточная культура + субстрат

Контроль	Бинарная система фермент-антитело
0,1 М + А431	0,1 М + БС + А431
0,2 М + А431	0,2 М + БС + А431
0,5 М + А431	0,5 М + БС + А431

После добавления в лунки с клетками системы конъюгатов ГО и ПХ (колонка 4) и забуференного фосфатом солевого раствора (ряд 3) пробирки в держателе инкубировались в холодной комнате (+4°C) в течение 30 минут при постоянном перемешивании. После этого клетки были промыты 4 раза охлажденным 2% раствором бычьего сывороточного альбумина в растворе Хенкса при помощи центрифугирования (осаждение на 800 гpm). Этим исключалось участие в дальнейшей реакции несвязавшихся ферментов. Далее сделали суспензию в PBS (без бычьего сывороточного альбумина) и добавили субстрат согласно Табл. 7 и 5 мкл 1М раствора глюкозы

(для активации бинарной системы). Инкубировали еще 30 минут при комнатной температуре и постоянном перемешивании, после чего промыли клетки 4 раза центрифугированием на 800 грм 2%-м раствором бычьего альбумина в растворе Хенкса. Отдельно были приготовлены растворы субстрата в разных концентрациях, в которые не добавляли (ряд 1) или добавили (ряд 2) бинарную систему. Разместив пробирки как указано в Табл.7 мы растворили 0,5 г сухой агарозы в 100 мл воды при нагревании в микроволновой печи. Убедившись в растворении агарозы (смесь стала прозрачной), мы остудили ее на водяной бане до 50°C и пипеткой заполнили жидкой агарозой пустоты в держателе с пробирками. После превращения агарозы в гель мы получили держатель без заполненных воздухом пустот между образцами (для избежания артефактов при МР-эксперименте).

Визуализация проводилась на клиническом томографе Signa 1,5 Тл (General Electric). После последовательности-локалайзера был запущен протокол для T1-релаксометрии (SE, TE=min (11 мс), варьирование TR (550-1500 мс) как функции TI (50-1000 мс). Значения TR и TI были выбраны исходя из намерения минимизировать временные затраты и основаны на предварительно полученной информации о том, что T1 не превышает 1000 мс. Матрица 512 x 512, 1 усреднение, FOV 12 x 10 см. В выбранном регионе интереса (ROI), сквозном на всех изображениях, производилось измерение интенсивности МР-сигнала. Данные обрабатывались при помощи программного обеспечения GraphPad Prism 4. А именно, проводилась аппроксимация с целью нахождения T1 по формуле

$$Y = M0*(1-2*\exp(-X/T1)) + Bottom, \quad (9)$$

где Y – интенсивность МР-сигнала, а X – TI, мс.

Вот пример такого рода обработки. Измеренные в регионе интереса (ROI) значения интенсивности сигнала переносятся в массив, который обрабатывается в GraphPad Prism. Особенностью метода является расстановка знаков “-“, так как в программном обеспечении сканера дается модуль значения интенсивности сигнала. В случае затруднений можно просмотреть снимки и установить, при каком именно значении TI значение сигнала переходит через 0 (в этой точке контраст меняется на противоположный).

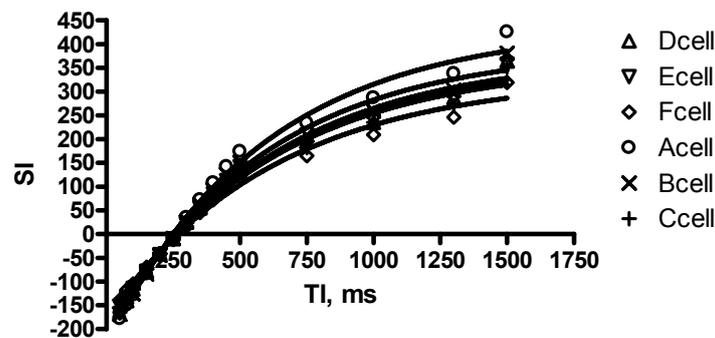


Рис. 19. Моноэкспоненциальная аппроксимация зависимости интенсивности сигнала от T1 с целью определить T1 как параметр

Еще один МР-эксперимент проводился не на суспензии клеток А431, а на клеточном осадке. Порядок действий был аналогичен протоколу 5, с тем отличием, что в держателе располагались только осажденные клетки с добавлением бинарной системы (ряд 2) и без добавления (ряд 1) (Табл. 8).

Таблица 8. МР-эксперимент по визуализации экстраклеточных рецепторов на осажденных клетках А431, экспрессирующих EGFR

Концентрация субстрата	Ряд 1. Контроль	Ряд 2. Бинарная система
0,1 мМ	HRP 0,25; PBS 0,25	HRP 0,25; GO 0,25
0,2 мМ	GO 0,25; PBS 0,25	HRP 0,25; GO 0,25
0,5 мМ	PBS 0,5	HRP 0,25; GO 0,25

II.6.9. *In vivo* МР-эксперимент. Визуализация маркера карциномы L6

Атимусным п/п мышам имплантировали 2 млн. клеток А431 в мышцу бедра. Через две недели после имплантации опухоли они были исследованы на томографе Bruker Biospin 2,0T с отверстием 45 см и градиентами +20Г/см. Предварительно, за 2 часа до МР-исследования, животные были разделены на 2 группы, экспери-

ментальную и контрольную (по 3 животных в каждой). Экспериментальной группе была сделана внутривенная инъекция конъюгатов L6-GO и L6-HRP (5-10 мкл). Впоследствии эти эксперименты были продолжены Х.В. Канг с использованием антител к EGFR. Магнитно-резонансная томография проводилась при следующих параметрах: серии T1-взвешенных изображений получали с помощью последовательности спин-эхо TR/TE = 400/8 мс, FOV = 3 см x 3 см, матрица 256 x 128, NEX = 8. T1-изображения были получены до инъекции контрастного агента и затем в автоматическом режиме записывались в течение часа после инъекции (всего 12 изображений) [105].

**III.1. Объем опухоли и объем крови в опухоли.
Магнитно-резонансная томография ангиогенеза**

Наблюдения за объемом опухоли велись традиционным методом (при помощи мерного циркуля) и МРТ. У животных с имплантированными в стенку ободочной кишки опухолевыми клетками аутопсия выявила опухоли округлой формы (см. Рис. 20). При аутопсии через 10 дней после эксперимента. Видна достаточно высокая васкуляризация опухоли (опухолевая масса имеет красный оттенок). Зачастую в группе плацебо отсутствие лечения, и, следовательно, дальнейший рост опухоли, приводило к обструкции ободочной кишки примерно через месяц после имплантации опухолевых клеток. На основании этого нами было определено оптимальное время для МР-эксперимента – 3 недели после имплантации, когда опухоль достаточно велика для измерений, но не приводит к сильному ослаблению животного.

Измерения мерным циркулем не показали уменьшения объема в экспериментальной группе по сравнению с контрольной после двух доз ингибитора VEGF (Рис. 21, сверху). Разница в объемах опухолей была очевидна только между группами 3 и 4, получавшими соответственно AG013925 или плацебо на протяжении 7 дней. Однако МР-измерения объема крови в тех же опухолях показали статистически достоверную разницу ($P < 0.001$) между группами уже после двух доз препарата, введенных в течение 24 часов (Рис. 21 внизу, а также Табл. 9). После семи дней соответствующих режимов эта разница, как и следовало ожидать, только усилилась.

Напомним, что животные из группы плацебо в течение 1 дня (группа 1) или 7 дней (группа 3) дважды в день получали 0,5% раствор карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), а животные из экспериментальной группы в течение 1 дня (группа 2) или 7 дней (группа 4) ежедневно получали 2 дозы ингибитора VEGF-TKI2 - AG013925, гомогенизированного в 0,5% КМЦ из расчета 25 мг/кг.



Рис. 20. Результаты аутопсии мыши из Группы 4 (плацебо, 14 доз карбоксиметилцеллюлозы перорально)

Таблица 9. Объем крови, измеренный в ксенографтах MV522 и данные коррекции по гематокриту

Статистическая однородность была определена с помощью двухвыборочного t-критерия Стьюдента с поправкой Уэлча (критерий Крамера-Уэлча)

Вид группы экспериментальных животных	Объем крови Vb Эктопические опухоли, %		Объем крови Vb Ортопические опухоли (ободочная кишка), %		Гематокрит (% эритроцитов по объему)	
	Опухоль [^]	Мышца [^]	Опухоль	Мышца	Опухоль	Мышца
Плацебо, 1 д	2.4+0.1*, n=20	2.6+0.1, n=14	–	–	31+2**, n=9	41+1, n=5
Эксперимент, 1 д	1.1+0.1*, n=21	3.1+0.1, n=17	–	–	36+1**, n=9	40+0.5, n=5
Плацебо, 7 д	4.2+0.1*, n=20	3.2+0.1, n=16	11.9**+2.0, n=4	3.9+0.2, n=4	–	–
Эксперимент, 7д	1.1+0.1*, n=18	2.8+0.1, n=23	5.4+1.1**, n=4	3.6+0.2, n=4	–	–

[^] проведена коррекция объема крови по гематокриту.

* крайне высокая статистическая достоверность разницы значений ($P < 0.001$).

** высокая статистическая достоверность разницы значений ($P < 0.05$).

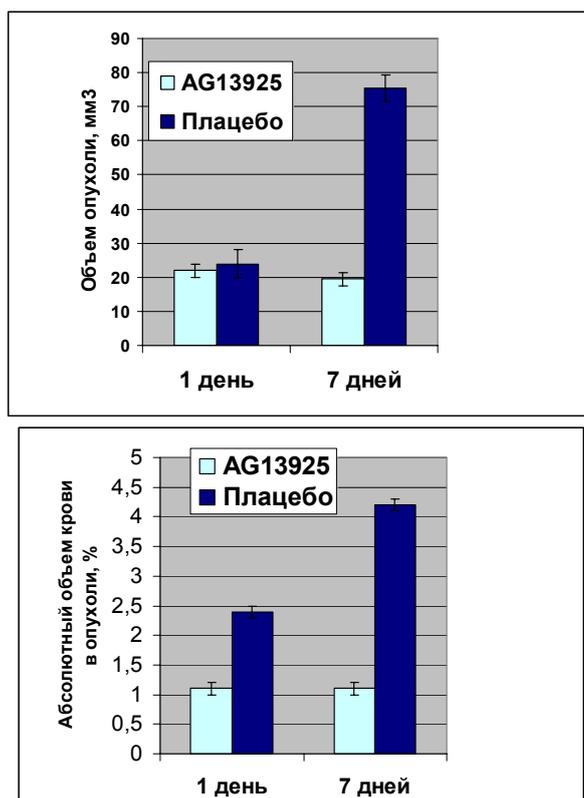


Рис. 21. Объем опухоли и объем крови в опухоли как факторы прогноза эффективности анти-ангиогенной терапии. Как видно из Рисунка 21 сверху, между объемом опухоли после 2 доз препарата AG013925 и плацебо нет статистически достоверной разницы (она появляется только после недели лечения). В то же время отличие в объеме крови опухоли велико уже после 2 доз препарата (Рис. 21 внизу) и усиливается после 7 дней анти-ангиогенной терапии

В эктопической модели (подкожная имплантация опухоли) магнитно-резонансная томография выявила небольшие билатеральные новообразования (Рис. 22А и 22В). Сосуды опухоли стали видны после инъекции Gd-PGC (Рис. 22В, вкладка). После окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) на препаратах животных из экспериментальной и контрольной группы не было признаков протяженных участков некроза или кровотечения, к которым могло

бы привести лечение ингибитором ангиогенеза (Рис. 22С и 22D). То, что окрашенные Н&Е препараты выглядели схожими, подтверждает факт медленного регресса опухоли при антиангиогенной терапии и нецелесообразность использования этого параметра для оценки ранних эффектов ингибиторов ангиогенеза.

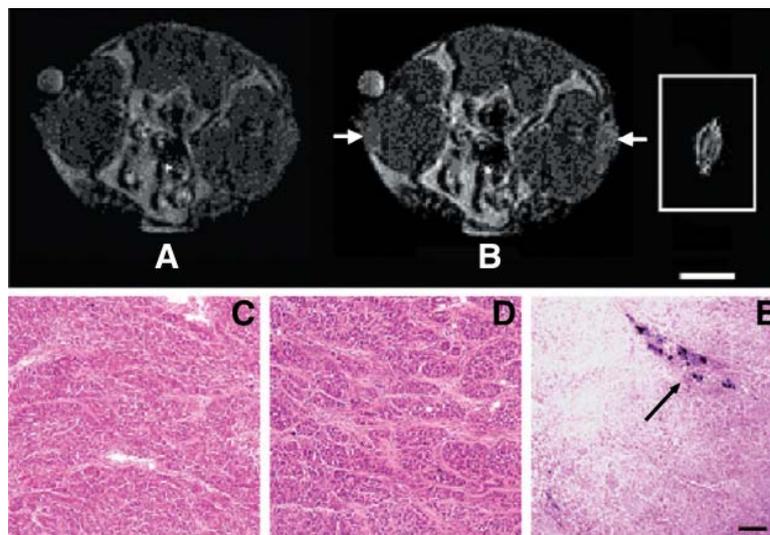


Рис. 22. МР-изображения билатерально имплантированных опухолей до в/в инъекции PGC-Gd (А) и после (В). Вкладка – «разность» изображений опухоли (В-А), на котором видны особенности сосудистой сети. С и D – окрашивание гематоксилином и эозином опухоли из плацебо-группы (С) и экспериментальной группы (D). Е – секция леченной VEGFR2-TKI опухоли после *in vivo* в/в инъекции монокристаллических частиц оксида железа с целью выявления проницаемых для контрастного агента сосудов. Стрелкой показан положительный результат окраски по Перлу (на железо)

Использование кристаллических частиц монооксида железа (MION) в качестве контрольного внутрисосудистого маркера, который может быть легко обнаружен в ткани в самых малых количествах (окрашиванием по Перлу с прусским голубым) показало отсутствие утечки во внутритканевое пространство как до лечения, так и после лечения (Рис. 22Е). Следовательно, этот же вывод можно применить и по отношению к контрастному агенту. Значит, условие применимости формулы (5) о том, что концентрация Gd-

PGC в крови близка к постоянной в течение 45 минут после внутривенной инъекции, выполняется.

