

# ЗНАЧИМОСТЬ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ -2578С>А И +936С>Т ГЕНА *VEGF* ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ИММУНОТЕРАПИИ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ

Хоченкова Ю.А., Чкадуа Г.З., Самойленко И.В., Маливанова Т.Ф., Михайлова И.Н., Демидов Л.В., Степанова Е.В.

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» РАМН, Москва, Россия

**Резюме.** Повышение уровня *VEGF* у онкологических больных может сопровождаться снижением числа дендритных клеток (ДК) и их функциональной активности. Проведено пилотное исследование взаимосвязи между частотой встречаемости аллельных вариантов гена *VEGF* в позициях -2578С>А (rs699947) и +936С>Т (rs3025039) и эффективностью иммунотерапии аутологичными ДК больных метастатической меланомой. Установлено, что под действием индукторов дифференцировки по мере созревания ДК экспрессия VEGFR-1 снижалась (от 18,9±0,7% на моноцитах периферической крови до 6,3±0,6% на зрелых ДК), а VEGFR-2 значимо не менялась (13,1±0,4% и 15,9±0,4% соответственно). Частота встречаемости генотипа АА участка -2578С>А (rs699947) гена *VEGF* составила 46,1%, АС – 38,5% и СС – 15,4%. Наличие генотипов АА и АС гена *VEGF* -2578С>А прямо коррелирует с продолжительностью времени до прогрессирования и эффективностью проводимого лечения. Медиана времени до прогрессирования составила 8,4 мес. у больных с АА и АС генотипом и 2,7 мес. у носителей СС генотипа (p = 0,002). Выявленные особенности могут быть использованы для оценки риска прогрессирования заболевания у больных метастатической меланомой, а также для оптимизации и персонализации проводимого лечения, в том числе и с использованием антиангиогенной терапии.

**Ключевые слова:** *VEGF*, SNPs, дендритные клетки, противоопухолевая иммунотерапия, метастатическая меланома

## Адрес для переписки:

Хоченкова Юлия Александровна  
младший научный сотрудник  
лаборатории биомаркеров  
и механизмов опухолевого  
ангиогенеза ФГБУ «Российский  
онкологический научный центр  
им. Н.Н. Блохина»  
115478, Россия, Москва, Каширское  
шоссе, 24.  
Тел.: 8 (499) 612-86-70.  
E-mail: julia\_vet@bk.ru

## Авторы:

Хоченкова Ю.А. – младший научный сотрудник, лаборатория биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза, ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия  
Чкадуа Г.З. – к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей, ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия  
Самойленко И.В. – к.м.н., научный сотрудник, отделение биотерапии опухолей, ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия  
Маливанова Т.Ф. – к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория онкогеномики, ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия  
Михайлова И.Н. – д.м.н., ведущий научный сотрудник, отделение биотерапии опухолей, ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия  
Демидов Л.В. – д.м.н., профессор, заведующий отделением биотерапии опухолей, ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия  
Степанова Е.В. – д.м.н., заведующая лабораторией биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия

Поступила 30.04.2013

Отправлена на доработку 22.05.2013

Принята к печати 19.06.2013

# SIGNIFICANCE OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS 2578C>A AND +936C>T IN THE VEGF GENE FOR EFFICIENCY EVALUATION OF ANTICANCER IMMUNOTHERAPY IN PATIENTS WITH METASTATIC SKIN MELANOMA

Khochenkova Yu.A., Chkadua G.Z., Samoilenko I.V., Malivanova T.F., Mikhailova I.N., Demidov L.V., Stepanova E.V.

*N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation*

**Abstract.** Increased *VEGF* levels in cancer patients may be associated with decreased number of dendritic cells (DCs) and lower DC function. We investigated whether *VEGF* gene polymorphisms -2578C>A (rs699947) and +936C>T (rs3025039) are associated with efficacy of autologous DC-based immunotherapy in patients with malignant melanoma. Evaluation of VEGFR-1 and VEGFR-2 expression on mature monocyte-derived DC revealed a decreased VEGFR-1 level ( $18.9 \pm 0.7\%$  on peripheral blood monocytes, as compared to  $6.3 \pm 0.6\%$  on mature DCs) and non-changed VEGFR-2 expression ( $13.1 \pm 0.4\%$  and  $15.9 \pm 0.4\%$ , respectively). The AA genotype frequency of -2578C>A (rs699947) polymorphism of *VEGF* gene was 46.1%. AC heterozygous state was found in 38.5%, and CC, in 15.4% of cases. The *VEGF* -2578 AC and AA genotypes were directly associated with progression-free survival and efficacy of treatment. The median progression-free survival of patients with -2578 AA and AC genotypes was a significantly longer (8.4 months), as compared with that of patients with CC genotypes (2.7 months),  $p = 0.002$ . The established relationship between genotype and efficacy of immunotherapy can be used to develop modern methods for predicting melanoma progression and to personalize immunotherapy including a combination with antiangiogenic therapy. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 6, pp 563-570)

