

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ  
И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ

ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

**А.И. Рукавишников**

**АЗБУКА РАКА**

Рекомендуется учебно-методическим объединением по медицинскому  
и фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного  
пособия для студентов, обучающихся по специальности 040400 –  
Стоматология.

Издательство Волгоградского государственного медицинского университета

2007

А.И. Рукавишников

Азбука рака. – Волгоград: Изд-во Волг. гос. мед. ун-та. – 2007. – 360 с.:

ил.

Учебное пособие посвящено диагностике и лечению солидного рака на основе его причины – раковой клетки.

В главах рассматриваются современные знания о канцерогенезе и его источниках, свойства раковой клетки и их молекулярные причины в сравнении с нормальной клеткой того же типа.

На этой основе излагаются современные методы ранней диагностики раковых клеток и их ликвидации – методы уничтожения и реверсии раковых клеток.

Учебное пособие предназначено для студентов стоматологического факультета медицинских вузов и университетов. Оно может быть полезно для врачей-онкологов.

#### Рецензенты:

А.В. Лепилин – заведующий кафедрой хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Саратовского государственного медицинского университета, д.м.н., профессор.

М.П. Водолацкий – заведующий кафедрой челюстно-лицевой хирургии и стоматологии детского возраста Ставропольской государственной медицинской академии, д.м.н., профессор.

Печатается по решению ЦМС Волгоградского государственного медицинского университета.

УДК 616 – 006.6 (075)

ББК 55.6 я 7

А.И. Рукавишников  
Волгоградский государственный медицинский университет, 2007

## **Введение**

Согласно концепции Р. Вирхова (1821–1902), любая болезнь начинается с патологии клетки или клеток.

Что есть «патология» клетки, оставалось неясным до 1953 г. XX века, когда была раскрыта структура молекулы ДНК. Тогда на примере одного свойства клетки – деления её на две дочерние клетки, было впервые обнаружено, что это свойство создается репликацией молекулы ДНК. Иными словами, репликация ДНК – это молекулярная причина, а деление клетки – следствие этой причины. Этим был открыт путь к молекулярной медицине.

Но переход медицины на молекулярный уровень начался с расшифровки генома человека – с открытия структуры генов, их количества и места в хромосомах клетки, а также с началом протеомики – науки о белках, их строении и функциях.

Уже в 2000 г. акад. А.И. Арчаков впервые разделил все болезни на две группы на основе того факта, что все болезни возникают «от генов». Первая группа – наследственные, – от дефекта гена или генов в клетке, а вторая – ненаследственные болезни, – от изменения экспрессии гена или генов.

Однако, ген – это только «схема», по которой синтезируются его продукты – иРНК и белки. Но именно белки создают все свойства или функции клетки каждого типа. Позднее в некодирующих белок участках ДНК были открыты гены и их продукт – малые РНК или интерферирующие РНК (РНКи). Они осуществляют контроль экспрессии обычных генов в клетке: РНКи связывается с копией гена, т.е. иРНК, и затем фермент ее разрушает, – так выключается ген.

Познание всего этого и совершило революцию в медицине – она начала переход на молекулярный уровень: клетка – это место болезни, а причина болезни внутри клетки – на уровне молекул, т.е. генов и их продуктов. То есть «патология» клетки Р. Вирхова теперь раскрыта – это изменения в обычном ге-

не или генах и их продуктах – иРНК и их белках, а также в генах и их продукте – малые РНК в клетке.

Теперь учёные стремятся скорее выяснить гены-причины и белки-причины в соответствующей клетке, вызывающие конкретную болезнь человека. На этой основе они готовятся «радикально изменить средства и методы ранней диагностики и лечения каждой болезни, в том числе, рака».

До сих пор многие болезни и рак начинают лечить после того, как болезнь проявляется симптомами. При этом объектом воздействий лечебных средств и лекарств оказываются не причины болезней, а их симптомы.

Но термин «рак» не выражает ни причины и ни сущности этой, самой древней и опасной для жизни человека болезни. В учебном пособии рассматривается солидный рак; часто такой рак представляют как одно целое.

Поэтому в раке важно различать, что является его причиной, а что – её следствием. Причиной является раковая клетка, а следствием – это колония из нее клеток-потомков, т.е. рак. При этом каждая раковая клетка от включения в ней гена теломеразы – бессмертная и является самостоятельным одноклеточным организмом, т.е. клетка-организм.

Но солидный рак – не одно целое: часть его клеток образует скопления в виде первичной опухоли и метастазов – это симптомы рака; часть клеток мигрирует в окружающие ткани, разрушают их, и занимает их места, а часть через кровь и лимфу расселяется по организму, где из них в различных органах образуются метастазы.

Клетки солидного рака расселяются по всему организму через кровь и лимфу очень рано – при узелке из раковых клеток в тканях размером 2 мм. Это означает, что с этого момента рак уже становится болезнью всего организма, т.е. системным.

Расселение раковых клеток по организму во многом сходно с распространением бактерий при инфекциях, которое также регулируется генами. Но бактерия – прокариот и извне. Раковая клетка – это тоже организм, но эукариот и из клетки своего организма-хозяина.

При инфекциях первым этапом является диагностика возбудителя и его типа в организме пациента. Вторым этапом является лечение, которое сводится к уничтожению каждой клетки-возбудителя. То есть, действуя на причину – бактерию, ликвидируется само собой и ее следствие – инфекция.

Из того, что рак – не одно целое, а каждая его клетка – это клетка-организм, то для пациента опасен вовсе не рак, а его раковые клетки.

Акад. Н.Н. Петров (1947) – основатель отечественной онкологии, выражал это так: «рак целиком заключается в раковых клетках; удалить или сжечь их без остатка, значит вылечить больного».

Акад. В.А. Кордюм (1998) писал: «убрать бы все раковые клетки из организма, все до единой, и болезнь бы ушла».

Проф. А.С. Соболев (2002) также говорит: «убить бы все раковые клетки до единой и ни одной не оставить для потомства».

Отсюда следует, что объектом для методов диагностики и лечения должны быть не симптомы рака, а его раковые клетки. То есть принципы диагностики и лечения рака должны быть такими же, что и при бактериальной инфекции. Не зря третьей мишенью химиотерапии после бактерий и вирусов, стали раковые клетки. Так как рак не одно целое, а расселяющиеся по всему организму без конца и границ потомки раковой клетки, то лечение от рака также должно сводиться к ликвидации каждой раковой клетки и тогда рак ликвидируется сам собой.

Так как причина и сущность рака, все трудности диагностики и излечения от рака «закljučаются» не в раке, а в его раковых клетках, то это и явилось для нас основанием назвать учебное пособие – «Азбука рака».

В истории познание рака шло в направлении – от рака к его причине, т.е. к раковой клетке. Это же привело к созданию существующих до сих пор методов диагностики и лечения – симптомов солидного рака, а не его причины – раковой клетки и её потомков.

Отставание науки об отличиях раковой клетки от нормальной клетки того же типа до последнего десятилетия XX века, не позволяло разрабатывать мето-

ды ранней диагностики раковых клеток и методы их избирательной ликвидации.

Основными методами лечения солидного рака во многих странах и в нашей стране являются: хирургический метод, лучевое лечение и химиотерапия.

Объектом лечения первых двух методов являются симптомы рака – первичный рак, метастазы и рецидив рака, но не раковые клетки, распространяющиеся за пределами границ операционного поля или лучевого воздействия и те, которые расселяются без конца и границ по всему организму пациента.