В случае ортотопически имплантированных опухолей МРТ высокого разрешения (Bruker 9,4 Тл) показала наличие небольших новообразований на ободочной кишке и вокруг нее, хорошо заметных на аксиальных срезах (Рис. 23А, стрелка). Н&Е окрашивание кольцеобразных срезов препарата ободочной кишки выявило примерно совпадающие по размеру, форме и расположению опухолевые участки (Рис. 23В).

Перед МР-исследованием наличие и примерное расположение этих опухолей было выяснено при помощи флуоресцентной колоноскопии (Рис. 23С и 23D). Поскольку для имплантации использовалась клеточная линия аденокарциномы ободочной кишки MV522, экспрессирующая флуоресцентный маркерный белок DsRed2, наличие и локализацию опухоли эндоскопическое исследование обозначило совершенно однозначно. Оно также облегчило задачу выбора срезов, на которых опухоли были бы видны наиболее отчетливо.

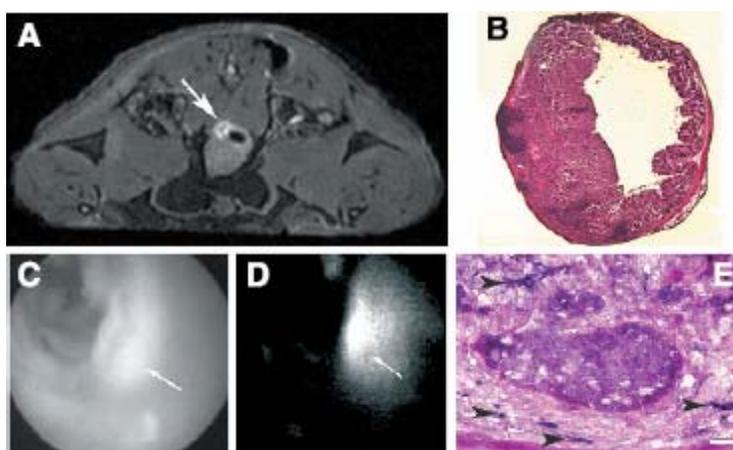


Рис. 23. МРТ и гистология ортотопически имплантированных опухолей MV522-DsRed2. А. Ободочная кишка и опухоль, МРТ, поперечный срез. В. Окрашенный гематоксилином и эозином поперечный срез ободочной кишки (аналогичный срезу на Рис. 23А). С. Колоноскопия ободочной кишки в белом свете и D – в «красном» DsRed2 канале (флуоресценция возбуждалась ксеноновой лампой на 300Вт). Е. Совместное окрашивание срезов опухоли на гематоксилин / эозин и CD31. Стрелками показаны CD31-положительные микрососуды

Совместное окрашивание срезов на CD31 (маркер эндотелиальных клеток) и H&E обработка позволяют видеть множество микроопухолей, окруженных васкуляризованной стромой (Рис. 23Е). Очень хорошо видна инвазия опухоли в мышечную ткань.

Анализируя интенсивность сигнала томограмм, мы получили значения объема крови для разных флип-углов (40° , 60° , 80°) (Рис. 24А и 24В).

Самое точное значение объема крови внутри опухоли достигается при использовании максимального флип-угла (80°), очень короткого (минимального) TE и TR=30 мс. Данные при всех трех флип-углах позволили исследовать зависимость объема от обмена протонами (то есть предоставили информацию об изменении барьерной функции сосудов опухоли в результате лечения ингибитором ангиогенеза). Одним из условий применимости формулы (5) является медленный обмен протонами через стенку сосуда. Чем меньше объем крови зависит от флип-угла, то есть чем ближе к «истинному» (полученному при 80°) это значение, тем «медленнее» обмен протонами через сосудистую стенку и, соответственно, меньше проницаемость сосуда. Таким образом, большой отрицательный угол наклона зависимости объема крови от флип-угла говорит о сравнительно «быстром» обмене протонами, то есть о повышенной проницаемости сосуда. Рисунок 24 иллюстрирует эти положения в применении к нашему эксперименту.

Приблизительно через неделю после имплантации объем крови в эктопических опухолях практически равнялся объему крови в мышечной ткани. Средние значения абсолютного объема крови V_b равнялись 2,6% и 2,4% общего тканевого объема для опухоли и мышечной ткани соответственно. В группе плацебо краткосрочной терапии (Группа 1 - 1 день, 2 дозы плацебо) отношение $R_{\text{флип}} = V_b(40^\circ)/V_b(80^\circ)$ составило 1,8 для опухоли и 1,6 для мышечной ткани. В то же время в экспериментальной группе краткосрочной терапии (Группа 2 – 1 день, 2 дозы VEGFR2-ТКИ) значение V_b уменьшилось для всех флип-углов (по сравнению с группой плацебо) и отношение $R_{\text{флип}}$ (частное значений V_b при флип-углах 40° и 80°) составило 1,1 для опухолевой ткани и 1,5 – для мышечной. Таким образом, именно объем крови в опухоли в Группе 2 (краткосрочная терапия AG01395) наименее зависит от флип-угла, а значит, лечение вызывает замедление водородного обмена через стенку

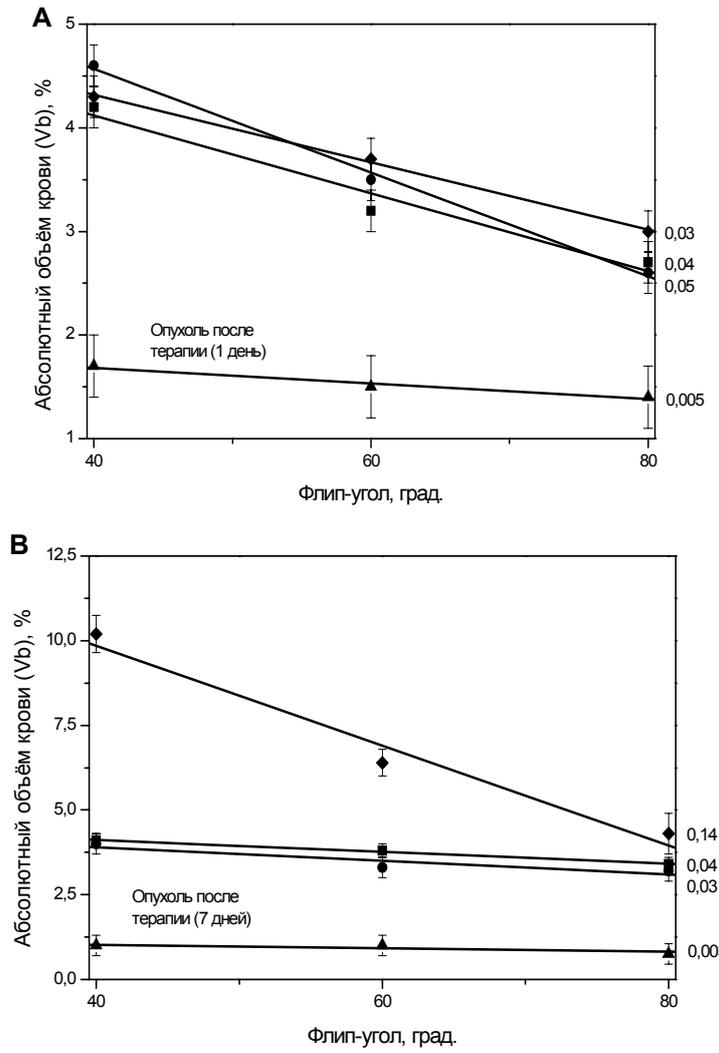


Рис. 24. Изменения соотношений обмена протонов в опухолях после антиангиогенной терапии. **А** – данные по абсолютному объему крови после 2 доз (1 дня) терапии. Группа 1 (плацебо): ♦ – опухоль, ■ – мышечная ткань. Группа 2 (терапия ингибитором ангиогенеза AG01395): ▲ – опухоль, ● – мышечная ткань. **В** – данные по абсолютному объему крови после 14 доз (7 дней) терапии. Группа 3 (плацебо): ♦ – опухоль, ■ – мышечная ткань. Группа 4 (терапия ингибитором ангиогенеза AG01365): ▲ – опухоль, ● – мышечная ткань

сосудов обусловленное уменьшением их проницаемости вследствие прерывания сигнальной цепи VEGFR. Данные такого анализа согласуются с известными свойствами ингибиторов VEGFR уменьшать вызванную сверхэкспрессией сосудистого эндотелиального фактора роста гиперпроницаемость сосудов. Забегая вперед, следует сказать, что только в пролеченных группах, как краткосрочной, так и длительной терапии обнаружилось подавление обмена протонов через сосудистую стенку (об этом говорят малые значения угла наклона в зависимости V_b от флип-угла). Следует заметить, что подобная линейная аппроксимация верна только при больших флип-углах (больших или равных 40°), и именно их мы использовали в данной работе.

В группе плацебо долгосрочной терапии (Группа 3, 1 неделя) объем крови опухоли значительно превышает V_b в мышечной ткани (если судить по флип-углам $< 80^\circ$). Что неудивительно, так как ничто не мешало свободному росту опухоли в этой группе, а значит, и интенсивной ее васкуляризации. Отношение значений V_b при флип-углах 40° и 80° ($R_{\text{флип}}$) оказалось намного выше для опухолевой ткани, чем для мышечной ($R_{\text{флип}}=2,39$ и $1,39$ соответственно). Эта картина отчетливо видна на Рис. 24В. Высокое значение отрицательного угла наклона ($0,14$) в плацебо-группе предполагает быстрый обмен протонами через стенку сосудов опухоли. Это согласуется с современными представлениями об опухолевом ангиогенезе, в частности, с тем положением, что сверхэкспрессия VEGF и его рецептора второго типа, характерная для этого процесса, приводит к значительному увеличению проницаемости сосудов. Напротив, объем крови опухоли в экспериментальной группе (Группа 4, 1 неделя терапии AG01395) был значительно ниже, чем объем крови в мышечной ткани, а зависимость V_b опухоли от флип-угла в этой группе животных оказалась подобна аналогичной зависимости в мышечной ткани. Низкое значение отрицательного угла наклона для опухоли в экспериментальной группе предполагает подавление обмена протонами через сосудистую стенку, вызванную анти-ангиогенной терапией. Это схоже с картиной в опухоли при кратковременном лечении (Группа 2, 1 день), то есть эффект подавления водного обмена представляет собой раннее явление.

В случае животных с ортотопической имплантацией обнаружено более чем двукратное уменьшение объема крови в опухоли по сравнению с плацебо, в то время как в мышечной ткани, как и в случае с эктопической имплантацией, значительных изменений не обнаружено. Объем крови в ортотопически имплантированных опухолях (стенка ободочной кишки) был намного выше, чем в подкожно имплантированных: $11,9\% \pm 2\%$ против $4,2\% \pm 0,1\%$ (объем крови в мышечной ткани, естественно, примерно одинаков до и после лечения, так как терапия не затрагивает мышечные клетки). Мы полагаем, что это является особенностью опухолевого ангиогенеза в высоковазуляризованной ткани (толстый кишечник) в отличие от подкожной (эктопической) имплантации в бедное сосудами окружение.

III.2. Поправочные коэффициенты по гематокриту в опухолевой и мышечной тканях

Поправочные коэффициенты для V_b (абсолютного объема крови, Таблица 9), обусловленных возможной разницей концентрации контрастного агента PGС-Gd в опухолевой и мышечной ткани определялись путем количественной оценки фракции эритроцитов. В качестве маркера красных кровяных телец использовался ^{99m}Tc . Поскольку PGС-Gd не проникает в эритроциты, разница их содержания в опухолевой и мышечной ткани, а также различие, обусловленное применением ингибитора ангиогенеза, может влиять на концентрацию контрастного агента в крови. Количественно измерив фракцию красных кровяных телец крови, мы приняли во внимание возможную ошибку при определении V_b , определяющегося в нашем МР-методе через тканезависимое соотношение эритроцитов и плазмы крови. Оцененный стандартными методами гематокрит атимусных μ/μ мышей составлял 40% (то есть фракция эритроцитов составляет 0,4). В контрольной (плацебо) группе фракция эритроцитов в опухоли составляла лишь 75% таковой в мышце. В экспериментальной же группе содержание эритроцитов от типа ткани практически не зависело. Таким образом, скорректированные значения V_b для пролеченных опухолей пренебрежимо мало отли-

чались от определенных изначально. В контрольной группе экспериментальные результаты для Vb опухоли значительно отличались от скорректированных по причине меньшего содержания циркулирующих эритроцитов.