*Keywords: VEGF, SNPs, dendritic cells, anticancer immunotherapy, metastatic melanoma*

## Address for correspondence:

Khochenkova Yulia A.  
Junior Research Associate, Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center  
115478, Russian Federation, Moscow, Kashirskoe rd., 24.  
Phone: 7 (499) 612-86-70.  
E-mail: julia\_yet@bk.ru

## Authors:

Khochenkova Yu.A., Junior Research Associate, Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation  
Chkadua G.Z., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Diagnostics and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation  
Samoilenko I.V., PhD (Medicine), Research Associate, Department of Cancer Biotherapy, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation  
Malivanova T.F., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Oncogenomics Federal State Budgetary Institution, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation  
Mikhailova I.N., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Cancer Biotherapy, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation  
Demidov L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Department of Cancer Biotherapy, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation  
Stepanova E.V., PhD, MD (Medicine), Chief, of Laboratory of Biomarkers and Mechanisms of Tumor Angiogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

Received 30.04.2013  
Revision received 22.05.2013  
Accepted 19.06.2013

## Введение

Метастатическая меланома кожи является агрессивной злокачественной опухолью со значительным потенциалом роста и метастазирования. Она нечувствительна к большинству современных режимов химиотерапии, что ставит вопрос о поиске новых методов лечения [2].

Как один из перспективных методов лечения больных метастатической меланомой рассматривают специфическую иммунотерапию. В настоящее время в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН идут клинические исследования эффективности противоопухолевой вакциноотерапии на основе аутологичных дендритных клеток (ДК). Эти клетки играют важную роль в индукции антиген-специфического Т-клеточного ответа и их считают перспективными для использования в иммунотерапии метастатических опухолей [18]. Действие таких противоопухолевых вакцин основано на усилении уже существующего противоопухолевого иммунного ответа, индукции иммунитета *de novo* или снижении имеющейся иммунологической толерантности. Однако, несмотря на доказанную эффективность такого подхода, не все больные отвечают на получаемую вакциноотерапию [3]. В среднем у 37% больных ДК-вакциноотерапия является эффективной в лечебном режиме и сопровождается адекватным иммунным ответом [1]. В некоторых случаях происходит активация механизмов, позволяющих опухолевым клеткам уходить от контроля иммунной системы [10]. Таким образом, возможность предсказания эффективности применяемой ДК-вакциноотерапии остается актуальной нерешенной проблемой клинической онкологии.

Большинство злокачественных новообразований, включая метастатическую меланому кожи, ассоциированы с гиперэкспрессией фактора роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, *VEGF*). Так, при I стадии заболевания клетки меланомы, экспрессирующие *VEGF*, составляют 32%, тогда как при наличии метастазов – 91% [16]. Увеличение числа *VEGF*-положительных опухолевых клеток ассоциировано с увеличением степени злокачественности опухоли и прогрессированием заболевания. В то же время повышение уровня *VEGF* у онкологических больных сопровождается снижением числа ДК и их функциональной активности [9, 12]. Некоторые однонуклеотидные полиморфизмы (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) гена *VEGF* ассоциированы с повышением содержания соответствующего белка в крови и коррелируют с увеличением риска развития и прогрессирования заболевания, а также устойчивостью опухолевых клеток к лечению [6, 11]. В настоящей работе мы оценили значимость двух наиболее часто встре-

чаемых полиморфизмов гена *VEGF* для прогнозирования эффективности иммунотерапии на основе ДК у больных метастатической меланомой. Был определен уровень экспрессии рецепторов к *VEGF* на различных стадиях созревания и дифференцировки ДК, а также изучена взаимосвязь между аллельными вариантами SNPs -2578C>A (rs699947) и +936C>T (rs3025039) гена *VEGF* и эффективностью проводимой иммунотерапии ДК.