Если хирургическим методом часто сразу можно удалить из организма пациента множество раковых клеток иссечением первичного рака и его метастазов, то лучевое лечение, если убивает, то лишь часть раковых клеток.

Объектом стандартной химиотерапии являются раковые клетки, т.е. то, что и нужно уничтожать. Но она бессильная, так как стандартные лекарства сами по себе не отличают раковую клетку от нормальной клетки. Незнание молекулярных причин свойств раковой клетки препятствовало созданию лекарств и разработке других средств, избирательно уничтожающих раковые клетки, не затрагивая здоровых клеток.

По этим причинам во всех странах смертность от рака, несмотря на лечение стандартными методами, большая и пока нет её снижения.

В странах мира:

проф. Д. Фелшер (D. Felsher, 2002) пишет: «рак поражает каждого третьего человека, а умирает каждый пятый от этой болезни»;

проф. У. Гиббс (2003) отмечает:

- «девять из десяти раковых больных погибают»;

- «к несчастью, когда у больного диагностируют рак, метастазы уже присутствуют; прогноз для таких больных неутешителен»;

проф. Л. Леб (L.A. Loebl, 2003) подчёркивает, что «в любой опухоли, насчитывающей 100 млн. клеток, всегда найдется одна, в которой произошла мутация, защищающая эту клетку от любого препарата. Можно рассчитывать

только на то, что удастся сдержать рост опухоли. Вылечивать больных от рака мы пока не умеем».

Что удалось достичь к настоящему времени в странах при объекте – рак и стандартных методах его диагностики и лечения? Ответ дан в работе А.В. Лихтенштейн, Г.И. Потаповой (2005) из НИИ канцерогенеза, Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва. В ней авторы на основе своих исследований и исследований зарубежных ученых характеризуют сложившуюся к настоящему времени ситуацию в онкологии так:

- имеется «разительный контраст между впечатляющим прогрессом в фундаментальных исследованиях, и практическим отсутствием достижений в клинической онкологии: смертность от основных форм рака сегодня примерно та же, что и 30-50 лет назад»;

- M.B. Sporn, N. Suh (2002), C. Leaf (2004) объясняют это следствием стратегического просчета: «клиницисты и тогда, и сегодня считают заслуживающей врачебного вмешательства только уже сформировавшийся рак. Но такая практика «устранения последствий» столь же мало эффективна, как и лечение, например, уже случившегося инфаркта миокарда или инсульта»;

- «в основе такого просчета лежит представление о раке как о сугубо локальном процессе». В ткани из возникшей раковой клетки вначале возникает клон всего лишь из нескольких клеток. Такой очаг рака обычно считают «исчезающе малой мишенью, что лишает, казалось бы, смысла на этой стадии процесса любые терапевтические и диагностические мероприятия». Однако авторы статьи считают, «что представленная картина не соответствует действительности и что на самом деле задолго до наступления клинической фазы рака существует реальная мишень для превентивных мер»;

- «устоявшаяся к настоящему моменту времени практика сводится к тому, что основные диагностические и терапевтические усилия направлены соответственно на выявление и уничтожение уже существующего опухолевого очага. Иными словами, борьба со злокачественной опухолью начинается в момент, когда «битва» уже в значительной степени проиграна».

- исходя из этого, авторы считают, что «более благодарной мишенью для терапевтических воздействий является предшествующий раку массив мутантных клеток, не обладающих еще всеми свойствами злокачественности»; «мутантные клетки», не обладающие свойствами раковой клетки, – это предраковые клетки, – Прим. – А.Р.

- всё более актуальным «является необходимость концентрации противораковых усилий на превентивных мерах, способных либо обратить вспять процесс канцерогенеза, либо затормозить его настолько, чтобы отодвинуть момент появления рака за пределы естественных жизненных сроков» (M.B. Sporn, N. Suh, 2002).

Из следствий «просчёта» вытекает необходимость смены объекта для методов диагностики и лечения рака. Вместо рака, т.е. следствия, объектом для обеих целей должна быть его причина, т.е. раковая клетка и её потомки.

Достижения молекулярной, т.е. генной медицины уже сейчас позволяют начать диагностику и лечение многих болезней задолго до их симптомов. Цель этой медицины – не ликвидация симптомов болезни, а устранение её причины. Для рака это означает два уровня: «до начала» – это предраковые клетки, которые имеет опухолевый генотип, но нормальный фенотип, и «начало» – раковая клетка и её первые потомки.

Для уничтожения причины, т.е. раковой клетки, необходимо знать абсолютные отличия между ней и нормальной клеткой того же типа.

Но таких отличий до сих пор не было найдено, на их поиски учёными потрачены все истекшие века. Все проблемы только в том, что раковая клетка – это не пришелец извне, а клетка, возникающая из нормальной клетки своего организма в результате дерепрессии в ней ряда генов фетальных белков. Хотя она имеет эти изменения в геноме, но этот геном организма-хозяина, он же кодирует протеом этой клетки.

Так как дерепрессия генов – это не мутация генов, то её белки-маркеры не являются белками-антигенами или они очень слабые для клеток иммунной системы, и поэтому для них раковая клетка не является чужеродной клеткой, а



значит, нет и иммунного ответа. Кроме этого, имеют значение и другие причины – нарушения функции дендритных клеток и др.

Долгое время считалось, что раковая клетка возникает из любой клетки ткани, и все клетки рака обладают одинаковыми потенциями к делению. Поэтому методы лечения рака имели целью уничтожение всех раковых клеток в организме пациента.

Недавно доказано, что раковая клетка возникает из стволовой клетки или из любой клетки ткани, если она способна вернуться в «стволовое» состояние (J.E. Trosko, 2005). При этом большая часть клеток рака – нераковые клетки и с коротким сроком жизни, и лишь меньшая их часть – это раковые стволовые долгоживущие клетки. То есть потенции к делению клеток в составе рака разные (M. Clarke, 2003).

До сих пор считалось, что место метастаза определяется тем, в какой орган с потоком крови попадает раковая клетка из первичного очага рака.

Теперь доказано, что метастазирование раковых клеток не хаотический, а управляемый самой раковой клеткой процесс с участием гемопоэтических клеток костного мозга.

Миграция раковых стволовых клеток начинается с секреции ими фактора роста, а к нему на поверхности гемопоэтических клеток имеется белок – рецептор. Получив этот сигнал, гемопоэтические клетки из костного мозга мигрируют «в разные места» организма, где оседают и размножаются, образуя преметастазные ниши. В эти ниши позднее придут раковые клетки из первичного очага рака, так образуются метастазы. Этим открыты новые мишени для предотвращения и подавления метастазирования раковых стволовых клеток.

Эти открытия учёных существенно дополняют прежние знания и дают принципиально новые возможности для решения основных проблем рака:

- в клетках рака необходимо диагностировать только раковые стволовые клетки;
- для излечения от рака, надо «выборочно целиться именно по раковым стволовым клеткам», и только их уничтожать;

- если после лечения рака в организме пациента останется даже одна раковая стволовая клетка, то рецидива рака «не избежать»;

- теперь стало возможным определять степень риска образования метастазов у каждого пациента, предупреждать и подавлять метастазы раковых клеток (R.N. Kaplan et al, 2005).