III.3. Результаты гистологических исследований (изменения микрососудов в ответ на ангиогенную терапию VEGFR2-TKI)

III.3.1 Гистология препаратов контрольной группы

Целью иммуногистохимических исследований было подтвердить соответствие данных МРТ об изменении объема крови опухоли изменению плотности сосудов и архитектуры сосудистой сети. In vivo инъекция специфичного к фукозе лектина с флуоресцентной меткой позволила получить срезы с яркой флуоресценцией стенок сосуда в зеленом канале. Параллельно для выявления претерпевших апоптоз клеток было выполнено окрашивание TUNEL (красная флуоресценция, меченные Су3 и анти-дигоксигенином F(ab')₂ фрагменты). Такое «двойное» окрашивание на одних и тех же срезах позволяет соотнести плотность и расположение сосудов с количеством и локализацией апоптотических клеток. Нам удалось установить, что в контрольной (плацебо) группе количество флуоресцентных (апоптотических) ядер в районе опухоли являлось относительно низким (7±3 клеток на 1 мм² площади опухоли, Рис. 25А). Плотность же сосудов в опухоли, наоборот, была чрезвычайно высока (63±20 лектин-положительных сосудов на 1 мм² площади опухоли, Рис. 25В).

На Рис. 25 сосуды выглядят расширенными, степень связывания с лектином высокая. Также видно, что немногочисленные апоптотические клетки располагаются на участках наименьшей сосудистой плотности. Эти данные были подтверждены альтернативным методом определения плотности сосудов – при помощи антитела к CD31 (80±22 сосудов/мм², Рис. 26). На рисунке заметна высокая плотность сосудов в опухоли контрольного животного (для разграничения опухолевой и мышечной ткани после окрашивания на CD31 было произведено окрашивание гематоксилином и эозином, H&E). Расхождение между двумя методами определения

плотности сосудов – *in vivo* маркировка флуоресцентным лектином и окрашивание с помощью анти-CD31 - не превышает 16%.

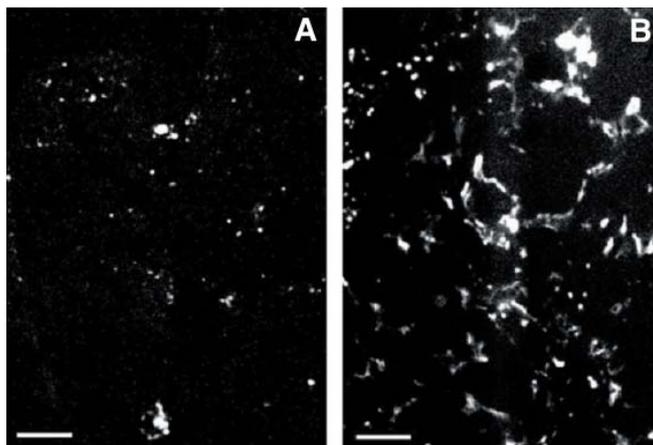


Рис. 25. Гистология контрольных опухолей (плацебо, группа 1), полученных после прижизненной инъекции животным лектина *L. Esculentum*, меченного флуорофором Alexa 488. А. Флуоресцентная микроскопия окрашенного на TUNEL (апоптоз) среза опухоли MV522. В. Окрашивание флуоресцентным лектином, отражающее плотность сосудов опухоли MV522. Отрезок, 400 мкм

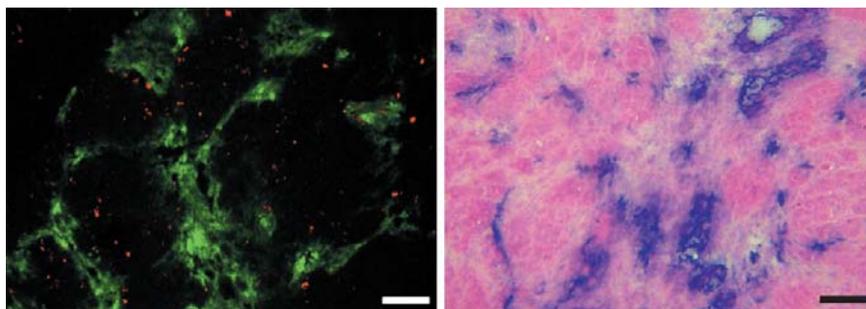


Рис. 26. Гистология контрольных опухолей (плацебо, группа 1). Слева: флуоресцентная микроскопия в двух каналах, отображающая связывание лектина с выстилающими сосуды клетками (зеленый цвет) и клетки, перенесшие апоптоз (окрашивание TUNEL, красный цвет). Справа: анти-CD31 окрашивание на кровеносные сосуды (окрашивание на плотность микрососудов) с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином. Отрезок, 100 мкм

III.3.2. Гистология препаратов экспериментальной группы (терапия VEGFR2-ТКИ)

Для экспериментальной группы животных (анти-ангиогенная терапия ингибитором VEGFR2) гистологическими методами показано 7-кратное увеличение числа апоптотических клеток (48 ± 6 клеток/ мм^2 , Рис. 27А) по сравнению с группой плацебо.

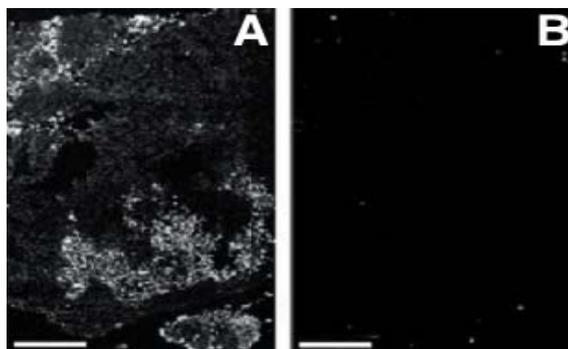


Рис. 27. Гистология опухолей MV522, подвергшихся анти-ангиогенной терапии ингибитором VEGFR AG01395, 25 мкг/кг, перорально (группа 2). Препараты получены после прижизненной инъекции животным лектина *L. Esculentum*, меченого флуорофором Alexa 488. А. Флуоресцентная микроскопия окрашенного на апоптоз методом TUNEL среза опухоли MV522. В. Окрашивание флуоресцентным лектином, отражающее плотность сосудов опухоли MV522. Отрезок, 400 мкм

Параллельно установлено трехкратное уменьшение плотности сосудов в районе опухоли (20 ± 10 сосудов/ мм^2 , Рис. 27В и 28). При этом в прилегающей к опухоли мышечной ткани наблюдалась незатронутая лечением нормальная структура сосудистой сети (Рис. 29). Следует заметить, что на границе опухоли и мышечной ткани видны TUNEL-положительные (апоптотические) клетки, выстилающие меченные лектином сосуды.

На Рис. 29 хорошо заметна высокая васкуляризованность мышечной ткани и почти полное отсутствие сосудов в опухоли после анти-ангиогенной терапии. Вдоль сосуда на периферии опухоли видны апоптотические клетки, схожие с клетками эндотелия, что подтверждает данные МРТ и согласуется с действием ингибитора VEGFR2-ТКИ (смещение баланса клеток от выживания к апоптозу путем увеличения экспрессии белков-факторов апоптоза при неизменном уровне факторов выживаемости).

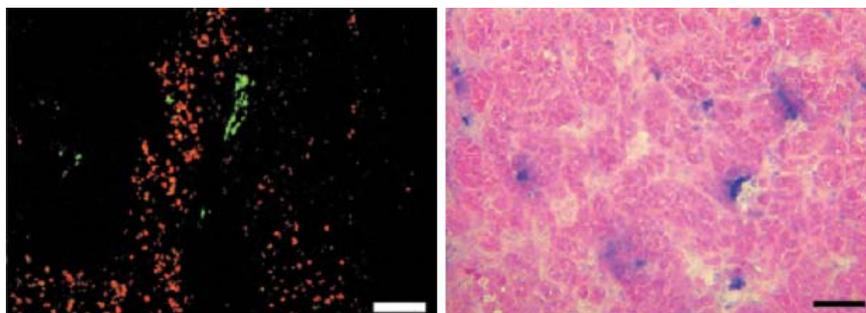


Рис. 28. Гистология опухолей MV522, подвергшихся анти-ангиогенной терапии ингибитором VEGFR2 AG01395, 25 мкг/кг, перорально Слева: флуоресцентная микроскопия в двух каналах, отображающая связывание лектина с выстилающими сосуды клетками (зеленый цвет) и клетки, претерпевшие апоптоз (окрашивание TUNEL, красный цвет). Справа: анти-CD31 окрашивание на кровеносные сосуды (окрашивание на плотность микрососудов) с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином. Отрезок, 100 мкм

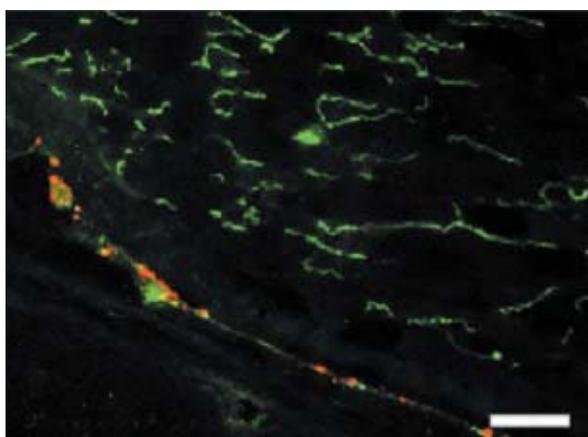


Рис. 29. Флуоресцентное изображение в двух каналах границы мышечной ткани и опухоли (после анти-ангиогенной терапии ингибитором VEGFR AG01395, 25 мкг/кг). Зеленый цвет – связавшийся с клетками сосудистой стенки лектин, красный – TUNEL-положительные клетки, претерпевшие апоптоз. Виден сосуд с TUNEL-положительными клетками. Обратите внимание на высокую васкуляризацию мышечной ткани и почти полное отсутствие сосудов в области пролеченной опухоли. Отрезок – 100 мкм

Действительно, при высоком увеличении подобная картина характерна для периферии опухоли (Рис. 30А и 30В, стрелки). В области лектин-положительных эндотелиальных клеток стенки сосуда небольшого диаметра (зеленый канал) видны TUNEL-положительные (красная флуоресценция) апоптотические клетки, морфологически схожие с клетками эндотелия. Таким образом, мы предположительно наблюдаем не только свидетельства апоптоза опухолевых клеток, но и инициирующий этот процесс апоптоз эндотелиальных клеток, обусловленный анти-ангиогенной терапией ингибитором VEGFR. После 7-дневного курса лечения замечено больше TUNEL-положительных клеток, чем после 2-разового. На Рис. 30С видно, что свободные от апоптоза области опухоли располагаются вокруг лектин- и CD31-положительных сосудов.

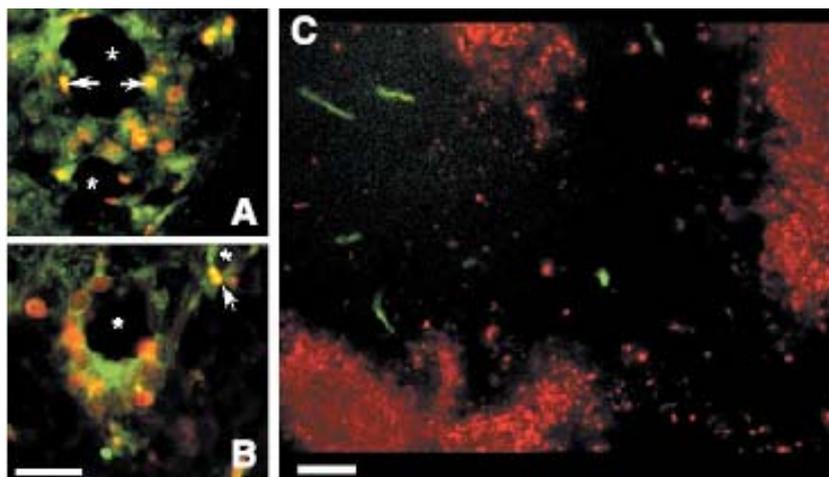


Рис. 30. TUNEL-анализ опухолей MV522 после анти-ангиогенной терапии AG01395 с прижизненной инъекцией лектина *L. Esculentum*, меченного флуорофором Alexa 488. А и В: примеры изображений периферических сосудов опухоли, на которых виден апоптоз выстилающих сосуда клеток. Стрелками показаны клетки, морфологически схожие с эндотелиальными. Отрезок, 50 мкм. С. Флуоресцентное изображение участка опухоли после 7 дней (14 доз) анти-ангиогенной терапии AG01395, на котором видны области апоптоза (красный) и сохранившиеся кровеносные сосуды (зеленый). Отрезок, 100 мкм

III.4. Характеристика и релаксационные свойства парамагнитного субстрата GD-DTPA-DISER

Релаксивность мономера бис-гидрокситриптамида Gd-DTPA (Gd-GTPA-diSer) была измерена на релаксметре 0,47 Тл в двух различных условиях: в деионизованной воде (pH = 4,8) и фосфатном буфере PBS (pH = 7,4) и равнялась 4,5 и 4,3 $\text{мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$, соответственно. В поле 1,5Т в деионизованной воде релаксивность мономера субстрата составляла 3,9 $\text{мМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ (см. Рис. 31).