## Материалы и методы

### Клиническая характеристика группы больных

В работе использованы результаты клинических наблюдений за 13 пациентами с метастатической меланомой, находившихся на лечении в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН с 2009 по 2013 г. Данная группа больных получала противоопухолевую иммунотерапию на основе аутологичных ДК, нагруженных опухолевыми антигенами *in vitro*. Вакциноотерапию проводили как в терапевтическом, так и в адьювантном режиме. У большинства пациентов до начала вакциноотерапии было отмечено прогрессирование на фоне различных режимов химиотерапии.

Больным было проведено 127 вакцинаций (от 3 до 23 введений, в среднем  $9,8 \pm 6,0$ ). ДК прививали внутрикожно в несколько точек (от 2 до 10) в непосредственной близости от регионарных лимфатических коллекторов, однократная доза варьировалась от  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^6$  ДК. Интервал между инъекциями был от 2 до 6 недель в зависимости от состояния конкретного больного.

### Культивирование дендритных клеток

ДК получали согласно методике, разработанной ранее в НИИ ЭДитО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» РАМН [4]. Для этого мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли по стандартной методике путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция),  $r = 1,077$ . Затем прикрепившиеся к пластику моноциты культивировали в полной среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 80 нг/мл GM-CSF (Shering-Plough, США) и 10 нг/мл IL-4 (R&D Systems, США). На седьмые сутки к полученным незрелым ДК добавляли полную среду RPMI-1640, содержащую 200 нг TNF $\alpha$  (MP Biomedicals, США) и 2,5 мкг ПГЕ $_2$  (MP Biomedicals, США). ДК нагружали меланомными антигенами путем добавления к ним опухолевого лизата на 2 часа. Для чего опухоль пациента механически измельчали и полученную клеточную суспензию замораживали и оттаивали 3 раза, помещая ампулу с клетками в жидкий азот или в теплую воду соответственно. Разрушенные клетки осаждали центрифугированием (2 мин при 12 000 g), надосадочную жидкость собира-

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПРАЙМЕРОВ И ЭНДОНУКЛЕАЗЫ РЕСТРИКЦИИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ПЦР И ПОСЛЕДУЮЩЕЙ РЕСТРИКЦИИ ПОЛУЧЕННЫХ ПРОДУКТОВ

Праймеры	Эндонуклеаза рестрикции
VEGF -2578C>A F5'-ATAAGG GCC TTA GGA CAC CA-3' R5'-GCT ACT TCT CCA GGC TCA CA-3'	Bgl II (SibEnzyme, Россия)
VEGF +936C>T F5'-AGG GTT TCG GGAACC AGA TC-3' R5'-CTC GGT GAT TTA GCA GCA AG-3'	Fae I (SibEnzyme, Россия)

ли, стерилизовали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

#### Иммунофенотипирование дендритных клеток

Фенотип клеток определяли методом прямой иммуноцитофлуоресценции с коммерческими моноклональными антителами к поверхностным антигенам: CD40 (Caltag, США), CD54 (Caltag, США), CD80 (Dako, Дания), CD83 (Caltag, США), CD86 (Pharmingen, США), HLA-ABC (BD Biosciences, США), и HLA-DR (BD Biosciences, США), конъюгированными с флуоресцентными метками FITC или PE. Для оценки экспрессии рецепторов VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (KDR/Flk-1) использовали соответствующие МКА, меченные FITC (R&D Systems, США).

Анализ иммунофенотипа клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Полученные данные обрабатывали с помощью программы «WinMDI 2.8» (Scripps Institute, La Jolla, США).

#### Анализ SNPs -2578C>A и +936C>T гена VEGF

Образцы геномной ДНК экстрагировали из лейкоцитов периферической крови больных с использованием набора реактивов для выделения и очистки нуклеиновых кислот QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно протоколу фирмы-производителя. Анализ полиморфизмов проводили с использованием ПЦР и последующей рестрикцией полученных продуктов. Для амплификации гена VEGF по полиморфизмам -2578C>A и +936C>T использовали последовательности праймеров и условия реакции, предложенные ранее (табл. 1) [11, 14].

Учет результатов реакций осуществляли методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле с последующей визуализацией полученных результатов в ультрафиолетовом свете.

#### Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили на персональном компьютере с использованием программы «GraphPad Prism 5» (для Windows XP). Для проверки достоверности различий значений признаков в группах использовали метод «хи-квадрат» ( $\chi^2$ ) с поправкой Фишера. Различия считались статистически достоверными при

$p < 0,05$  (95% точности). Кривые выживаемости до прогрессирования строили методом Каплана–Мейера. Сравнение двух кривых выживаемости проводили с помощью логранкового критерия.

## Результаты

### Экспрессия рецепторов к VEGF при дифференцировке и созревании ДК *in vitro*

На первом этапе исследования мы проанализировали экспрессию рецепторов к VEGF (VEGFR-1 и VEGFR-2) на ДК разной степени дифференцировки. В процессе культивирования прикрепившиеся моноциты увеличивались в размере и приобретали характерную отростчатую форму. На 7-е сутки клетки приобретали иммунофенотип незрелых ДК (нДК), которые экспрессировали поверхностные антигены: CD40, CD54, CD86, HLA-ABC и HLA-DR.

После полной замены среды и последующего внесения индукторов дифференцировки (TNF $\alpha$  и ПГЕ $_2$ ) происходило созревание ДК, выражавшееся в приобретении гранулярности, увеличении количества дендритов на клетке. Происходило увеличение экспрессии адгезионных и ко-стимулирующих молекул CD54, CD40, CD80, CD86 и маркера дифференцировки ДК CD83. Уровень экспрессии маркеров HLA-ABC и HLA-DR в процессе созревания ДК практически не изменялся (табл. 2).

Количество клеток, позитивных по VEGFR-1 и VEGFR-2, определяли с помощью проточной цитофлуориметрии (табл. 3). Мы установили, что экспрессия VEGFR-1 снижается по мере созревания ДК из моноцитов под действием индукторов дифференцировки. Тогда как экспрессия VEGFR-2 значимо не менялась.

### Эффективность иммунотерапии и однонуклеотидные полиморфизмы гена VEGF

Мы оценили эффективность иммунотерапии ДК в зависимости от генотипов VEGF: -2578C>A (rs699947) и +936C>T (rs3025039).

Частота встречаемости генотипа AA участка -2578C>A (rs699947) гена VEGF составила 46,1%, AC – 38,5% и CC – 15,4%. Такое распределение

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ НА ДК РАЗНЫХ СТАДИЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ (M±m)

Типы клеток	Экспрессия маркеров, % клеток						
	CD40	CD54	CD80	CD83	CD86	HLA-ABC	HLA-DR
нДК	97,3±1,5	98,3±1,1	12,1±5,4	5,7±2,2	87,5±3,3	99,0±0,7	99,6±0,3
зДК	99,1±0,6	99,3±0,2	91,6±7,3	88,9±9,4	99,1±0,7	99,3±0,4	99,2±0,7

ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ VEGFR-1 И VEGFR-2 НА ДК РАЗНЫХ СТАДИЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ (M±m)

Типы клеток	Экспрессия рецепторов, % клеток	
	VEGFR-1	VEGFR-2
МПК	18,9±0,7	13,1±0,4
нДК	7,6±0,5*	14,7±0,6
зДК	6,3±0,6*	15,9±0,4

Примечание.\* – различия в экспрессии являются достоверными по сравнению с МПК (p < 0,05).

генотипов не отличалось от ожидаемого распределения по Hardy–Weinberg и от представленного ранее другими авторами распределения [14]. При анализе SNP +936C>T (rs3025039) все 13 больных имели генотип CC, поэтому клиническая значимость этого полиморфизма изучена не была.

Девять больных (69,2%) получали вакцинацию в терапевтическом режиме. Инъекции проводили каждые 2-6 недель до прогрессирования заболевания. Среднее число инъекций противоопухолевой ДК вакцины было сходным в случае AA и AC генотипов (11,75±7,7 и 12,7±6,7 соответственно) (рис. 1). Тогда как у 2-х пациентов с выявленным генотипом CC до начала прогрессирования было проведено только 5 вакцинаций (p > 0,05).

Нами было установлено, что среди больных злокачественной меланомой, получавших иммунотерапию на основе ДК, носители AA

и AC генотипов гена VEGF 2578C>A отличаются увеличением времени до прогрессирования, по сравнению с носителями CC генотипа (рис. 2). Медиана времени до прогрессирования составила 8,4 мес. и 2,7 мес. соответственно (p = 0,002).