Дерепрессия генов свойств раковой клетки – это не изменение в структуре этих генов, а лишь изменения в выражении генов, а это – обратимый процесс. Поэтому раковую стволовую клетку можно не только уничтожать, но и возвращать в нормальное состояние. Затем она станет дифференцированной клеткой и погибнет через апоптоз. Это явление обозначается термином – реверсия.

То, что раковая клетка – это стволовая клетка, позволило ученым уже открыть некоторые отличия между раковой и нормальной стволовыми клетками на уровне генома. Это даёт надежду на такое лечение рака, при котором будут уничтожаться только раковые стволовые клетки, тогда как нормальные стволовые клетки не будут повреждаться.

Для ликвидации раковых клеток в организме пациента в пособии рассматриваются основные современные методы лечения. Наибольшие перспективы в излечении пациента от рака следует ожидать от вакцин и методов реверсии раковых стволовых клеток, в том числе экстракты и белки из эмбриональных тканей и плаценты, а также вакцина из эмбриональных стволовых клеток.

У нас достаточно книг и статей о раке, но не было учебного пособия, в котором бы автор подошел к диагностике и излечению от рака пациента на основе новых знаний о раковой клетке, её свойствах и их молекулярных причин. Такие материалы для всякого желающего ознакомиться, часто разрозненны и не всегда доступны.

В учебной программе – «Основная образовательная программа подготовки врача-стоматолога». Часть 2. – М., 2003 г., выделен раздел «Опухоли». Исходя из этого, мы стремились дать в учебном пособии ответы на основные вопросы этого раздела на примере солидного рака.

К настоящему времени уже многое известно о свойствах раковой стволовой клетки и их молекулярных причинах. На этой основе разработан ряд новых методов для ранней диагностики раковых клеток в организме пациента и их избирательной ликвидации. Часть этих методов уже внедрена в клиническую практику, в том числе индукция реверсии и апоптоза раковых клеток экстрактом из фетальных тканей человека.

Часть их лишь начинает «выходить» из лабораторий или «на выходе» в клиническую практику, например, метод «глушения» экспрессии генов свойств раковой клетки интерферирующей РНК: введенная в раковую клетку короткая молекула РНК связывается с иРНК гена и тогда синтез белка прекращается, а значит, раковая клетка утрачивает соответствующее белку свойство.

Желание приблизить время широкого внедрения новых методов ранней диагностики раковых стволовых клеток и методов их ликвидации в клиническую практику, а также в целях учебного процесса со студентами, явились для нас главными причинами написать это учебное пособие.

Из большого материала о раковой клетке, её свойствах и их молекулярных причинах, мы сделали критический выбор того, что особенно необходимо для ранней диагностики раковых клеток и их ликвидации с целью излечения от рака.

В основу учебного пособия положены: 1) материалы литературы по молекулярной медицине и молекулярной онкологии; 2) наши лекции по онкологии для студентов стоматологического факультета, отдельные лекции для студентов лечебного факультета, а также семинары по онкологии для студентов на элективном курсе; 3) наш опыт как хирурга-онколога с 1971 г. и по настоящее время в отделении «Опухоли головы и шеи» Волгоградского областного клинического онкологического диспансера («ВОКОД» №1).

Без смены объекта для диагностики и лечения с уровня рака на уровень раковой стволовой клетки, без знаний молекулярных причин свойств раковой клетки, нам не удастся справиться с её следствием, т.е. раком.

В книге каждый раздел написан как самостоятельная единица, но связь между разделами есть и ясна. Мы выражаем благодарность авторам и издательствам за использование в книге иллюстраций, заимствованных из журналов, книг и публикаций и стремились привести эти источники в списке литературы.

Учебное пособие – «Азбука рака» идет навстречу нуждам студента, как в ранней диагностике рака, так и в излечении от него новыми методами. Оно может быть полезным и для врачей-онкологов.

А.И. Рукавишников

## **Глава 1. Геном нормальной соматической клетки**

### **1.1. ДНК – молекула жизни. Открытие структуры и функции, значение открытия**

#### Из истории открытия структуры ДНК

В 1910 г. стало ясно, что гены располагаются на хромосомах. Но не ясно было, из какого материала состоят гены – из белка или из нуклеиновой кислоты.

В 1928 г. Ф. Гриффит начал изучать роль нуклеиновой кислоты в жизни клетки в опытах на пневмококках.

Имеется два типа пневмококков. У одного пара бактериальных клеток окружена капсулой. Второй тип клеток – без капсулы. Капсула защищает микробы от фагоцитоза. Если ввести такие мышам, то они погибают. Пневмококк без капсулы не заражает мышей и не вызывает пневмонию.

Опыт. Мышей заразил смесью клеток живых пневмококков без капсул и мертвых пневмококков с капсулами.

Ожидалось, что мыши останутся здоровыми. Но они погибли от пневмонии. Живые бактерии, выделенные из мышей, имели капсулы. Это явление трансформации клетки.

Опыт. Микробиологи предположили, что какое-то вещество мертвых пневмококков способно заставить живые клетки образовывать капсулы. Они показали это в опытах.

Пневмококки с капсулами убили, растерли их и приготовили раствор из разрушенных этих клеток, – это экстракт. В культуральную среду внесли экстракт из мертвых клеток с капсулами, затем в эту среду внесли живые пневмококки без капсул.

Результат: некоторые из клеток без капсул трансформировались в клетки с капсулами; их потомки также обладали капсулами и при введении их мышам вызывали пневмонию.

Оказалось, что клетки без капсул претерпели изменение - они стали обладать капсулами и вызывали пневмонию. Важно, что и их потомки также образовывали капсулы и вызывали пневмонию.

Вывод: 1) признаки пневмококков изменились, 2) это вызвано скорее тем, что какой-то компонент экстракта или он стал частью пневмококка.

Опыты Ф. Гриффита продолжили американские учёные – микробиолог О.Т. Эвери (1877-1955) и его сотрудники.

Они задались вопросом: какое вещество вызывает трансформацию одного штамма пневмококка в другой? Для этого они повторили опыты Ф. Гриффита, используя вместо микробов экстракт из них.

Экстракт в опытах с пневмококками сохранял свою трансформирующую активность при разрушении в нем белков и РНК, но терял ее при разрушении ДНК.

Вывод: трансформирующим веществом является ДНК. Отсюда гены построены из ДНК.

Трансформация состоит в передаче генов от умерших пневмококков в живые и внедрении их в хромосому-хозяина, т.е. в бескапсульные пневмококки.

Эти данные об открытии учёные опубликовали в 1944 г. Так впервые было доказано, что признак от одной клетки передается другой веществом ДНК. Но как?

Роль ДНК в клетке была дополнена из жизни вирусов, содержащих ДНК. Они заражают клетки бактерий для того, чтобы осуществить в них цикл размножения.

При этом обнаружилась способность ДНК вируса синтезировать свои копии и белки.

Из всего следует, что ДНК контролирует жизнь содержащих ее клеток и способна синтезировать копии своих молекул. Этот процесс называется «самодублированием» или размножением. ДНК – единственная в природе молекула, способная копироваться.

Вклад акад. Н.К. Кольцова

В 1927 г. наш ученый – акад. Н.К. Кольцов (1872-1940) писал, что «в одной хромосоме укладывается одна невероятно длинная молекула, а вдоль неё располагаются отдельные группировки атомов – гены».

Он также впервые сказал, что «при делении клеток такие молекулы не создаются заново из отдельных кусков, а сначала достраивают на себе точные копии, а затем исходная молекула и копия разойдутся вместе с дочерними хромосомами в образующиеся заново клетки». Это матричный принцип репликации генов и затем хромосом перед делением клетки на две.