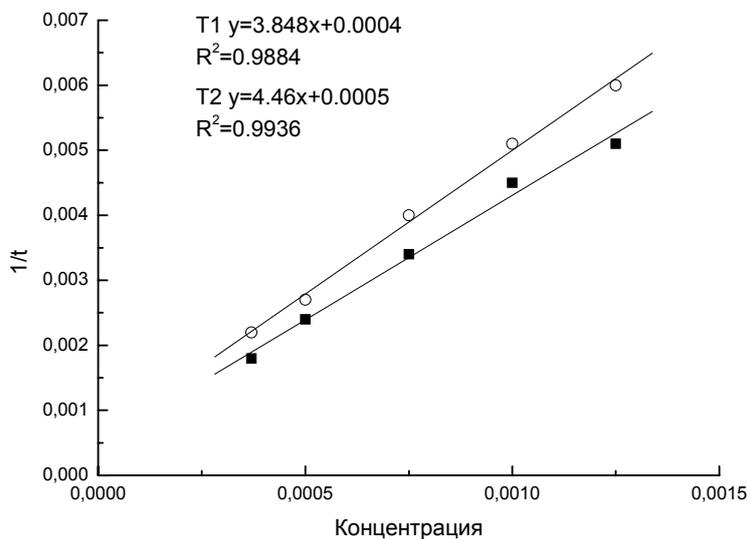


Рис. 31. Релаксивность мономера Gd-DTPA-diSer в воде (зависимость $1/t$ от концентрации) в магнитном поле 1,5 Тл

Исходя из предварительных экспериментов с пероксидазой хрена в качестве модельного фермента при температуре 25°C и pH=7,4 на основании данных масс-спектрологии (MALDI-MS с комплексами европия) мы предположили, что формируются продукты со степенью олигомеризации (N) от 2 до 7. В поле 0,47 Тл релаксивность олигомеров в 2,7 раза превосходила релаксивность мономера Gd-DTPA-diSer.

Известно, что реакция между серотонином и пероксидазой хрена приводит к продуктам с низким коэффициентом олигомеризации; чаще всего основным продуктом является димер. Чтобы проверить, есть ли в нашем случае вклад продуктов с $N > 2$ мы в течение 90 минут ($\text{pH} = 7,2 / 25^\circ\text{C}$) инкубировали 0,6 мл 10^{-4} мМ Gd-DTPA-diSer с 4 единицами миелопероксидазы при избытке перекиси водорода. Наблюдение за УФ-спектром реакционной смеси показало появление поглощения в области за 300 нм, в которой мономер уже не поглощает. Интенсивность этих новых полос возрастала на протяжении примерно 90 минут, причем 90% интенсивности можно было наблюдать уже через 30 минут. Реакция была остановлена помещением смеси в жидкий азот. Данные масс-спектрологии (MALDI-MS) явственно показали наличие продуктов с $N = 1-4$, но не продуктов с более высокой степенью олигомеризации. Анализ при помощи хроматографа (HPLC) показал широкое распределение продуктов реакции по сравнению с исходным субстратом.

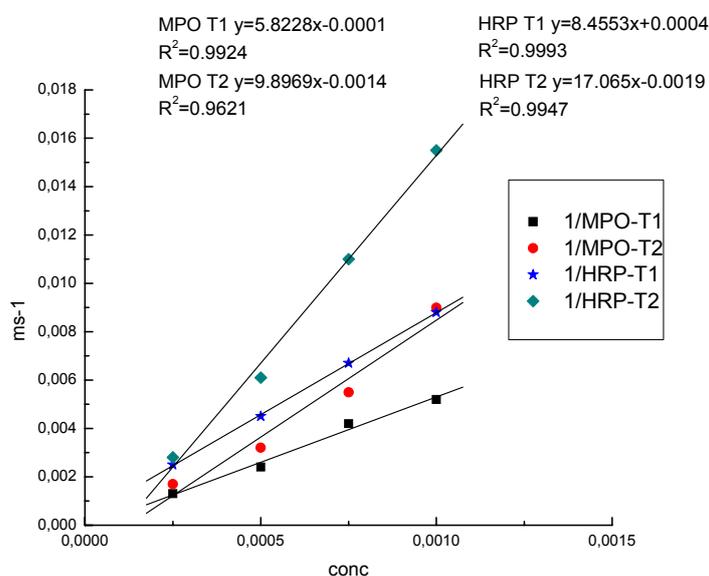


Рис. 32. Увеличение релаксивности Gd-DTPA-disSer в присутствии ферментов пероксидазы хрена (HRP) и миелопероксидазы (MPO)

После доказательства ограниченной олигомеризации продукта реакции Gd-DTPA-diSer и миелопероксидазы в присутствии перекиси водорода мы приступили к измерению влияния олигомеризации на релаксационные свойства исследуемого контрастного агента в поле 1,5 Тл (см. Рис. 32, Табл. 10).

Таблица 10. **Значения T1 мономера и олигомера Gd-DTPA-diSer (в присутствии бинарной системы ферментов).**

Для получения значений T1 использовался клинический томограф GE 1,5 Тл

Конц., М	T1, мс	T1/МРО, мс	T1/HRP, мс
0.001	222	176	114
0.00075	304	228	147
0.0005	435	390	220
0.00025	710	696	403

Предварительные МР-эксперименты показали, что в присутствии субстрата Gd-DTPA-diSer и ферментной системы ПХ/ГО первый фермент может быть обнаружен в концентрации 0,04-0,4 единицы (10-100 нг). Это говорит о довольно высокой чувствительности метода, особенно на шкале МРТ, ведь, как известно, эта модальность не является лидером в данной области.

III.5. Характеристика биоконъюгатов для специфичной визуализации молекулярных маркеров с помощью парамагнитного субстрата GD-DNPA-DISER

Для проверки эффективности модификации антитела и ферментов по системе HydraLink мы определяли молярное соотношение замещения (Molar Substitution Ratio - MSR). Данные представлены в Табл. 11.

Таблица 11. **Типичные результаты определения молярного соотношения замещения при синтезе биоконъюгатов**

mAb425-SFB	3 модификации / антитело
GO-SHNNH	6 модификаций / фермент
HRP-SHNNH	4,5 модификаций / фермент

Спектрофотометрический анализ образцов, приготовленных по Протоколу 1, показывает, что модификация при оптимизированных условиях проходит эффективно, с соблюдением рекомендованных фирмой-производителем соотношений.

Приведены типичные результаты ВСА – концентрации исходных компонентов, промежуточных продуктов и самих конъюгатов:

mAb425 : 4,2 мг/мл
 mAb425 – обессол. : 3,4 мг/мл
 mAb425-SFB : 2,7 мг/мл
 GO-SHNH : 5,8 мг/мл
 HRP-SHNH : 4,2 мг/мл
 GO-mAb425 : 4,4 мг/мл
 HRP-mAb425 : 4,0 мг/мл

На колонке, даже в присутствии Tween, теряется 20-25% белка, особенно это касается антитела (после обессоливания его концентрация уменьшалась в среднем на 15-25%). Реальные концентрации продуктов могут быть выше по причине расхождения свойств исследуемых белков в тесте ВСА со стандартом – альбумином. Состав продуктов подтвержден гель-электрофорезом (Рис 33). Заметно, что иногда в конъюгатах остается значительная часть непрореагировавшего антитела.

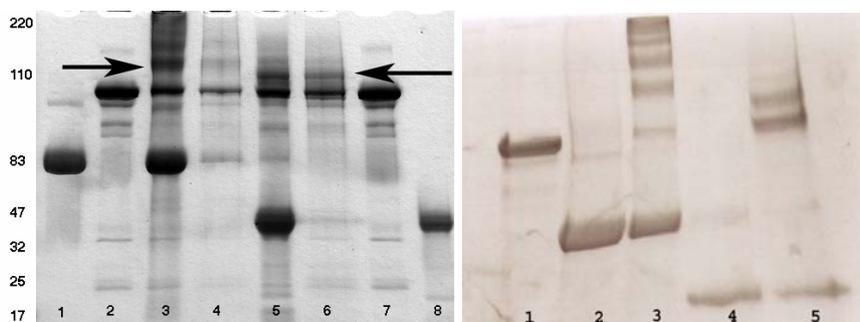
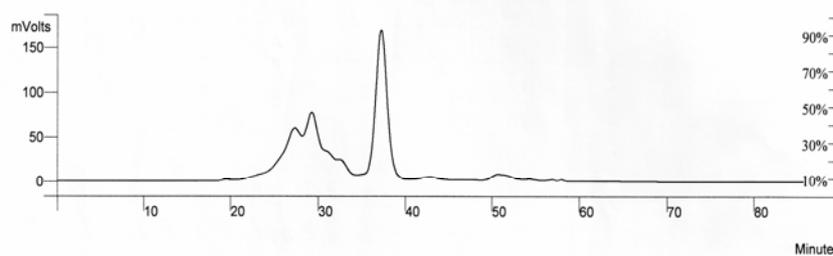


Рис. 33. Гель-электрофорез конъюгатов, исходных и промежуточных соединений. Слева – градиентный 4-15% гель-электрофорез: 1 – mAb425; 2- GO-SHNH; 3 – GO-mAb425, 4 – HRP-SHNH, 5- HRP- mAb425. Справа: 1 – глюкоксидаза (GO); 2,7 – mAb425; 3,5- неочищенные конъюгаты, 3 – GO-mAb425, 5 – HRP-mAb425; 4,6 – очищенные конъюгаты (4 – GO-mAb425, 6 – HRP-mAb425), 8 – пероксидаза хрена (HRP)

Для очистки конъюгатов (удаления непрореагировавшего антитела) применялась гель-фильтрация на колонке Superdex 200 производства GE. Результат очистки отображен на Рис. 34 и 35.



Peak No	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		19.4828	27.322	0.000	5529105	0.00	BV	0.0		0
2		22.5591	29.236	0.000	6402157	0.00	VB	137.2		0
3		53.6200	37.180	0.000	15217075	0.00	BB	83.7		0
4		4.0757	50.676	0.000	1156664	0.00	BB	146.6		0
5		0.1205	56.876	0.000	34201	0.00	BV	28.9		0
6		0.1419	57.928	0.000	40274	0.00	VB	17.4		0
Totals		100.0000		0.000	28379474					

Рис. 34. Результаты гель-фильтрации конъюгата HRP-mAb425 на колонке Superdex 200

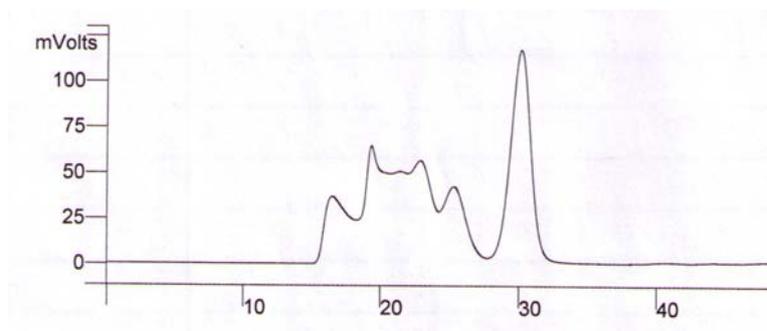


Рис. 35. Гель-фильтрация конъюгата GO-mAb425 на колонке Superdex 200

При помощи гель-электрофореза убедились, что после очистки биоконъюгаты не содержат свободное антитело, которое, в случае

присутствия, конкурировало бы с конъюгатами за рецепторы (Рис. 36). При большом количестве свободного антитела эффект магнитно-резонансной амплификации (увеличение интенсивности МР-сигнала вследствие олигомеризации парамагнитного субстрата Gd-DTPA-diSer) был бы менее заметен в виду его конкуренции с конъюгатами.

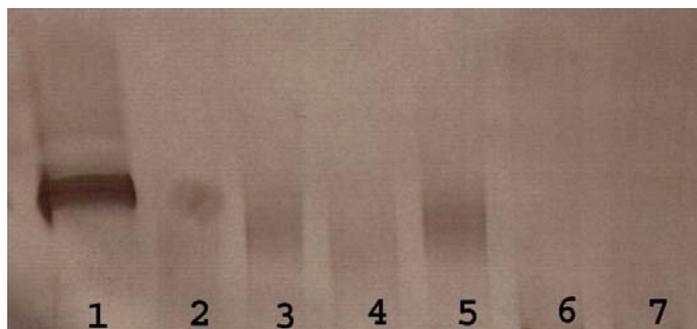


Рис. 36. Гель-электрофорез сконцентрированных фракций конъюгатов после гель-фильтрации (2-7), показывающий отсутствие свободного антитела (1)

III.6. *In vitro* Исследования работы системы биоконъюгаты-парамагнитный субстрат

Целью *in vitro* экспериментов было показать, что в биоконъюгатах пероксидаза хрена и глюкозооксидаза связаны с активным высокоспецифичным антителом к сверхэкспрессируемому в опухоли рецептору эпителиального фактора роста (EGFR) или к семейству белков L6, являющихся маркером карциномы. Только при условии высокой активности антитела возможна визуализация маркера-мишени посредством МРТ. Для начала мы провели сравнительные ELISA-тесты конъюгатов на клетках, экспрессирующих EGFR на высоком уровне (человеческая плоскоклеточная карцинома A431) и клетках, не экспрессирующих высокий уровень EGFR (MDCK, клеточная линия эпителия почки) (Рис. 37).

Полученные результаты полностью подтверждают активность антитела. Используя меченное ^{125}I антитело мы установили, что клетки A431 экспрессируют в среднем 0,91-0,92 млн. рецепторов

EGFR на клетку и 1,5-2 млн. антигена L6 на клетку. Таким образом, выполняются оба условия, необходимые для получения МР-сигнала с высоким соотношением сигнал/шум: высокая активность антитела и высокая концентрация маркера-мишени на поверхности клетки.