## Обсуждение

По нашим и другим данным, зДК моноцитарного происхождения экспрессируют оба изученных рецептора: VEGFR-1 и VEGFR-2 [13]. Появление VEGFR-1 на поверхности CD34-положительных гемопоэтических стволовых клеток считают характерным признаком дифференцировки по моноцитарно-макрофагальному направлению. VEGF привлекает моноциты крови в очаг воспаления и/или роста сосудов через взаимодействие с VEGFR-1 [8], в то время как в тканевых макрофагах VEGFR-1 и VEGFR-2 опосредуют хемотаксическую активность [19]. Поэтому сни-

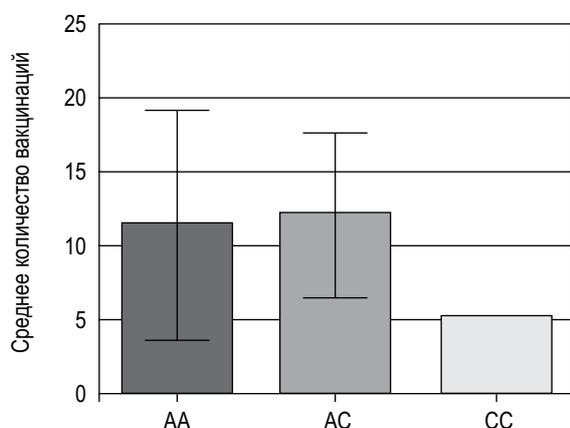


Рисунок 1. Количество вакцинаций до прогрессирования заболевания в зависимости от аллельного состава гена VEGF -2578C>A (rs699947)

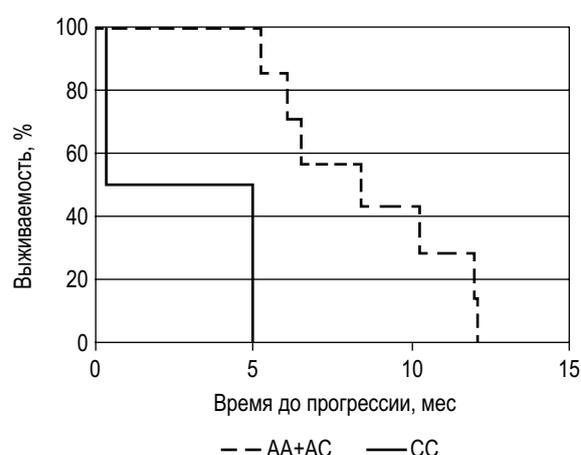


Рисунок 2. Зависимость прогрессирования заболевания от полиморфизма VEGF -2578C>A (rs699947)

жение экспрессии VEGFR-1 на зДК может быть связано со снижением миграционной активности ДК, т.к. в отличие от циркулирующих моноцитов, которые могут переходить из кровеносного русла в ткани, зрелые клетки располагаются во вторичных лимфоидных органах и выполняют иммуностимулирующие функции. Считают, что созревание ДК подавляется при связывании VEGF с VEGFR-1 [7], а функциональная активность зДК угнетается при взаимодействии VEGF – с VEGFR-2 [13]. Было показано, что в присутствии VEGF в зДК снижается экспрессия ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86, молекулы HLA-DR [5].

Таким образом, зДК, используемые для вакцинации больных метастатической меланомой, экспрессируют VEGFR-2 и могут быть чувствительны к ингибирующим эффектам VEGF в крови и ткани опухоли. Нельзя исключать, что эффективность иммунотерапии может зависеть от уровня VEGF, который угнетает функциональную активность ДК. Ранее многими исследователями было показано, что синтез белка VEGF и его концентрация в известной степени зависит от наличия однонуклеотидных замен в кодирующем его гене [15, 17].

Нами показано, что больных АА и АС генотипов гена VEGF 2578С>А можно эффективно лечить иммунотерапией ДК по сравнению с носителями СС. Мы объясняем этот результат возможной высокой концентрацией сывороточного VEGF у носителей С-аллеля [17]. SNP-2578С>А, локализованный в промоторной области гена VEGF, прямо коррелирует с концентрацией белка в сыворотке крови [17]. Его уровень был значительно ниже у пациентов с гомозиготным генотипом АА в сравнении с носителями С-аллеля (СС и СА генотип).