Как происходит удвоение ДНК перед делением клетки было тайной для биологов в течение многих десятилетий. Учёные догадывались, что для понимания этого необходимо знать: 1) строение ДНК и 2) способы расположения нуклеотидов в молекуле.

К 1950 г. было известно, что ДНК молекула, которая состоит из тысяч соединенных между собой в линию молекул четырех разных типов – нуклеотидов.

Э. Чаргафф (1950) показал, что в любой ДНК количество аденина равно количеству тимина ( $A=T$ ), а количество гуанина – количеству цитозина ( $G=C$ ). Это указывало на то, что в молекуле ДНК они находятся парами: А-Т; Г-Ц.

Р. Фраклин (1920-1958) в лаборатории М. Уилкинса методом рентгеновской кристаллографии получила «знаменитое ныне изображение картины структуры ДНК».

Однако из этих знаний не ясно было: как работает эта молекула или как она выглядит? Никто не знал, как выстраиваются химические единицы – А, Т, Г, Ц, чтобы нести в себе информацию о плане строения и воспроизводства живого.

### Модель молекулы ДНК

Д. Уотсон и Ф. Крик занялись созданием модели молекулы ДНК, как Л. Полинг – для изучения пространственной структуры белка. Она помогла бы понять детали структуры и возможные функции ДНК.

Проведя расчёты, они в течение 18 месяцев были заняты созданием модели и создали модель ДНК. Но они не были уверены в правильности этой модели.

Руководитель Р. Франклин – М. Уилкинс разрешил Д. Уотсону ознакомиться с рентгеновским изображением молекулы ДНК, не сказав об этом ничего Р. Франклин. Когда Д. Уотсон увидел полученное Р. Франклин изображение, он понял: «они с Ф. Криком не ошиблись». На этом снимке они четко видели признаки спирали и пошли сразу в лабораторию, чтобы проверить «всё на объемной модели».

Из-за отсутствия пластин Д. Уотсон вырезал из картона четыре типа макетов нуклеотидов: аденина (А), Тимина (Т), гуанина (Г) и цитозина (Ц) и стал раскладывать их на столе.

Он тут же обнаружил, что аденин соединяется с тиминном, а гуанин с цитозином по принципу «ключ-замок», образуя пары. Именно таким образом удерживаются между собой две цепи молекулы ДНК.

Последовательность этих пар в молекуле может бесконечно варьировать. Это и служит шифром или кодом, при помощи которого зашифрована информация, определяющая тип белка, синтезируемого данной клеткой (Рис. 1).

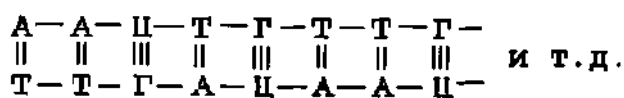


Рис. 1. Молекула ДНК и двух цепей. Основания соединены водородными связями.

Молекула ДНК имеет две функции: 1) передавать информацию потомству, т.е. дочерним клеткам и 2) реализовывать информацию внутри клетки.

Из структуры двойной спирали сразу видно прямое следствие – репликацию, т.е. размножение ДНК. Способ: расхождение двух комплементарных цепей и построение по каждой из них новой – дополняющей цепи. Так из одной молекулы ДНК образуется две, что требуется для деления клетки на две. Ошибки при репликации, т.е. мутации – причина превращения нормальной клетки в дефектную (Рис. 2 и 3).



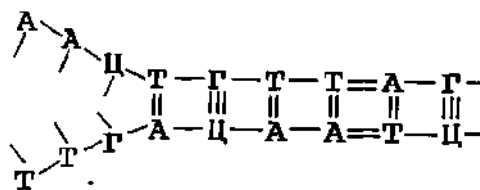


Рис. 2. Расхождение цепей ДНК.

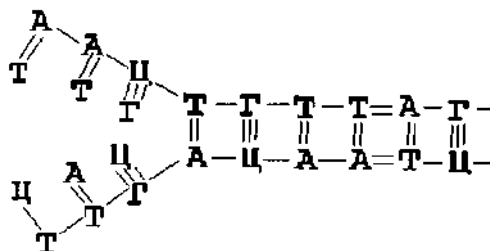


Рис. 3. Достаивание по каждой из цепей новой, – дополняющей цепи.

Итак, был доказан матричный принцип репликации ДНК перед делением клетки, предсказанный великим учёным, акад. Н.К. Кольцовым. Две части молекулы отделяются друг от друга, по каждой из них синтезируется новая половина молекулы. Порядок же оснований – в роли матрицы или образца для достраивания молекул.

### ДНК – хранилище генетической информации

Информация о синтезе каждого типа белка заложена в ДНК в виде некой линейной последовательности оснований.

В 1961 г. Ф. Крик доказал, что каждая группа из трех оснований образует кодон. Один кодон кодирует одну аминокислоту из 20 главных аминокислот.

Для переноса информации о структуре белка из ядра клетки имеется иРНК. Она – копия с фрагмента кодирующей матричной цепи ДНК. В ней вместо тимина содержится урацил.

По иРНК в рибосоме с помощью транспортной РНК будет синтезирован белок – конечное звено реализации генетической информации. Так как ДНК служит хранилищем генетической информации, ее называют молекулой жизни.

До начала работы Д. Уотсона и Ф. Крика над структурой ДНК, уже многое было известно.

Р. Франклин в 1951 г. впервые получила первую уникальную рентгенограмму молекулы ДНК, где видно, что эта молекула имеет форму двойной спирали, очень похожую на винтовую лестницу. Её снимки сыграли решающую роль в открытии Д. Уотсона и Ф. Крика. В знак этого, Р. Франклин называют «пионером» молекулярной биологии.

За открытие структуры ДНК и её функций Д. Уотсон, Ф. Крик и М. Уилкинс в 1962 г. удостоены Нобелевской премии. Р. Франклин не дожила. Она скончалась от рака в 1958 г.

### Революция в мире науки

Открытие пространственной структуры ДНК – стало основанием для ряда новых открытий.

В 60-х гг. XX в. механизм репликации ДНК подтвердился, обнаружен фермент – ДНК-полимераза, катализирующий этот процесс.

Открыт генетический код, т.е. шифр, по которому в клетке синтезируются белки.

В 70-х гг. XX в. ещё два метода были созданы: секвенирование и получение рекомбинантной ДНК.

Секвенирование дает возможность «читать» последовательность нуклеотидов в ДНК. С помощью этого метода расшифровывался «геном человека».

Получение рекомбинантной ДНК или метод молекулярного клонирования. Суть этого метода – в молекулу ДНК встраивают фрагмент, содержащий определенный ген.

Например, вводят его в бактерию, и она синтезирует его продукт – белок, который необходим человеку.

В 80-х гг. XX в. разработана полимеразная цепная реакция (ПЦР). Эта технология необходима для быстрого «размножения» нужного фрагмента ДНК.

С помощью ПЦР можно осуществлять раннюю диагностику бактериальных и вирусных инфекций, а также первые раковые клетки в организме пациента по их генам-маркерам.

Например, в плазме крови пациента можно обнаружить фрагменты генов-маркеров раковой клетки. Если фрагмент в малом количестве или единственный, с помощью ПЦР его размножают и после этого легко идентифицируют.

Открытие структуры ДНК дало возможность учёным расшифровать геном человека и многих других организмов. Это открытие позволило перейти к генной терапии любой болезни, в том числе рака.