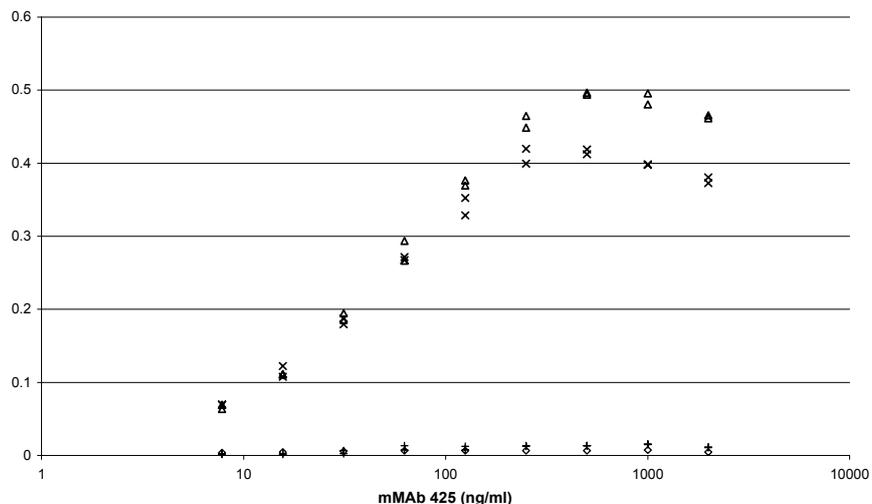


Рис. 37. ELISA на клетках A431 (EGFR-положительных) и MDCK (EGFR-отрицательных). Показаны результаты двух независимых экспериментов

Дальнейшие исследования зондов фермент-антитело продолжались на клетках A431, экспрессирующих EGRF и L6. Был проведен ELISA-тест по Протоколу 5 с целью оптимизировать концентрацию конъюгатов. Мы определили, что концентрации в диапазоне 12,5 – 50 мкг/мл для обоих конъюгатов вполне достаточна для полного насыщения ELISA-сигнала (и, следовательно, клеточных рецепторов).

Максимум сигнала не приходится на максимальные концентрации конъюгатов. По-видимому, избыток HRP-mAb425 конкурирует с системой HRP-GO, что приводит к наблюдаемому уменьшению оптической плотности (Табл. 12, Рис. 38).

Таблица 12. Значения оптической плотности в плашке с клетками A431 (EGFR-положительными) относительно контроля (клеток MDCK, EGFR-отрицательных)

GO/HRP, мкг/мл	100	50	25	12.5	6.3	3.2	1.6	0.8
100	0.877	0.971	0.832	0.778	0.640	0.674	0.747	0.655
50	1.093	1.338	1.265	0.997	0.863	0.780	0.785	0.678
25	0.995	1.320	1.342	1.294	0.940	0.799	0.813	0.759
12.5	0.902	1.176	1.143	1.005	0.962	0.730	0.748	0.711
6.3	0.683	0.781	1.104	0.901	0.615	0.544	0.602	0.523
3.2	0.573	0.672	0.761	0.765	0.700	0.499	0.476	0.510
1.6	0.402	0.389	0.467	0.545	0.549	0.478	0.479	0.496
0.8	0.346	0.301	0.317	0.502	0.433	0.420	0.501	0.459

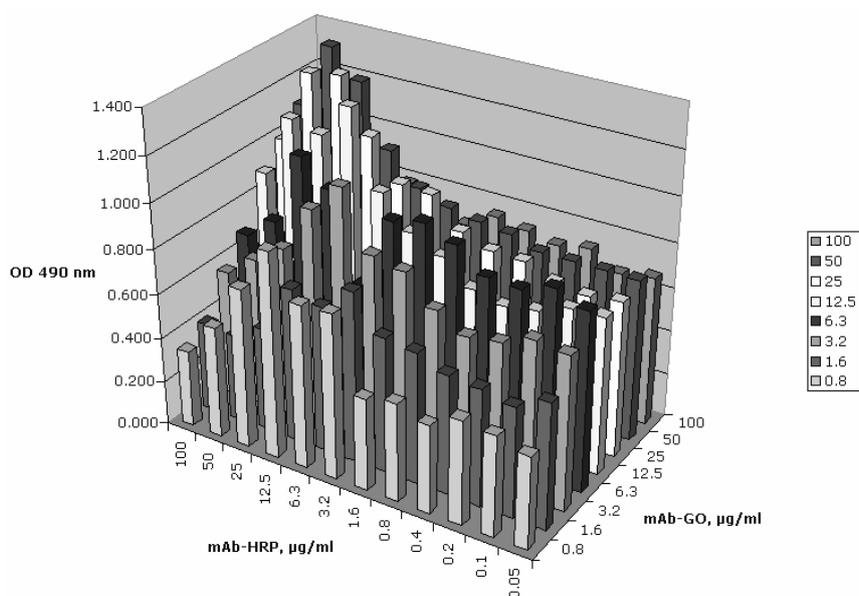


Рис. 38. Результаты кросс-титрования клеток A431, экспрессирующих EGFR, в 96-луночной плашке. Диапазон концентраций HRP-mAb425: 100-0,05 мкг/мл; GO-mAb425: 100 – 0,8 мкг/мл

Следующим этапом была визуализация эффекта от взаимодействия бинарной системы фермент-антитело с парамагнитным субстратом (Gd-DTPA-diSer). Показано, что на клеточной культуре наблюдается

ся уменьшение T1 в 1,4 раза по сравнению с контролем (раствор субстрата без конъюгата). Для сравнения, в отсутствие клеточной культуры при добавлении оксидоредуктазы в раствор субстрата наблюдается уменьшение T1 в 1,6-1,8 раз (в зависимости от концентрации субстрата). Разница в T1 заметна при визуальном наблюдении (Рис. 39).

Таблица 13. **Исследование работы конъюгатов и парамагнитного субстрата на клеточной культуре (экспрессирующих EGFR клетках A431)**

Только парамагнитный субстрат T1, мс				Клеточная культура + парамагнитный субстрат; T1, мс	
Субстрат	Контроль	Бинарная система	Отн-е	Бинарная система	Отн-е
0,1M	682,1 ±5,0	427±2,2 мс	1,60	483,6±2,2	1,41
0,2M	448,3±1,8	258,4±0,7 мс	1,73	315,3±1,8	1,42
0,5M	252±1,2	135,5±3,1 мс	1,86	176,5±0,7	1,43

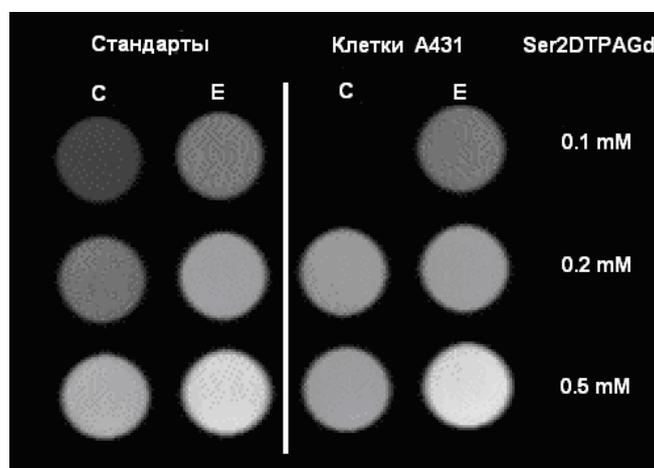


Рис. 39. МР-исследование системы фермент-антитело на клеточной культуре (справа) в присутствии (Е) или отсутствии (С) фермента. Слева – контроль

После положительного результата на суспензии клеток мы провели еще один МР-эксперимент на клеточной культуре, с не-

скольким различным дизайном. А именно, в 96-луночной планке во время МР-исследования мы разместили не суспензию клеток, а осажденные клетки А431 (экспрессирующие EGFR клетки карциномы яичников). В ячейках D, E, F после добавления конъюгатов (антитело против EGFR-пероксидаза хрена и антитело против EGFR-глюкозооксидаза) и инкубации в течение 30 минут мы отмывали клетки 4 раза путем центрифугирования, что исключало нахождение компонентов системы в растворе. В качестве контроля использовались ячейки A, B, C, в которые мы либо добавляли только один из компонентов, либо только буфер, а в остальном проводили идентичные процедуры (Табл. 14А).

Таблица 14А. **Заполнение лунок планки для МР-визуализации клеточного осадка (А431)**

Концентрация субстрата		
0,1 мМ	HRP 0,25, буфер 0.25	HRP 0,25, GO 0,25
0,2 мМ	GO 0,25, буфер 0.25	HRP 0,25, GO 0,25
0,5 мМ	буфер 0,5	HRP 0,25, GO 0,25

После добавления субстрата и 30-минутной инкубации клетки отмывались аналогично. Таким образом, мы хотели убедиться, что возможные изменения релаксивности будут вызваны а) специфичным связыванием антитела со своей мишенью, то есть EGFR б) слаженной работой комплекса по схеме глюкоза + глюкозооксидаза = водорода + пероксидаза = олигомеризация субстрата = уменьшение T1. При такой постановке эксперимента полностью исключалось влияние несвязавшихся конъюгатов и субстрата в растворе. Проведенная релаксометрия показала стабильное уменьшение значений T1 по сравнению с контрольными лунками (Табл. 14Б).

Таблица 14Б. **Значения T1 МР-эксперимента на осажденных клетках А431**

Концентрация субстрата	Контроль. T1, мс	Бинарная система. T1, мс
0,1 мМ	617,9	587,6
0,2 мМ	606,9	580,6
0,5 мМ	626,4	508,4

На этом основании можно сделать вывод о том, что даже при столь жестких условиях эксперимента система функционирует. Меньшее, чем в остальных постановках снижение T1 (максимум

10%) может иметь несколько объяснений. Это и специфические условия эксперимента, и малое время инкубации системы фермент-антитело, и неполное восстановление экспрессии EGFR клетками после воздействия трипсина.

II.7. Визуализация молекулярных мишеней *in vivo*

В контрольных опухолях после инъекции парамагнитного субстрата Gd-DTPA-diSer наблюдалось быстрое увеличение интенсивности сигнала и постепенное вымывание контрастного агента из опухоли (Рис. 40, вверху, кружочки) с медленным удалением остаточного субстрата.

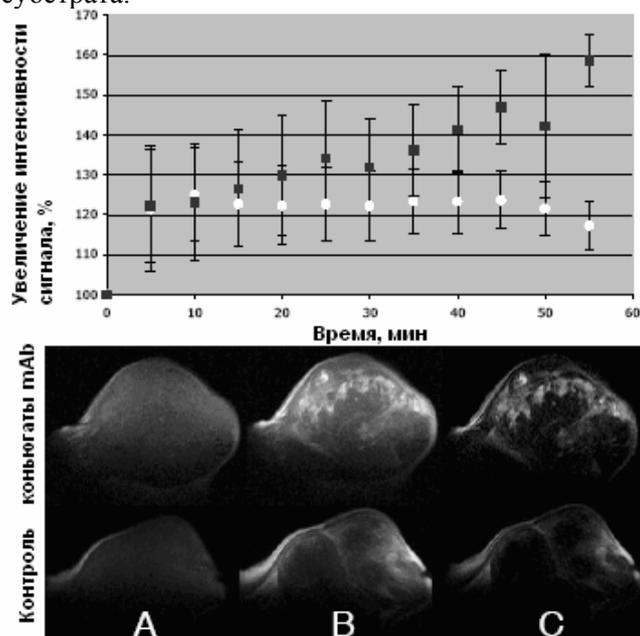


Рис. 40. Вверху: зависимость интенсивности МР-сигнала в опухоли, экспрессирующей маркер L6, от времени после инъекции парамагнитного субстрата. Черные квадратики – инъекция бинарной системы GO-L6 и HRP-L6, белые кружочки – контроль. Внизу: МР-изображения опухоли, экспрессирующей L6, до инъекции парамагнитного субстрата (А), 55 минут после нее (В) и «разность» изображений (А) и (В). Верхний ряд - инъекция бинарной системы GO-L6 и HRP-L6, нижний – контроль (инъекция фосфатного буфера)

В случае экспериментальной группы (с предварительным введением конъюгатов с антителом против L6) наблюдалась противоположная картина: после инъекции на протяжении всего времени исследования происходило усиление интенсивности сигнала (Рис. 40, сверху, квадратики), соразмерное с увеличением релаксивности субстрата в присутствии системы HRP/GO (160% через 55 минут после инъекции). На Рис. 40 (внизу) видны различия в контрасте опухоли в случае введения GO-L6 и HRP-L6 (верхний ряд) и контроля (нижний ряд). Приведены изображения до контраста (А) и последнее изображение после контраста, 12-е по счету (В). При «вычитании» этих изображений получают «разностные» изображения (С). Мы полагаем, что разница в контрасте на изображениях (С) обусловлена специфичным связыванием антитела с маркером-мишенью (L6) в случае инъекции GO-L6 и HRP-L6 и его отсутствием для контрольной опухоли. Таким образом, участки с повышенной интенсивностью сигнала (Рис. 40 внизу, верхний ряд, (С)), соответствуют областям накопления конъюгатов и, следовательно, парамагнитного субстрата.