У всех 13 пациентов, включенных в данное исследование, было выявлено носительство

гомозиготного СС генотипа VEGF +936С>Т (rs3025039), частота встречаемости которого, по результатам различных исследований, составляет более 70% [15, 17]. Однако полученные другими исследователями данные свидетельствуют об актуальности проведения дальнейших исследований данного SNP при условии увеличения выборки группы больных. Так, ранее было установлено, что наличие Т-аллели у здоровых доноров было связано со значительным снижением VEGF в плазме крови [15]. Тогда как наличие С-аллели было ассоциировано с увеличенным синтезом VEGF и быстрым прогрессированием заболевания [6, 11].

Таким образом, результаты нашего пилотного исследования свидетельствуют о важности дальнейшего анализа комбинаций полиморфных вариантов гена VEGF для предсказания эффективности проводимой вакцинотерапии аутологичными ДК. Для подтверждения полученных данных по полиморфизму 2578С>А и поиска новых перспективных SNP-маркеров планируется дальнейшее расширение групп больных, получающих данный вид иммунотерапии.

Разработка новых подходов к комбинированию иммунотерапии с препаратами, блокирующими VEGF рецептор-лигандную систему, является актуальной и перспективной. Выявленные особенности могут быть также использованы для разработки современных методов прогнозирования развития рецидивов у больных метастатической меланомой, а также для оптимизации и персонализации проводимого лечения, в том числе и с использованием антиангиогенной терапии.

Работа поддержана Министерством образования и науки РФ (соглашение № 8151 от 24.08.2012 г.).

## Список литературы

1. Балдуева И.А., Новик А.В., Моисеенко В.М., Нехаева Т.Л., Данилова А.Б., Данилов А.О., Проценко С.А., Петрова Т.Ю., Улейская Г.И., Щекина Л.А., Семенова А.И., Михайличенко Т.Д., Телегаева Г.М., Жабина А.С., Волков Н.В., Комаров Ю.И. Клиническое исследование (II фаза) вакцины на основе аутологичных дендритных клеток с иммунологическим адъювантом у больных с меланомой кожи // Вопросы онкологии. – 2012. – Т. 58. – С. 212-221.
2. Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю. Меланома кожи: стадирование, диагностика и лечение // Русский медицинский журнал. – 2003. – № 1. – С. 112–117.
3. Михайлова И.Н., Петенко Н.Н., Чкадуа Г.З., Вишнякова Л.Ю. Вакцинотерапия метастатической меланомы с использованием дендритных клеток: клиническое исследование I/II фазы // Российский биотерапевтический журнал. – 2007. – № 6. – С. 39-44.
4. Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А., Тамаева З.Э., Огородникова Е.В., Жордания К.И., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – № 3. – С. 56-62.

Ссылки 5-19 см. в References (стр. 569-570). See References for numbers 5-19 at pp. 569-570.