Раковая клетка «плохо распознается иммунной системой пациента, т.к. она возникает из нормальной клетки организма-хозяина».

Поэтому для уничтожения раковых клеток с помощью генной терапии, надо прежде сделать раковые клетки «чужими» для иммунной системы.

Есть много способов, как это сделать. Можно из материала биопсии рака выделить раковые клетки, ввести в них «чужой» ген, а затем эти раковые клетки ввести обратно в организм пациента. В таком случае иммунная система по белку этого гена будет распознавать раковые клетки как «чужие» и уничтожать их.

В опытах на животных такой метод воздействия на ДНК раковых клеток дал обнадеживающие положительные результаты. Но для лечения же пациентов от рака, подобный метод находится пока на этапе клинических испытаний (Е.Д. Свердлов, 2003).

#### К эре «живых технологий»

И совсем необычно – начало новой эры «живых технологий». Учёные ряда стран заявляют, что они почти готовы к созданию «искусственной жизни», т.е. абиогенезу.

Пока нет единого определения живого, для него характерны три признака; 1) наличие контейнера, т.е. мембраны, вмещающего содержимое клетки; 2) метаболизм – способность преобразовывать базовые питательные вещества в рабочие механизмы клетки; 3) наличие генов – химических конструкций, необходимых для построения клетки, которые могут передаваться потомству и изменяться вместе с изменениями окружающей среды.

Каждый из этих трёх элементов уже воспроизведён в лабораториях, учёные готовы приступить к попыткам соединить всё это «в одну рабочую единицу», т.е. клетку.

В случае успеха, это будет «мир сверхмалых живых машин: специальные клетки будут лечить организм человека и бороться с загрязняющими окружающую среду веществами».

Ближайшей задачей науки учёные считают создание «искусственной клетки», способной к самовоспроизводству и вырабатывающей уникальные химические вещества, в том числе лекарства, которые пока не удаётся синтезировать.

«Искусственное живое» будет находиться под полным контролем человека, например, «подпитывая» его элементами, не встречающимися в природе в чистом виде.

#### Синтез вирусов и начало синтеза клетки

1. Проф. Э. Уиммер (E. Wimmer) и его группа из Нью-Йорка в 2002 г. впервые со времён зарождения «живого» на Земле, создали вирус полиомиелита из неживой материи.

Ученые спорят: вирусы – это живые существа или неживые объекты?

У.М. Стэнли – лауреат Нобелевской премии – считает, что «в клетке вирус ведёт себя как живое существо, а вне клетки он мертв, как камень».

Г. Надсон – наш микробиолог, говорит так: «Вирус – это то ли вещество, обладающее свойствами существа, то ли существо со свойствами вещества».

Акад. В.А. Энгельгардт – наш учёный, писал: «Многие вирусы состоят всего лишь из белка и нуклеиновой кислоты. Они могут быть отнесены к химическим соединениям – нуклеопротеидам».

Геном вируса полиомиелита полностью расшифрован. На этом основании учёные собрали точную последовательность нуклеотидов, соответствующую естественному образцу.

Этот генетический материал поместили в раствор, подобный цитоплазме. В нём по информации, заложенной в ДНК, были синтезированы необходимые белки.

Они применили рецептуры, опубликованные в Интернете, и генетические последовательности, полученные по почтовому заказу.

Проф. Э. Уиммер сообщает, что как только в пробирку были помещены все генетические составляющие, вирус тут же «самособрался». Иными словами, «жизнь, или по крайней мере её подобие, завелась с пол-оборота».

Созданный вирус выглядел так же, как его природный образец. Для доказательства активности вируса ученые заразили им мышей. Животные погибли при классических симптомах полиомиелита.

На сборку генома вируса полиомиелита проф. Э. Уиммеру потребовалось три года.

В той же лаборатории К. Вентер (J. Craig Venter) синтез вируса произвел за 14 дней.

2. Синтез искусственного вируса phi-X174. Это бактериофаг, существует в природе, безопасный для человека и животных.

К. Вентер и его группа взяли несколько участков ДНК и соединили их, создав полный геном вируса, содержащий одиннадцать генов. Эта смесь была помещена в пробирку, где самостоятельно собралась в генетическую цепочку, идентичную геному phi-X174. После этого собранный геном имплантировали в живую клетку, которая начала производить копии вируса.

3. Американские учёные создадут неизвестную в природе форму живого.

Учёные из лаборатории Роквилля объявили о намерении создать при помощи генной инженерии новую форму жизни – 21.11.2002.

Цель проекта – исследования фундаментальных механизмов зарождения и развития органической жизни. Основные участники – генетик К. Вентер и Нобелевский лауреат Х. Смит.

Целью эксперимента является создание одной клетки, являющейся базовой для формирования организма с минимальным набором генов для поддержания жизни.

Если опыт удастся, то выращенная клетка будет расти и делиться, создавая, таким образом, целую клеточную структуру, не существующую в природе. Это будет «минималистский» организм.

В конце 1990-х гг. XX в. К. Вентер – в то время глава Института геномных исследований в Роквилле (США), – опубликовал перечень генов, необходимых для существования одноклеточного организма, – микоплазмы. По его подсчётам этот обитатель половых путей человека может обходиться 300 генами из своих 517, которые в этом микробе образуют одну хромосому.

В основе проекта – на 3 года, лежит та же бактерия. Из её клетки учёные намерены извлечь весь генетический материал, затем скомпоновать из его «кусочков» искусственную цепочку генов, т.е. хромосому. В её состав войдут только те гены бактерии, которые «безусловно необходимы» для поддержания жизни нового организма. На завершающем этапе собранная цепочка генов будет инкорпорирована в лишённую генетического материала клетку.

Затем «должно случиться самое интересное, то, ради чего задуман эксперимент» – оживление бактерии. Дальше пойдут наблюдения за таким полуприродным организмом: как он живёт и размножается.

«Нас интересует: можно ли придти к молекулярному определению жизни, и наша главная цель – фундаментальное понимание составляющих самой элементарной живой клетки».

Во избежание создания болезнетворного агента К. Вентер и Х. Смит лишат новую «микоплазму» генов, ответственных за её прикрепление к клеткам в организме человека, потом тех генов, которые позволяют ей выживать в неблагоприятных условиях. В результате получится «довольно хрупкое существо, абсолютно зависимое от своих создателей».

В задачу исследований также входит научиться искусственно создавать различные гены. «Это – воистину базовая наука, – говорит К. Вентер. – Даже

при том, что мы обнаружили все гены в человеческом геноме, мы до сих пор не смогли постичь тайну самой простой клетки. Именно это мы и хотим сделать сейчас».

К. Вентер и Х. Смит и их группы в запасе имеют и другой вариант создания живой клетки: искусственно в лаборатории синтезировать эти базовые гены, собрать их в цепочку, а затем ввести их в такую же бактерию, из которой её генетический материал весь будет предварительно удалён.

Что вкладывает К. Вентер в свою задачу – дать «молекулярное определение жизни»?

Любая клетка построена из молекул, как и организм в целом. Их структура и состав, а также взаимодействие заложены в генах. В процессе эволюции каждая молекула скроена в соответствии с функцией в клетке. Клетка – это не хаотическое скопление молекул, а «их упорядоченность», т.е. организация, так как её строят гены через продукты – белки. Разрушь её, то хотя и останутся в виде смеси эти молекулы клетки, – это уже будет мёртвое, так как разрушена молекулярная организация клетки. А она создана в процессе эволюции «живого».