Глава IV
**ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ГЕМОДИНАМИЧЕСКИХ
ПАРАМЕТРОВ ОПУХОЛИ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ
БИОМАРКЕРОВ**

IV.1. Анализ гемодинамических параметров

Неинвазивная визуализация изменения объема крови в опухоли и измерение проницаемости сосудов позволяют оценивать эффекты анти-ангиогенной (или ангиостатической) терапии для животных *in vivo* [103, 116]. Мониторинг абсолютного объема крови в опухоли в доклинических и клинических испытаниях может использоваться для определения ранних изменений в гомеостазе опухоли, вызванных ингибиторами ангиогенеза, и может быть полезен при прогнозе ответа на терапевтический препарат. Также подобный неинвазивный мониторинг может применяться для определения оптимальной дозы ингибитора ангиогенеза, что в настоящее время является очень важной задачей анти-ангиогенной терапии.

В данной работе проведен анализ анти-ангиогенных эффектов, вызванных ингибитором тирозин-киназной активности рецептора второго типа эндотелиального сосудистого фактора роста (VEGFR2-TKI). Мы предполагали, что он вызовет значительное уменьшение кровоснабжения опухоли на самой ранней стадии лечения, и именно этим фактом было обосновано наше решение исследовать именно абсолютный объем крови в опухоли, а не другой возможный параметр, проницаемость сосудов. Последний пока что не представляется возможным количественно оценивать методами МРТ отдельно от площади сосудистой поверхности (так называемого «продукта произведения проницаемости на площадь» [124, 125]). Но поскольку VEGFR2-TKI вызывает коллапс части сосудов, особенно на периферии опухоли, одновременно уменьшая проницаемость оставшихся, некорректно сравнивать проницаемость до и после лечения в виду очевидно изменившейся сосудистой площади. Поэтому мы оценивали объем крови в опухоли, используя нетоксичный, биосовместимый контрастный агент PGC-Gd. Он селективно сокращает время релаксации протонов воды сосудистого русла, не проникая в окружающие ткани (на время исследования)

по причине большого гидродинамического диаметра, соответствующего глобулярному белку с массой 150кДа.

Анализ результатов МРТ справедлив при выполнении следующих условий: а) концентрация PGC-Gd в крови близка к постоянной в течение 45 минут после внутривенной инъекции, то есть в это время контрастный агент не должен покидать кровотока; б) полное исключение PGC-Gd из эритроцитов; в) быстрый обмен протонами через плазматическую мембрану эритроцитов, что позволяет считать кровоток единым пространством (модель Хейзельвуда); г) медленный обмен протонами через эндотелиальный барьер (по сравнению со временем, необходимым для получения изображения в выбранном объеме ткани). Первое допущение было проверено использованием модельного агента со сравнимым гидродинамическим диаметром (суперпарамагнитных наночастиц оксида железа) с последующим окрашиванием тканей по Перлу (на железо). Следов железа в окружающих тканях обнаружено не было. Сравнение изменений в объеме опухоли и объеме крови в опухоли в ответ на анти-ангиогенную терапию показало, что в то время, как ответ по объему крови был чрезвычайно быстрым (после двух доз VEGFR2-ТКИ кровоснабжение опухоли уменьшилось вдвое), уменьшение объема опухоли наблюдалось только после 7 дней (14 доз) терапии. Более того, качественный анализ соотношений водного обмена через стенку сосудов в тканях контрольных и пролеченных животных выявил тканезависимую разницу в его скорости между опухолью и прилегающей мышечной тканью, а также наименьшую сравнительную проницаемость сосудов опухолей, подвергшихся анти-ангиогенному лечению. Эти результаты предполагают, что VEGFR2-ТКИ эффективно подавляет рост опухолевых сосудов и самой опухоли как в эктопической, так и в ортотопической моделях карциномы ободочной кишки человека.

Исключение парамагнитного агента PGC-Gd из эритроцитов в местном кровотоке могло потенциально вызвать тканезависимые неточности измерений абсолютного объема крови по причине локальных отличий в гематокрите нормальных и опухолевых сосудов. Исследование с мечеными радиоизотопом эритроцитами показало увеличение фракции красных кровяных телец в оставшихся после анти-ангиогенной терапии опухолевых сосудах. В мышечной ткани фракция эритроцитов оставалась постоянной вне зависимо-

сти от лечения ингибитором VEGFR2 (Табл. 9). Мы полагаем, что пониженное содержание эритроцитов в опухолях у животных контрольной (плацебо) группы обусловлено аномальной архитектурой неопластических сосудов. По нашему мнению, есть два объяснения повышению содержания эритроцитов в гематокрите пролеченных опухолей. Во-первых, структурно и морфологически аномальные опухолевые сосуды могут испытывать частичную «нормализацию» в результате анти-ангиогенной терапии, приобретая схожие с нормальными свойства (см. [101]). Этот эффект наблюдался при помощи интравитальной микроскопии в случае терапии различными ингибиторами ангиогенеза. Вторым объяснением мы считаем возможность присутствия в опухоли фракции «захваченных» нормальных сосудов с низкой степенью пролиферации эндотелиальных клеток. Такие сосуды не затрагиваются анти-ангиогенной терапией, и именно эта фракция «выживает» в процессе лечения.

Следует заметить, что относительное уменьшение объема крови в ортотопических опухолях было выражено слабее, чем в эктопических (примерно в два раза против четырех). Мы полагаем, что это обусловлено изначально высокой васкуляризацией стенки толстого кишечника и, следовательно, относительно меньшему количеству неопластических сосудов с активно пролиферирующими клетками эндотелия, против которых направлена анти-ангиогенная терапия.

Гистологическое исследование контрольных и пролеченных опухолей выявило достаточно малое количество сосудов в последних. Наблюдаемое сокращение кровоснабжения наводит на мысль, что интенсивный массивный апоптоз опухолевых клеток вызван постоянным или временным нарушением сосудистой перфузии в результате лечения VEGFR2-ТКИ. Это служит косвенным доказательством того, что препарат вызывает апоптоз эндотелиальных клеток. И хотя на большинстве срезов отличить апоптотические эндотелиальные клетки от опухолевых не представляется возможным, на некоторых видны свидетельства апоптоза клеток, выстилающих сосуды на периферии опухоли, которые хорошо соотносятся с анти-ангиогенным лечением (см. Рис. 29-30). И хотя отдельные TUNEL-положительные клетки и напоминают эндотелиальные, VEGFR2-ТКИ мог спровоцировать апоптоз таких клеток, как перициты или экспрессирующие PDGF стромальные фиброб-

ласты. Долговременное лечение животных анти-ангиогенным препаратом позволило сделать выводы, что немногочисленные оставшиеся сосуды дали возможность выжить прилегающим опухолевым клеткам, однако не позволили опухоли расти дальше.

В заключение отметим, что количественная МРТ позволяет проводить мониторинг изменения объема крови в опухоли, которое является ранним эффектом ответа на анти-ангиогенную терапию ингибитором тирозин-киназной активности VEGFR2. Характерное только для опухоли уменьшение объема крови совпадает с одновременным массивным апоптозом раковых и/или эндотелиальных клеток, снижением плотности сосудов и их проницаемости, а также увеличением фракции эритроцитов в остаточном кровотоке опухоли. Опосредованный МРТ анализ объема крови в опухоли может стать важным этапом в оценке эффективности анти-ангиогенных препаратов в доклинических испытаниях и клинической практике.

IV.2. Визуализация молекулярных маркеров

Неинвазивная визуализация молекулярных маркеров ангиогенеза и онкогенеза является давней целью исследователей и клиницистов. В настоящее время для МРТ ведется разработка как T1-агентов (на основе ионов гадолиния), так и T2*-агентов (наночастицы оксида железа). В то время как доклинические испытания проводятся на все более и более высокопольных приборах (7-11 Тл), при которых T1-эффекты уменьшаются и естественное преимущество получают T2*-агенты, клинические сканеры ввиду ряда ограничений пока остаются в пределах 3 Тл. К этим ограничениям относятся повышение температуры тела пациента, известные побочные явления столь сильного магнитного поля (например, головокружение), а также еще неизученные потенциальные долговременные последствия. При полях до 3 Тл влияние T1-агентов на протоны тканей окружения достаточно велико для визуального наблюдения изменений интенсивности МР-сигнала. Несомненным преимуществом T1-агентов является их позитивное контрастирование (то есть увеличение интенсивности МР-сигнала) в отличие от негативного контрастирования (уменьшение МР-сигнала), которое

дают T2*-агенты. Уменьшение интенсивности МР-сигнала может быть вызвано многими причинами, в то время как при позитивном контрастировании можно быть уверенным, что причиной увеличения интенсивности МР-сигнала послужило накопление контрастного агента.

Мы наблюдали селективное усиление МР-сигнала в результате совместного применения специфичного T1-агента (Gd-DTPA-diSer) и системы биоконъюгатов фермент-антитело *in vitro* и *in vivo*. Тесты на клеточной культуре (ELISA) позволили оптимизировать концентрацию конъюгатов. В результате в эксперименте на животных с предварительной инъекцией конъюгатов мы увидели значительное локальное усиление МР-сигнала в области опухоли (см. Рис. 40). Контроль (только Gd-DTPA-diSer) показал кратковременное неспецифическое усиление сигнала в области опухоли, после чего, как и ожидалось, контрастный агент был постепенно вымыт кровотоком. Было показано, что предварительная инъекция системы фермент-антитело обеспечивает селективную олигомеризацию парамагнитного субстрата и специфичное увеличение интенсивности МР-сигнала *in vitro* и *in vivo* в присутствии маркеров-мишеней (EGFR, L6). На модели подкожно имплантированной мышам карциномы A431 по сравнению с контролем (Gd-DTPA) предварительная инъекция конъюгата обеспечила 160%-ое специфичное пост-контрастное усиление сигнала. В экспериментальной группе при «попиксельном вычитании» значений интенсивности МР сигнала «преконтрастной» картинки из «постконтрастной» видны области накопления контраста, соответствующие связыванию антитела со своим антигеном. Следует заметить, что накопление контраста происходит на периферии опухоли, а не в ее центре. Это согласуется с современными представлениями об активных процессах на периферии опухоли (ангиогенез, пролиферация) и недостатке сосудов и некрозе в ее центре.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первая глава посвящена основам опухолевого ангиогенеза, который является неперенным условием роста онкологического новообразования более 1-2 мм в диаметре. В какой-то момент «спящая» опухолевая масса «включает» ангиогенез, смещая равновесие между про- и анти-ангиогенными факторами и заставляя окружающие сосуды пускать «ростки» в свою сторону. В первой главе освещены механизмы ангиогенеза и особенности опухолевых сосудов (хаотичность, отсутствие структуры сети, неравномерный диаметр, повышенная проницаемость). Это обусловлено набором факторов, важнейшим из которых является сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), поэтому значительная часть первой главы посвящена биохимии ангиогенеза – структуре и свойствам ангиогенных факторов, их рецепторов и взаимодействию. Поскольку важность ангиогенеза для функционирования и прогресса опухоли не вызывает сомнений, заманчивой представляется перспектива «выключения» этого процесса. Действительно, анти-ангиогенез приводит к остановке роста и, в конечном итоге, регрессу опухоли. Терапия анти-ангиогенными препаратами, как эндогенными, так и синтетическими, является перспективным направлением борьбы с онкологическими заболеваниями (Бевакузумаб, антитело против VEGF-A, по результатам клинических испытаний было одобрено для применения при колоректальном раке в США и Европе).

Поскольку практически все заболевания, в том числе и онкологические, имеют молекулярную природу, врачи-клиницисты нуждаются в надежных визуализирующих (и, по-возможности, минимально инвазивных) методах, позволяющих производить диагностику и продольный мониторинг пациентов на молекулярном уровне. В арсенале врачей и исследователей есть такие инструменты, как компьютерная томография (КТ), магнитно-резонансная томография (МРТ), позитрон-эмиссионная томография (ПЭТ), ультразвуковое исследование (УЗИ) и оптические методики (флуоресценция, биолюминесценция). Каждая из этих модальностей имеет определенные преимущества и, к сожалению, недостатки, когда речь идет о визуализации процессов, происходящих на молекулярном и клеточном уровне (см. Табл. 15а и 15б).

Таблица 15А. Характеристики визуализирующих модальностей

Метод	Диапазон	Разрешение	Глубина проникновения	Временное разрешение	Чувствительность
ПЭТ	Высокоэнерг. γ -лучи	1-2 мм	Без огранич.	10 сек – мин	10^{-11} - 10^{-12} , моль/л
СПЕКТ	Низкоэнерг. γ -лучи	1-2 мм	Без огранич.	минуты	10^{-10} - 10^{-11} , моль/л
Флуоресц.	Видимый свет	3-5 мм *)	1-2 см	Сек / мин	10^{-15} - 10^{-17} , моль/л
Биолюмин.	Видимый / близ. к инфракрасн.	2-3 мм	< 1 см	Сек / мин	10^{-9} - 10^{-12} , моль/л
МРТ	Радиоволны	25-100 мкм	Без огранич.	Мин / час	10^{-5} моль/л
КТ	Рентгеновские лучи	50-200 мкм	Без огранич.	минуты	10^{-3} моль/л
УЗИ	Высоко-частотный звук	50-500 мкм	мм-см	Сек / мин	Низкая, не охарактеризована

*) Возможна инвазивная *in vivo* микроскопия / эндоскопия

КТ является относительно доступным методом и предоставляет хорошее анатомическое разрешение, но обладает низкой чувствительностью на молекулярном уровне. УЗИ страдает недостатком разрешения, но существует ряд возможностей для визуализации непрямыми методами (например, использование микропузырьков). Оптические методики имеют отличную чувствительность и позволяют напрямую наблюдать события на молекулярном и клеточном уровне, однако их применение ограничено крайне небольшой глубиной проникновения и, самое главное, потенциальными ограничениями для применения в клинической практике, поскольку для этих методик необходима модификация клеток флуоресцентными или биолюминисцентными метками. ПЭТ – наиболее дорогой метод исследования, однако его чувствительность (т. е. способность к детектированию) составляет, фактически, одну молекулу! Это великолепное свойство для инструмента для визуализации на молекулярном уровне, к сожалению, частично нивелируется неудовле-

творительным разрешением (порядка 1 мм). МРТ, с другой стороны, предоставляет разрешение до 50 микрон *in vivo*, но с чувствительностью на много порядков ниже. Разумным представляется подход комбинирования этих методик для получения максимальной информации, равно как и совершенствование каждой из них в отдельности.