## References

1. Baldueva I.A., Novik A.V., Moiseenko V.M., Nekhaeva T.L., Danilova A.B., Danilov A.O., Protsenko S.A., Petrova T.Yu., Uleyskaya G.I., Shchekina L.A., Semenova A.I., Mikhaylichenko T.D., Teletaeva G.M., Zhabina A.S., Volkov N.V., Komarov Yu.I. Klinicheskoe issledovanie (II faza) vaksiny na osnove autologichnykh dendritnykh kletok s immunologicheskim adyuvantom u bol'nykh s melanomoy kozhi [The results of second-phase clinical trial of autologous dendritic cells vaccine with immunologic adjuvant in cutaneous melanoma patients]. *Voprosy onkologii – Questions of Oncology*, 2012, vol. 58, pp. 212-221.
2. Demidov L.B., Harkevich G.Yu. Melanoma kozhi: stadirovaniye, diagnostika i lecheniye [Skin Melanoma: staging, diagnostics and treatment]. *Russkiy meditsinskiy zhurnal – Russian Medical Journal*, 2003, no. 11, pp. 112-117.
3. Mikhailova I.N., Petenko N.N., Chkadua G.Z., Vishnyakova L.Yu. Vaksinoterapiya metastaticheskoy melanomy s ispol'zovaniem dendritnykh kletok: klinicheskoe issledovanie I/II fazy [Dendritic cell vaccine therapy of advanced melanoma: I/II phase clinical trial]. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal – Russian Journal of Biotherapy*, 2007, no. 6, pp. 39-44.
4. Chkadua G.Z., Zabortina T.N., Burkova A.A., Tamaeva Z.E., Ogorodnikova E.V., Zhordania K.I., Kadagidze Z.G., Baryshnikov A.Yu. Adaptirovaniye metodiki kul'tivirovaniya dendritnykh kletok cheloveka iz monotsitov perifericheskoy krovi dlya klinicheskogo primeneniya [The adaptation of method of generating monocyte derived human dendritic cells for clinical practice]. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal – Russian Journal of Biotherapy*, 2002, no. 3, pp. 56-62.
5. Alfaro C., Suarez N., Gonzalez A., Solano S., Erro L., Dubrot J., Palazon A., Hervas-Stubbs S., Gurrpide A., Lopez-Picazo J.M., Grande-Pulido E., Melero I., Perez-Gracia J.L. Influence of bevacizumab, sunitinib and sorafenib as single agents or in combination on the inhibitory effects of VEGF on human dendritic cell differentiation from monocytes. *Br. J. Cancer*, 2009, vol. 100, pp. 1111-1119.
6. Awata T., Kurihara S., Takata N., Neda T., Iizuka H., Ohkubo T., Osaki M., Watanabe M., Nakashima Y., Inukai K., Inoue I., Kawasaki I., Mori K., Yoneya S., Katayama S. Functional VEGF C-634G polymorphism is associated with development of diabetic macular edema and correlated with macular retinal thickness in type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, vol. 333, pp. 679-685.
7. Dikov M.M., Ohm J.E., Ray N., Tchekneva E.E., Burlison J., Moghanaki D., Nadaf S., Carbone D.P. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J. Immunol.*, 2005, vol. 174, pp. 215-222.
8. Eubank T.D., Roberts R., Galloway M., Wang Y., Cohn D.E., Marsh C.B. GM-CSF induces expression of soluble VEGF receptor-1 from human monocytes and inhibits angiogenesis in mice. *Immunity*, 2004, vol. 21, pp. 831-842.
9. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, vol. 2, pp. 795-803.
10. Hamai A., Benlalam H., Meslin F., Hasmim M., Carr T., Akalay I., Janji B., Berchem G., Noman M.Z., Chouaib S. Immune surveillance of human cancer: if the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune? *Tissue Antigens*, 2010, vol. 75, pp. 1-8.
11. Han S.W., Kim G.W., Seo J.S., Kim S.J., Sa K.H., Park J.Y., Lee J., Kim S.Y., Goronzy J.J., Weyand C.M., Kang Y.M. VEGF gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2004, vol. 43, pp. 1173-1177.
12. Hayashi T., Hideshima T., Akiyama M., Raje N., Richardson P., Chauhan D., Anderson K.C. *Ex vivo* induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood*, 2003, vol. 102, pp. 1435-1442.
13. Mimura K., Kono K., Takahashi A., Kawaguchi Y., Fujii H. Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunol Immunother.*, 2007, vol. 56, pp. 761-770.
14. Nasr H.B., Chahed K., Bouaouina N., Chouchane L. Functional vascular endothelial growth factor 2578 C/A polymorphism in relation to nasopharyngeal carcinoma risk and tumor progression. *Clinica Chimica Acta*, 2008, vol. 395, pp. 124-129.
15. Renner W., Kotschan S., Hoffmann C., Obermayer-Pietsch B., Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J. Vasc. Res.*, 2000, vol. 37, no. 6, pp. 443-448.
16. Salven P., Heikkil P., Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. *Br. J. Cancer*, 1997, vol. 76, pp. 930-934.

17. Steffensen K.D., Waldstrom M., Brandslund I., Jakobsen A. The relationship of VEGF polymorphisms with serum VEGF levels and progression-free survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 2010, vol. 117, pp. 109-116.
18. Steinman RM. Dendritic cells *in vivo*: a key target for a new vaccine science. *Immunity*, 2008. vol. 29, pp. 319-324.
19. Yang Z.F., Poon R.T., Luo Y., Cheung C.K., Ho D.W., Lo C.M., Fan S.T. Up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in small-for-size liver grafts enhances macrophage activities through VEGF receptor 2-dependent pathway. *J. Immunol*, 2004, vol. 173, pp. 2507-2515.