Отсюда: К. Вентер стремится минимумом генов получить такую организацию неживых молекул, которая превратится в «живое». Это и будет абиогенезом.

## **1.2. Раскрытие секрета жизни – значение для медицины и онкологии**

В биологии проблема сущности жизни и её происхождения всегда стояла под номером один.

Главным признаком жизни или живого на уровне клетки является её деление, т.е. митоз.

Процесс митоза, видимый в микроскоп, при котором одна клетка делится на две, – «удивительное явление в биологии». Ещё удивительнее при этом

представлялось возникновение двух хромосом там, где раньше была только одна.

Это являлось величайшим секретом биологии: «как удваивается это, имеющее первостепенное значение, тельце?»

Хромосома состоит из трёх веществ: ДНК, белка и РНК. Нуклеиновые кислоты и белки состоят из гигантских молекул, каждая из которых имеет основной скелет и боковые группы. В белках содержатся элементы двадцати типов, в нуклеиновых кислотах – четырёх типов и при том иных.

28.11.1953 г. Ф. Крик вошёл в кембриджский «Игл паб» и сказал: «Мы раскрыли секрет жизни». Они действительно обнаружили «нечто подобное». И это было то, за что позднее он и ещё двое сподвижников, в 1962 г. получили Нобелевскую премию.

Они создали модель пространственной структуры молекулы ДНК и этим совершили прорыв, который, в частности, позволил разгадать загадку: как удваиваются хромосомы перед делением клетки на две. Эта тайна или секрет десятилетиями не давала покоя учёным.

Модель молекулы – это её копия, но гораздо больше по размерам, чем существующая в клетках. Из-за слишком малого размера мы не видим реальную молекулу. Модель молекулы позволяет нам понять её строение вплоть до расположения в пространстве отдельных атомов, а то и её функции в клетке.

Оказалось, что хромосома удваивается за счёт репликации, т.е. удвоения.

Молекула ДНК – это спираль из двух цепей. Каждая цепь состоит из нуклеотидов: аденина (А), тимина (Т), гуанина (Г) и цитозина (Ц). Две цепи соединяются между собой парами этих оснований по принципу «ключ – замок»: А-Т; Г-Ц.

Механизм репликации, т.е. удвоения молекулы ДНК: две цепи расходятся. Каждая цепь из нуклеотидов служит матрицей или шаблоном для достраивания к ней дополняющей её цепи из нуклеотидов. Когда этот процесс закончится, у нас будет уже не одна, а две пары цепей, т.е. две молекулы ДНК.



Одна молекула – для одной хромосомы, другая – для другой, т.е. по одной для каждой из двух дочерних клеток. Для деления клетки на две дочерние, как раз и требуется удвоение хромосомы. Но только теперь становится ясно, что это происходит после удвоения молекулы ДНК. В этом и состоит раскрытие секрета жизни.

В 60-х гг. XX в. предположение Д. Уотсона и Ф. Крика о механизме репликации, т.е. удвоения ДНК, было подтверждено. Кроме того, было показано, что этот процесс осуществляется при участии специального фермента – ДНК-полимеразы.

Примерно в то же время было сделано ещё одно открытие – открытие генетического кода. Гены содержат в себе информацию о плане строения клетки и её функционирования, что передается дочерним клеткам. Передаётся информация о линейной структуре каждого белка в клетке.

Белки, как и ДНК, представляют собой длинные цепочки из аминокислот. Аминокислот – 20. Было не ясно, каким образом «язык» ДНК, состоящий из четырёхбуквенного алфавита: А, Т, Г, Ц переводится на «язык» белков, где используется 20 «букв», первая буква – название аминокислоты.

Было показано, что сочетание из трёх нуклеотидов ДНК, каждое из которых, называется кодоном, чётко соответствует одной из 20 аминокислот. И, таким образом, «текст» на ДНК однозначно переводится в белок.

Схема синтеза белка с копии гена, т.е. иРНК в рибосоме: ген – иРНК – белки.

Все свойства клетки в виде «инструкций» заложены в соответствующем гене или генах, а создаются через их продукт – белки. Изменения в гене: дефект его структуры или изменение его экспрессии дадут изменения в его белках – изменения в структуре белка, отсутствие белка, избыток нормального белка. А это вызовет изменения в свойствах клетки.

### В чём польза раскрытия секрета жизни?

Между размножением клетки и репликацией ДНК имеется принципиальное различие.

Первый процесс – это деление клетки на две. Это клеточный уровень. Второй процесс – это создание молекулой точной своей копии. Это молекулярный уровень. Деление клетки на две дочерние не произошло бы, если не было бы репликации молекулы ДНК.

Отсюда: репликация ДНК – это молекулярная причина, а деление клетки – её следствие.

Таким образом, до раскрытия секрета жизни каждое свойство клетки как живого только описывали, а теперь – объясняют, т.е. знают его молекулярную причину.

Клетка стала предметом изучения биологии, а молекулярные причины свойств клетки, – предметом молекулярной биологии. Она возникла с момента раскрытия секрета жизни.

Зная молекулярную причину каждого свойства клетки, можно на неё воздействовать. Это дало возможность учёным управлять живым; управлять – это, значит, уметь изменять свойства живого.

### Пример

В отличие от нормальной клетки, раковая клетка – бессмертна за счёт восстановления в ней после каждого деления длины теломер.

Причина этого свойства – молекулярная: в раковой клетке включён ген теломеразы, а она восстанавливает длину теломер.

Цель: лишить раковую клетку свойства бессмертия, т.е. сделать её смертной. Здесь ген и его фермент – теломераза будут целями или мишенями для воздействия.

Для прекращения функции гена можно в раковую клетку ввести антисмысловую РНК к иРНК, т.е. к копии гена. Она по принципу комплементарности пар оснований соединится с иРНК, и тогда синтеза теломеразы уже не будет.

Чтобы заблокировать теломеразу, можно по её трехмерной структуре синтезировать молекулу лекарства, комплементарную к активным участкам фермента теломеразы. Его ввести в раковую клетку, оно соединится с теломеразой

по принципу – «ключ-замок», и теломераза будет блокирована. В результате в раковой клетке теломеры уже не будут достраиваться перед делением, и клетка погибнет через апоптоз.

Но эти средства блокирования гена теломеразы не всегда могут быть эффективными. Недавно сделано открытие – «малые интерферирующие РНК», введение которых в организм специфично «выключает» конкретный ген путем разрушения его копии – иРНК (см. раздел 8.1.).

Вот это и означает – управлять живым, в данном случае, раковой клеткой, воздействуя на молекулярные причины ее свойств.

Открытие того, что каждое свойство клетки в норме, а значит, и при болезни, создаётся молекулярной причиной, привело к открытию молекулярной медицины.

Теперь мы знаем, что гены и их белки каждого свойства раковой клетки – это метки или маркеры для её диагностики. Они же – цели или мишени для лекарств, избирательно уничтожающих раковые клетки.

Точно также находят гены-маркеры и белки-маркеры для свойств возбудителей различных инфекций – бактерий, вирусов и др.

На примере со свойством бессмертия раковой клетки мы дали три способа уничтожения носителя этого свойства, т.е. раковой клетки.

Во-первых, через связывание копий гена-маркера этого свойства – иРНК.

Во-вторых, с помощью лекарства, связывающего белок-маркер, т.е. теломеразу, которая создаёт свойства бессмертия раковой клетки.