Таблица 15Б. Достоинства и недостатки визуализирующих методов

Метод	Достоинства	Недостатки
ПЭТ	Высокая чувствительность, применимо к клинике, количественная оценка. Оценка метаболизма.	Ионизирующее излучение. Наличие циклотрона неподалеку. Высокая стоимость. Относительно низкое пространственное разрешение
СПЕКТ	Высокая чувствительность. Возможно применение в клинике. Наличие большого кол-ва специфичных проб	Ионизирующее излучение. Требуется адаптации к клинике. Относительно низкое пространственное разрешение
Флуоресценц.	Самая высокая чувствительность. Просто, дешево, быстро.	Небольшая глубина проникновения. Сложность адаптации в клинику. Автофлуоресценция.
Биолюминис.	Высокая чувствительность. Просто, дешево, быстро.	Небольшая глубина проникновения, относительно низкое разрешение. Сложность адаптации в клинику.
МРТ	Высокое пространственное разрешение. Комбинация анатомической и функциональной информации. Безопасно.	Относительно низкая чувствительность. Высокая концентрация специфичных агентов.
КТ	Быстро, дешево, морфология.	Ограниченное применение в «молекулярной» визуализации, ионизирующее излучение.
УЗИ	Режим «реального времени», дешево. Исследуется потенциал сфокусированного ультразвука в локальной доставке лекарств.	Ограниченное применение в «молекулярной» визуализации; возможно сочетание «терапия плюс диагностика».

Прекрасное разрешение МРТ все же не дает возможности визуализировать молекулярные и клеточные процессы напрямую, хотя и предоставляет превосходную анатомическую информацию. По этой причине много усилий прилагается по разработке контрастных агентов, призванных косвенным способом, например за счет связывания с мишенью или изменения релаксационных свойств окружающих тканей благодаря специальным свойствам, изменить контраст изображения в случае, например, сверхэкспрессии определенного рецептора-биомаркера.

Вторая глава работы посвящена описанию как методик магнитно-резонансной томографии для визуализации и оценки процессов на клеточном уровне, так и других (вспомогательных) методик, таких как флуоресцентная микроскопия, эндоскопия, радиоизотопные исследования, иммуногистохимия и так далее. Изучение ангиогенеза, равно как и диагностика онкологических заболеваний и мониторинг состояния пациента после терапии требуют возможности визуализации значимых для этих процессов биомаркеров. В приведенных выше исследованиях мы разработали и провели предварительные испытания «умного» контрастного агента, позволяющего визуализировать расположенные на поверхности клетки рецепторы (на примере L6 – маркера карциномы и EGFR – маркера онко- и ангиогенеза). Во второй главе приводится описание принципа работы визуализирующей системы нового типа. Она состоит из двух конъюгатов для предварительной инъекции и олигомери-зующегося в их присутствии агента, который при этом изменяет контраст МР-изображения. Описаны синтез, очистка и испытания (как на клеточных культурах, так и на животных) этой системы. При клинических испытаниях анти-ангиогенных препаратов краеугольным камнем является неинвазивная и точная оценка эффекта их действия. Предложенный нами метод предполагает использование внутрисосудистого контрастного агента, который позволяет заметить регресс опухолевых сосудов на следующий день после единственной дозы препарата. Таким образом, ответ пациента на терапию может быть оценен на ранней стадии, что быстро позволяет установить целесообразность дальнейшей терапии. Суммируя все изложенное выше, во второй главе рассказывается о методах работы в области визуализации ангиогенеза и анти-ангиогенной терапии. Заметим, что приведенные методики МРТ применимы ко

многим другим заболеваниям (общая онкология, сердечно-сосудистые, неврология и так далее).

Результатами работы является, во-первых, применение оригинального метода по оценке эффекта анти-ангиогенной терапии и, во-вторых, разработка «умного» контрастного агента, способного селективно изменять релаксационные свойства ткани в присутствии определенного антигена (поверхностного рецептора, являющегося биомаркером какого-либо патологического процесса). Следует заметить, что в виду естественной низкой чувствительности МРТ даже самые изощренные методы могут быть нацелены только на визуализацию мишеней, экспрессируемых в большом количестве и доступных для агента. Конкретные числа зависят от релаксивности агента и его специфичности, однако, как правило, речь идет о сотнях тысяч – миллионе рецепторов на клетку (хотя огромные усилия исследователей направлены на расширение спектра потенциальных мишеней путем увеличения чувствительности контрастных агентов). Поскольку описанная здесь разработанная А. А. Богдановым и сотрудниками система магнитно-резонансной амплификации относится к так называемым «умным» пробам, то есть активируется только в присутствии белка-мишени, снимается вопрос о «фоновом» изменении контраста. Это большое преимущество, поскольку если мы наблюдаем изменение релаксивности, мы можем быть уверены, что это произошло именно благодаря специфическому процессу. Преимуществом также является малый размер самого контрастного агента (нет проблем с проникновением даже за пределы сосудов) и его фармако-кинетические свойства (схожие с повсеместно используемым в клинической практике препаратом Магневист). В перспективе эта система может применяться как для визуализации поверхностных рецепторов при различных патологиях, так и для мониторинга кластеров клеток (опухолевых, стволовых и так далее), модифицированных для экспрессии определенных маркеров, нехарактерных для окружающих органов. Великолепное анатомическое разрешение, отсутствие ионизирующего излучения и неинвазивность метода наряду с потенциалом визуализации процессов на молекулярном и клеточном уровне дают МРТ отличные перспективы в медицине будущего.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Folkman J.* Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 1971, v.285, No.21, pp.1182-1186.
2. *Tonini T., Rossi F., Claudio P.P.* Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*, 2003, v.22, pp.6549-6556.
3. *Carmeliet P.* Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.*, 2000, v. 6, No.4, pp.389-395.
4. *Нугматуллин Р.Т., Миниغازимов Ш.С.* Экспериментально-морфологические исследования стимулятора ангиогенеза. Реперативная хирургия, 2005, №1.
5. *Folkman J., Shing Y.* Angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 1992, v.267, No.16, pp.10931-10934.
6. *Carmeliet P.* Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 2005, v.438, No.7070, pp.932-936.
7. *Kerbel R.S.* Tumor angiogenesis: past, present and near future. *Carcinogenesis*, 2000, v.21, No.3, pp.505-515.
8. *Yancopoulos G., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J., Holash J.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 2000, v.407, pp.242-248.
9. *Carmeliet P., Jain R.K.* Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, v.407, No.6801, pp.249-257.
10. *Новак О.Е., Лисняк И.О., Чехун В.Ф.* Ангиогенез в развитии злокачественных опухолей: теоретические и практические аспекты. *Онкология*, 2002, v.4, No.4, pp.244-251.
11. *Бокерия А.А., Еремеева М.В.* Современные состояния и перспективы использования ангиогенеза в лечении ишемической болезни сердца. *Грудная и сосудистая хирургия*, 2000; № 2, с. 57-61.
12. *Gupta M.K., Qin R.Y.* Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J. Gastroenterol.*, 2003, v.9, No.6, pp.1144-1155.
13. *McDonald D.M., Choyke P.L.* Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat. Med.*, 2003, No.9, pp.713-725.

14. *Baish J.W., Jain R.K.* Fractals and cancer. *Cancer Res.*, 2000, v.60, pp.3683-3688.
15. *Jain R.* Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, 2003, v.9, No.6, pp.685-693.
16. *Morikawa S. et al.* Abnormalities of pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol.*, 2002, v.160, pp.985-1000.
17. *Brown E.B. et al.* In vivo measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy. *Nat. Medicine*, 2001, No.7, pp.864-868.
18. *Helmlinger G., Yuan F., Dellian M., Jain R.K.* Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Med.*, 1997, v.3, pp.177-182.
19. *Hanahan D., Folkman J.* Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, 1996, v.86, pp.353-364.
20. *O'Reilly M.S., Holmgren L., Chen C., Folkman J.* Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Med.*, 1996, No.2, pp.689-692.
21. *O'Reilly M.S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R.A., Moses M., Lane W.S., Cao Y., Sage E.H., Folkman J.* Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, v.79, pp.315-328.
22. *Hicklin D.J., Ellis L.M.* Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *J. Clin. Oncol.*, 1999, v.23, pp.1011-1027.
23. *Ferrara N.* Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney International*, 1999, v.56, pp.794-814.
24. *Carmeliet P. et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996, v.380, pp.435-439.
25. *Ferrara N. et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 1996, v.380, pp.439-442.

26. *Miquerol L., Langille B.L., Nagy A.* Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*, 2000, v.127, pp.3941-3946.
27. *Gerber H.P. et al.* VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 1999, v.126, pp.1149-1159.
28. *Alon T. et al.* Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Med.*, 1995, No.1, pp.1024-1028.
29. *Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M. et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 1983, v.219, pp.983-985.
30. *Leung D.W., Cachianes G., Kuan W.J., Goeddel D.V., Ferrara N.* Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 1989, v.246, pp.1306-1309.
31. *Millauer B., Wizigmann-Voos S., Schnurch H. et al.* High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 1993, v.72, pp.835-846.
32. *Decaussin M., Sartelet H., Robert C. et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J. Pathol.*, 1999, v.188, pp.369-377.
33. *Ferrer F.A., Miller L.J., Lindquist R. et al.* Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology*, 1999, v.54, pp.567-572.
34. *Price D.J., Miralem T., Jiang S. et al.* Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ.*, 2001, v.12, pp.129-135.
35. *Hiratsuka S., Minowa O., Kuno J. et al.* Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, v.95, pp.9349-9354.
36. *Dunk C., Ahmed A.* Vascular endothelial growth factor receptor-2-mediated mitogenesis is negatively regulated by vascular endothelial growth factor receptor-1 in tumor epithelial cells. *Am. J. Pathol.*, 2001, v.158, pp.265-273.

37. *Barleon B., Sozzani S., Zhou D.* et al. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*, 1996, v.87, pp.3336-3343.
38. *Chen W.S., Kitson R.P., Goldfarb R.H.* Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR- 1 (FLT-1). *In Vivo*, 2002, v.16, pp.439-445.
39. *Autiero M., Waltenberger J., Communi D.* et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.*, 2003, No.9, pp.936-943.
40. *Raman V., Artemov D., Pathak A.P., Winnard P.T. Jr, McNutt S., Yudina A., Bogdanov A.A. Jr, Bhujwala Z.M.* Characterizing vascular parameters in hypoxic regions: a combined magnetic resonance and optical imaging study of a human prostate cancer model. *Cancer Res.*, 2006, v.66, No.20, pp.9929-9936.
41. *Ciardiello F., Bianco R., Damiano V.* et al. Antiangiogenic and antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor C225 monoclonal antibody in combination with vascular endothelial growth factor antisense oligonucleotide in human GEO colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 2000, No.6, pp.3739-3747.
42. *Bruns C.J., Harbison M.T., Davis D.W.* et al. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin. Cancer Res.*, 2000, No.6, pp.1936-1948.
43. *Akagi M., Kawaguchi M., Liu W.* et al. Induction of neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor by epidermal growth factor in human gastric cancer cells. *Br. J. Cancer*, 2003, v.88, pp.796-802.
44. *Kumar R., Yarmand-Bagheri R.* The role of HER2 in angiogenesis. *Semin. Oncol.*, 2001, v.28, pp.27-32.
45. *Yang W., Klos K., Yang Y.* et al. ErbB2 overexpression correlates with increased expression of vascular endothelial growth factors A, C, and D in human breast carcinoma. *Cancer*, 2002, v.94, pp.2855-2861.
46. *Eller J.L., Longo S.L., Hicklin D.J.* et al. Activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme. *Neurosurgery*, 2002, v.51, pp.1005-1014.

47. *Yano S., Muguruma H., Sone S.* Non-small cell lung cancer: molecular-target therapy. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*, 2003, v.92, pp.318-323.
48. *Reinmuth N., Liu W., Fan F.* et al. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2002, v.8, pp.3259-3269.
49. *Akagi Y., Liu W., Zebrowski B.* et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res.*, 1998, v.58, pp.4008-4014.
50. *Dong J., Grunstein J., Tajada M.* et al. VEGF-null cells require PDGFR signaling mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *EMBO J.*, 2004, v.23, pp.2800-2810.
51. *Gately S.* The contributions of cyclooxygenase- 2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.*, 2000, v.19, pp.19-27.
52. *Yao M., Kargman S., Lam E.C.* et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res.*, 2003, v.63, pp.586-592.
53. *Tsuji M., Kawano S., Tsuji S.* et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 1998, v.93, pp.705-716.
54. *Копнин Б.П.* Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. *Биохимия*, 2000, т.65, с.5–33.
55. *Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M.* et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 1995, v.146, pp.1029-1039.
56. *Dvorak H.F.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.*, 2002, v.20, pp.4368-4380.
57. *Zachary I., Glikli G.* Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc. Res.*, 2001, v.49, pp.568-581.

58. *Zachary I.* Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2001, v.280, pp.C1375-C1386.
59. *Zhang H., Wu J., Meng L.* et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J. Gastroenterol.*, 2002, v.8, pp.994-998.
60. *Ferrara N.* VEGF: An update on biological and therapeutic aspects. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2000, v.11, pp.617-624.
61. *Bates D.O., Harper S.J.* Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul. Pharmacol.*, 2002, v.39, pp.225-237.
62. *Kumar R., Yoneda J., Bucana C.D.* et al. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int. J. Oncol.*, 1998, v.12, pp.749-757.
63. *Ferrara N., Davis-Smyth T.* The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.*, 1997, v.18, pp.4-25.
64. *Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J.* The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, 2003, No.9, pp.669-676.
65. *Gerber H., McMurtry A., Kowalski J.* et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival by the PI3-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.*, 1998, v.273, pp.30336-30343.
66. *Gerber H.P., Dixit V., Ferrara N.* Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 1998, v.273, pp.13313-13316.
67. *Бурлев В.А., Гаспаров А.С., Аванесян Н.С., Волков Н.И., Стыгар Д.А.* Факторы роста и их роль в регуляции репродуктивной функции у больных с синдромом поликистозных яичников. *Проблемы репродукции*, 1998, № 3, с.17-25.
68. *Alroy I., Yarden Y.* The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.*, 1997, v.410, pp.83-86.
69. *Ullrich A., Schlessinger J.* Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 1990, v.61, pp.203-212.

70. *Shoelson S.E.* SH2 and PTB domain interactions in tyrosine kinase signal transduction. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1997, No.1, pp.227-234.
71. *Prenzel N., Fischer O.M., Streit S., Hart S., Ullrich A.* The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr. Relat. Cancer*, 2001, No.8, pp.11-31.
72. *Davis R.J.* Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 2000, v.103, pp.239-252.
73. *Ballif B.A., Blenis J.* Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ.*, 2001, No.12, pp.397-408.
74. *D'Errico A., Barozzi C., Fiorentino M., Carella R., Di Simone M., Ferruzzi L.* et al. Role and new perspectives of transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) in adenocarcinoma of the gastro-oesophageal junction. *Br. J. Cancer*, 2000, v.82, pp.865-870.
75. *Yacoub L., Goldman H., Odze R.D.* Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor receptor, and MiB-1 expression in Barrett's-associated neoplasia: correlation with prognosis. *Mod. Pathol.*, 1997, No.10, pp.105-112.
76. *Humphrey P.A., Gangarosa L.M., Wong A.J., Archer G.E., Lund-Johansen M., Bjerkvig R.* et al. Deletion-mutant epidermal growth factor receptor in human gliomas: effects of type II mutation on receptor function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, v.178, pp.1413-1420.
77. *Moscatello D.K., Montgomery R.B., Sundareshan P., McDanel H., Wong M.Y., Wong A.J.* Transformational and altered signal transduction by a naturally occurring mutant EGF receptor. *Oncogene*, 1996, v.13, pp.85-96.
78. *Grunwald V., Hidalgo M.* Developing Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor for Cancer Treatment. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, v.95, No.12, pp.851-867.
79. *Baselga J., Arteaga C.L.* Critical Update and Emerging Trends in Epidermal Growth Factor Receptor Targeting in Cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2005, v.23, No.11, pp.2445-2459.

80. *Rubin M., Shin D., Pasmantier M. et al.* Monoclonal antibody (MoAb) IMC-225, an anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) for patients with EGFR-positive tumors refractory to or in relapse from previous therapeutic regimens. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2000, v.19, p.479a (abstr. 1860).
81. *Suri C. et al.* Requisite role of Angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 1996, v.87, pp.1171-1180.
82. *Stratmann A., Risau W., Plate K.H.* Cell type-specific expression of Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 1998, v.153, pp.1459-1466.
83. *Zagzag D. et al.* In Situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis. *Exp. Neurol.*, 1999, v.159, pp.391-400.
84. *Huang Z., Bao S-D.* Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J. Gastroenterol.*, 2004, v.10, No.4, pp.463-470.
85. *Hajitou A., Grignet C., Devy L., Berndt S., Blacher S., Deroanne C.F., Bajou K., Fong T., Chiang Y., Foidart J.M., Noel A.* The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a downregulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB J.*, 2002, v.16, pp.1802-1804.
86. *Griscelli F., Li H., Bennaceur-Griscelli A., Soria J., Opolon P., Soria C., Perricaudet M., Yeh P., Lu H.* Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, v.95, pp.6367-6372.
87. *Sun X., Kanwar J.R., Leung E., Lehnert K., Wang D., Krissansen G.W.* Angiostatin enhances B7.1-mediated cancer immunotherapy independently of effects on vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Gene Ther.*, 2001, No.8, pp.719-727.
88. *Dixelius J., Larsson H., Sasaki T., Holmqvist K., Lu L., Engstrom A., Timpl R., Welsh M., Claesson-Welsh L.* Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood*, 2000, v.95, pp.3403-3411.

89. *Jimenez B., Volpert O.V., Crawford S.E., Febbraio M., Silverstein R.L., Bouck N.* Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat. Med.*, 2000, No.6, pp.41-48.
90. *Folkman J.* Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.*, 1972, v.175, pp.409-416.
91. *Folkman J.* Successful treatment of an angiogenic disease. *N. Engl. J. Med.*, 1989, v.320, pp.1211-1212.
92. *Eskens F.* Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? *British Journal of Cancer*, 2004, v.90, No.1, pp.1-7.
93. *Фильченков А.А.* Апоптомодуляторы. Биомедицинская химия: Научно-практический журнал / НИИ биомедицинской химии РАМН (Москва), 2003, т.49, № 4, с.333-359.
94. *Hurwitz H., Fehrenbacher L., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Griffing S., Novotny W., Holmgren E., Kabbinavar F.* Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) prolongs survival in first-line colorectal cancer (CRC): results of a phase III trial of bevacizumab in combination with bolus IFL (irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin) as first-line therapy in subjects with metastatic CRC. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2003, abstract 3646.
95. *Folkman J.* Clinical applications of research on angiogenesis. *Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston*, v.333, No.26, pp.1757-1753.
96. *Dupont J., Camastra D., Gordon M., Mendelson D., Murren J., Hsu A., Lucarelli A., Cedarbaum J., Spriggs D.* A phase I study of VEGF trap in patients with solid tumors and lymphoma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2003; abstract 776.
97. *Posey J., Ng T., Yang B., Khazaeli M., Carpenter M., Fox F., Needle M., Waksal H., LoBuglio A.A.* Phase I study of anti-kinase insert domain-containing receptor antibody, IMC-1C11, in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2003; No. 9, pp.1323-1332.
98. *Степанова Е.В.* Антиангиогенная терапия: новые возможности лечения злокачественных заболеваний. *Практическая онкология*, 2002, т.3, № 4, с.246-252.

99. *Ma J., Pulfer S., Li S., Chu J., Reed K., Gallo J.M.* Pharmacodynamic-mediated reduction of temozolomide tumor concentrations by the angiogenesis inhibitor TNP-470. *Cancer Res.* 2001, v.61, pp.5491-5498.
100. *Murata R., Nishimura Y., Hiraoka M.* An antiangiogenic agent (TNP-470) inhibited reoxygenation during fractionated radiotherapy of murine mammary carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1997, v.37, pp.1107-1113.
101. *Jain R.* Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science*, 2005, v.307, pp.58-62.
102. *Miller C.J., Pien H.H., Sahani D., Sorensen A.G., Thrall J.H.* Imaging Angiogenesis: Applications and Potential for Drug Development. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005, v.97, No.3, pp.172-187.
103. *Petrovsky A., Schellenberger E., Josephson L., Weissleder R., Bogdanov A.A. Jr.* Near-infrared fluorescent imaging of tumor apoptosis. *Cancer Res.*, 2003, v.63, pp.1936-1942.
104. *Yudina A., Torres D., Bogdanov A.A.* Amplification Strategy for EGF Receptor Imaging: In Vitro Optimization. *Proc. 4th Mtg. SMI 2005*, Cologne.
105. *Bogdanov A.A. Jr, Kang H.W., Bennett D., Querol M., Yudina A., Verel I., Sotak C.* Tumor-targeted enzyme mediated MR signal amplification using paramagnetic substrates. *Proc. ISMRM-14*, 2006, No.685, p.153.
106. *Ринк П.А.* Магнитный резонанс в медицине // Основной учебник Европейского форума по магнитному резонансу.- М.: Геотар-Мед, 2003.
107. *Петрайкин А.В.* Изучение биофизических основ отека головного мозга методом магнитно-резонансной томографии. Дисс. канд. мед. наук.- М.: РГМУ, 1996.
108. *Коновалов А.Н., Корниенко В.Н., Пронин И.Н.* Магнитно-резонансная томография в нейрохирургии.- М.: Медицина, 1997.
109. *Bogdanov A. Jr., Weissleder R., Frank H.W. et al.* A new macromolecule as a contrast agent for MR angiography: preparation, properties, and animal studies. *Radiology*, 1993, v.187, pp.701-706.

110. *Bogdanov A. Jr., Marecos E., Cheng H.C. et al.* Treatment of experimental brain tumors with thrombospondin-1 derived peptides: an in vivo imaging study. *Neoplasia*, 1999, No.1, pp.438-445.
111. *Querol M. et al.* DTPA-bis-amide based MR sensor agents for peroxidase imaging. *Org. Lett.*, 2005, v.17, p.1719.
112. *Fransson A., Ericsson A., Jung B., Henriksson U.* Resolution of Biexponential Transverse Relaxation in Magnetic Resonance Imaging. *Phys. Med. Biol.*, 1989, v.34, No.3, pp.305-314.
113. *Анисимов Н.В., Пирогов Ю.А., Губский Л.В., Гладун В.В.* Управление контрастом и информационные технологии в магнитно-резонансной томографии.- М.: МГУ, 2005.
114. *Jones C.K.* Quantitative Multi-Component T_2 Analysis Using Fast Spin-Echo MRI// Master of science degree thesis, University of British Columbia, 1997.
115. *Shalinsky D.R., Brekken J., Zou H. et al.* Marked antiangiogenic and antitumor efficacy of AG3340 in chemoresistant human non-small cell lung cancer tumors: single agent and combination chemotherapy studies. *Clin. Cancer Res.*, 1999, No.5, pp.1905-1917.
116. *Kim Y., Yudina A., Figuereido J-L., Reichardt W., Hu-Lowe D., Petrovsky A., Kang, HW., Torres D., Mahmood U., Weissleder R., Bogdanov A.A. Jr.* Detection of Early Antiangiogenic Effects in Human Colon Adenocarcinoma Xenografts: In vivo Changes of Tumor Blood Volume in Response to Experimental VEGFR Tyrosine Kinase Inhibitor. *Cancer Res.*, 2005, v.65, No.20, pp.9253-9260.
117. *Funovics M.A., Weissleder R., Mahmood U.* Imaging enzyme activity and gene expression in vivo through a 2.7F catheter. *Radiology*, 2004, v.231, pp.659-666.
118. *Cox R.* AFNI: Software for analysis and visualization of functional magnetic resonance neuroimages. *Comput Biomed. Res.*, 1996, v.29, pp.162-173.
119. *Bremer C., Mustafa M., Bogdanov A.A. Jr, Ntziachristos V., Petrovsky A., Weissleder R.* Steady-State Blood Volume Measurements in Experimental Tumors with Different Angiogenic Burdens - A Study in Mice. *Radiology*, 2002, v.226, No.1, pp.214-220.
120. *Donahue K.M., Weisskoff R.M., Chesler D.A. et al.* Improving MR quantification of regional blood volume with intravascular T1 con-

trast agents: accuracy, precision, and water exchange. *Magn. Reson. Med.*, 1996, v.36, pp.858-867.

121. *Kim Y., Rebro K., Schmainda K.* Water exchange and inflow affect the accuracy of T1-GRE blood volume measurements: implication for the evaluation of tumor angiogenesis. *Magn. Reson. Med.*, 2002, v.47, pp.1110-1120.

122. *Юдина А., Керол М., Чен Д., Богданов А.А. мл.* Специфичный к миелопероксидазе контрастный МР-агент для определения активных атеросклеротических бляшек. *Медицинская физика*, 2005, № 4, с.50-53.

123. *Bogdanov A.A. Jr, Kang H.W., Querol M., Pretorius P.H., Yudina A.* Synthesis and testing of a binary catalytic system for imaging of signal amplification *in vivo*. *Bioconjug. Chem.*, 2007, v.18, No. 4, pp.1123-1130.

124. *Furman-Haran E., Margalit R., Grobgeld D., Degani H.* Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging reveals stress-induced angiogenesis in MCF7 human breast tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, v.93, pp.6247-6251.

125. *Demsar F., Roberts T.P., Schwickert H.C. et al.* A MRI spatial mapping technique for microvascular permeability and tissue blood volume based on macromolecular contrast agent distribution. *Magn. Reson. Med.*, 1997, v.37, pp.236-242.

Научное издание

*ЮДИНА Анна Юрьевна
БОГДАНОВ Алексей Алексеевич, мл.
ПИРОГОВ Юрий Андреевич*

**МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ
В ИЗУЧЕНИИ АНГИОГЕНЕЗА
И ЕГО МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ**

Под ред. проф. Ю.А. Пирогова

Подписано в печать 10.12.2008.
Формат 60х90/16. Объем 9 п.л.
Тираж 350 экз. Заказ №

Физический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова
119991 ГСП-1, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

Отпечатано в типографии МГУ