В-третьих, «выключение» гена свойства бессмертия раковой клетки путем разрушения его копий иРНК с помощью интерферирующей РНК.

Создание лекарств по генам-маркерам и белкам-маркерам позволяет, действуя только на них, избирательно уничтожать их носителей, не давая побочных эффектов. Это и есть молекулярная или геновая медицина.

В ближайшие годы XXI-го века эта медицина должна заменить существующую, которую теперь уже называют, – «старой». Ведь при «старой» медицине лекарство создают методом «проб и ошибок», поэтому они часто и вызы-

вают у пациентов тяжёлые побочные эффекты. В этом смысле в трудном положении находится сегодня стандартная химиотерапия рака.

Основные причины этого: 1) раковая клетка – это эукариот среди нормальных клеток организма человека, тоже – эукариотов; 2) отставание науки до последних лет об источниках канцерогенеза и его молекулярных причинах.

Лекарства стандартной химиотерапии сами по себе не могут различать раковую клетку среди нормальных клеток и направлены на уничтожение слишком быстро делящиеся клетки, к которым относили каждую клетку рака.

Недавно выяснено, что канцерогенез из двух источников: 1) из нормальной клетки ткани, ставшей прежде стволовой клеткой, или 2) из стволовой клетки ткани.

Оказалось также, что в составе клеток рака клетки неодинаковые:

- основную массу клеток составляют нераковые клетки: они быстро делятся и после выполнения функций ткани сами погибают через апоптоз; именно эти клетки – мишени для лекарств стандартной химиотерапии;

- значительно меньшую часть составляют раковые клетки: это раковые стволовые клетки, которые асимметричным делением копируют себя и генерируют нераковые клетки в составе клеток рака.

При этом, раковые стволовые клетки делятся редко и медленно. Это причина того, что лекарства стандартной химиотерапии оказываются неэффективными против раковых стволовых клеток (J.E. Trosko et al., 2005).

До сих пор в клинической практике преобладают пациенты с симптомами рака и крайне редко встречаются пациенты, у которых рак – «ин ситу», т.е. на месте.

Начинать лечение рака при его симптомах – это уже очень поздно. Ведь раковые клетки начинают распространяться по организму при размере рака в ткани какого-либо органа всего лишь 2 мм в диаметре, т.е. с началом в узелке ангиогенеза и лимфангиогенеза.

Теперь же, когда наступила эра молекулярной медицины, пациента начнут лечить ещё до того, как появятся первые симптомы болезни, в том числе и

рака: в самом его начале – на уровне первой раковой клетки и её первых потомков, и даже до его начала – на уровне предраковых клеток.

Определив ген-маркер болезни, можно определить, какой именно белок её вызывает, а значит, надо и создать лекарство против этого белка или его гена – вот и «волшебная пуля», о чём так мечтал П. Эрлих. На этом и будет строиться фармакология будущего.

Новые лекарства и средства на основе генов-маркеров и белков-маркеров конкретной болезни станут прицельно атаковать только дефектные клетки, уничтожая их, и не повреждая при этом здоровые клетки. Отсюда – не будет побочных эффектов от лекарств у пациента.

Раковая стволовая клетка возникает из нормальной клетки или стволовой клетки ткани из-за дерепрессии в ней генов фетальных белков и одновременно репрессии генов-супрессоров метилированием CpG-динуклеотидов промотора этих генов или мутаций в генах. При этом она становится более живучей, чем нормальная клетка этого же типа.

Раковая клетка несёт в себе ряд уловок, делающих её неуязвимой и способной к самостоятельному существованию в организме пациента. Т.е. эта дефектная клетка не просто клетка, а целый одноклеточный организм.

«Один в поле не воин», – гласит пословица. Но раковая стволовая клетка-организм – «одна в поле воин», так как легко обходит все защитные механизмы организма пациента.

Она в организме, но живёт отдельно от него, паразитируя на нём. В организме пациента эта клетка-организм занята лишь одним делом – копированием себя и разрушением тканей и органов своего носителя вплоть до его смерти и погибает сама лишь после его смерти.

Из того, что причиной любой болезни являются гены и их продукты – белки в клетке, вытекают состояния пациента, знания которых важно для врача любого профиля.

## 1. Предболезнь.

Любая болезнь начинается с патологии клетки или клеток. Изменения в том или ином гене или генах клетки – не диагностика болезни, а лишь установление вероятной предрасположенности к ней.

При таких изменениях в половой клетке употребляют термин – предрасположенность к болезни, а в соматической клетке, чаще говорят – предболезнь.

При предболезни такой ген ещё не проявляет себя, так как в клетке ещё нет синтеза продукта гена – белков. При возникновении в нормальной клетке таких изменений в генах, – это предраковая клетка.

«Ремонт» такого гена или генов, или замена его в клетке на нормальный ген, «выключение» генов свойств раковой клетки ликвидируют предболезнь.

## 2. Болезнь.

Когда в клетке под контролем гена или генов уже есть синтез его продукта – белков, то это признак того, что ген уже начал разрушительную работу в клетке, ведущую к болезни.

Здесь изменения в гене или генах – первопричина болезни клетки, а изменения свойств клетки вызываются продуктом гена, т.е. его белками. Эти свойства формируют затем симптомы конкретной болезни.

Ген-причина в клетке – это ген-маркер, а его белок – белок-маркер. Ингибирование гена-причины и его продуктов – белков в клетке, может остановить болезнь.

## 3. Ранняя диагностика болезни.

До сих пор многие болезни и среди них тяжёлые, в том числе – рак, диагностируются на этапе их симптомов. Лечение многих болезней на таком этапе крайне затруднительно в смысле излечения или даже невозможно.

Теперь диагностика любой болезни, в том числе, самой опасной болезни – рак, станет возможной в досимптомном периоде.

«До начала». Это будет осуществляться путём выявления в клетке или клетках у пациента гена-маркера конкретной болезни. В отношении рака – это будет диагностика предраковой клетки или клеток.

«С самого начала». Это будет осуществляться выявлением в клетке или клетках не только гена-маркера, но и белка-маркера для конкретной болезни. В отношении рака, это будет выявлением в организме пациента первой раковой клетки и её близких потомков.

Материалами для этих исследований могут быть: образцы ткани фонового процесса соответствующего органа – биопсия, а также кровь и другие биологические жидкости от пациента.

При любой локализации рака у пациента в крови за счёт мозаичности капилляров узелка рака могут быть обнаружены как сами раковые клетки, так и их маркеры: в плазме крови – гены-маркеры, а в сыворотке крови – белки-маркеры из раковых стволовых клеток.

В плазме крови могут быть гены-маркеры из предраковых клеток, а также гены-маркеры – из раковых клеток, но различить их практически невозможно.

Теоретически найти эти различия можно с помощью МС-ПЦР и ПЦР-ММК и белковых микрочипов.

Если в плазме крови от пациента будут обнаружены гены-маркеры, характерные для раковой клетки, а в сыворотке этого же образца крови отсутствуют соответствующие белки-маркеры, то это могло бы указывать на присутствие предраковых клеток.

Обнаружение в плазме крови от пациента генов-маркеров из раковой клетки, можно было бы обозначать как I уровень ранней диагностики рака, так как нарушения в генах – это первопричина превращения нормальной клетки в раковую клетку. Тогда обнаружение белков-маркеров из раковых клеток в сыворотке крови от пациента – это II уровень ранней диагностики рака, так как белок-маркер – это продукт гена.

#### 4. Лечение болезни.

Для этого в качестве мишеней для лекарств и средств будут использоваться – гены-маркеры и белки-маркеры клеток при каждой болезни.

Это новые лекарства и средства, которые будут прицельно действовать только на дефектные клетки, а для рака – это раковые стволовые клетки, не за-

трагивая при этом нормальные стволовые клетки. То есть эти лекарства и средства будут избирательны и индивидуальны для конкретного пациента (А.И. Арчаков, 2000).

#### 5. Критерии излечения от болезни и контроль.

Гены-маркеры и белки-маркеры позволят обнаружить дефектные клетки при любой болезни тогда, когда никакими другими методами их еще нельзя обнаружить в организме пациента.

Они позволят обнаружить рак у пациента при размере узелка из раковых клеток в ткани диаметром в 2 мм (А.С. Белохвостов, 2000).

Количество или титр генов-маркеров и белков-маркеров в крови из дефектных клеток конкретной болезни или из раковых стволовых клеток позволит осуществлять слежение за процессом лечения болезни и результатом лечения пациента.

Если титр маркеров в процессе лечения не уменьшается, тактику лечения нужно менять. Полное отсутствие маркеров через две-три недели после окончания лечения – признак излечения пациента от болезни.

Очень удобно будет вести такой контроль с помощью биочипов: ДНК-чипы для генов-маркеров, а белковые чипы – для белков-маркеров дефектных клеток конкретной болезни и раковых стволовых клеток рака.

### **1.3. Открытие строения генома человека – значение для медицины и онкологии**

Причина любой болезни внутри клетки или клеток, – на уровне молекул ДНК и белков. В будущем причины болезней будут обнаруживать на уровне атомов и их электронных оболочек.

В настоящее время нарушения в молекулах ДНК и белков клетки или клеток – истинная причина любой болезни. Для понимания болезни, её ранней диагностики и излечения, необходимо знать их молекулярные причины.



Но это прежде требует знаний структуры и функций молекул ДНК и белков в нормальной клетке каждого типа. На уровне ДНК – это гены.

Ген – это фрагмент ДНК, который несёт информацию о структуре иРНК, других РНК и белков.

Геном – это совокупность генов и межгенных участков в молекулах ДНК. Геном изучает наука – геномика.

В ядре любой соматической клетки человека имеется 23 пары хромосом. Каждая хромосома содержит одну молекулу ДНК из двух цепочек. Каждая цепочка построена из нуклеотидов, в каждом по одному из азотистых оснований. Всего азотистых оснований четыре: аденин, тимин, гуанин, цитозин. Для краткости их обозначают первыми буквами слов – А, Т, Г, Ц. Эти буквы – алфавит ДНК.

Каждая молекула ДНК представляет собой целый ряд генов. Так как ДНК построена из двух цепочек, то её длина измеряется числом пар оснований, а каждую пару обозначают словом «буква».

Две цепочки из нуклеотидов с помощью пар оснований соединяются вместе и образуют целую молекулу ДНК. Пары оснований комплементарны друг другу и соединены между собой водородными связями только такими сочетаниями: А-Т или Т-А; Г-Ц или Ц-Г. На протяжении всей длины молекулы ДНК можно видеть такие сочетания оснований. Но порядок размещения пар оснований или их последовательность для каждого гена свой. Именно в последовательности пар оснований или «букв» и заключена генетическая информация. Это инструкция о том, как должна быть построена клетка каждого типа, и как она должна функционировать. Это относится и к организму в целом. То есть генетическая информация всех генов – это «рецепт» построения и функционирования организма человека.

Из этого ясны цели открытия строения генома:

1) выявить последовательность пар оснований каждого гена вдоль длины молекулы ДНК;

2) определить место каждого гена и его границы по длине молекулы ДНК. Это необходимо было сделать в каждой хромосоме – с 1-й по 23-ю.

Весь процесс открытия строения генома человека состоял из этапов:

1) разделение молекул ДНК на большие фрагменты и секвенирование (от лат. *sequi* – следовать), т.е. определение последовательности пар оснований или «букв»;

2) картирование, т.е. идентификация генов и локализация места их расположения на хромосомах.

На первом этапе было обнаружено, что ДНК человека в 23-х хромосомах состоит из 3,2 млрд. пар оснований, т.е. химических «букв». Каждая пара оснований – это «кирпичик», из которых формируются гены.

На втором этапе учёные расположили эти пары оснований в правильной последовательности, что позволило «прочитать» каждый ген и произвести инвентаризацию генов и межгенных участков. Так была составлена карта топографии генов на хромосомах. Но эти данные будут ещё уточняться и дополняться.

Прямая выгода от знания строения генов станет очевидна не сразу, пока не будут выяснены функции каждого гена в клетке, т.е. что он делает?

До открытия строения генома учёные знали функции ряда генов. В целом учёные знают о функциях не более одной трети генов, а о двух третях их – ничего.

То есть учёным ещё предстоит выполнить важнейший третий этап – выяснить функции каждого гена в клетке каждого типа в норме. Важно узнать, какие гены в такой клетке работают, а какие «молчат». Затем учёные то же сделают в дефектной клетке того же типа, например, в раковой клетке. По разнице можно выявить ген-причину, но это лишь один из путей обнаружения раковой клетки.

#### Что пока дало открытие строения генома?

1. Оказалось, что в геноме человека всего 26-30 тысяч генов, а не больше, как предполагалось.

Очевидно, не зря в клетках человека обнаружено «расщепление» генов. За счёт этого с гена может копироваться не одна иРНК, а больше – в среднем до 10 таких молекул. Отсюда продукт гена – белок не один, а несколько – от 3 до 10 разных белков.

То есть в схему этапов реализации генетической информации от гена к его основному продукту, следует внести уточнение: ген – иРНК – белки, вместо – «белок» в прежней схеме.

Считают, что у человека «один ген отвечает за группу функций» или «за одну функцию отвечает сразу целая группа генов». Это будет изучено, так как есть методы определения функций генов.

2. Лишь 2% всех генов участвует в синтезе белков в клетке, остальные – 98% длины ДНК до недавнего времени считалось – не являются генами. Это длинные последовательности нуклеотидов, в которых часто повторяется – АГГ, АГГ... Функции этой части генома только начинают изучаться. Но уже ясно, что это не «мусор», как некоторые считали, а часть ДНК, которая регулирует экспрессию генов и их связей между собой.

3. Небольшое число генов в геноме человека имеет важное практическое значение – легче разобраться в роли генов, которые могут вызывать разные болезни, в частности, рак.

4. Оказалось, что около половины генов являются общими и для человека, и для червячка «*C. elegans*». Более того, в геноме человека только 300 генов, которых нет в геноме полевой мыши.

Для изучения функций генов широко используются клетки в культуре.

Принцип: с помощью введения в клетки антисмысловой РНК блокировать, а теперь можно малой молекулой РНКи разрушить в клетке иРНК, т.е. копию изучаемого гена. По изменению свойств такой клетки можно определить функции этого гена.

Открытие общих с человеком генов у червячка и мыши делает эти организмы новыми, очень нужными моделями для определения функций неизвестных у человека генов, но одинаковых с ними. Ведь изучать функции генов на

этих организмах проще и легче, чем на человеке. Их гены можно легко изменять, т.е. вызывать мутации или выключать ген, следя за изменениями свойств клетки или свойств организма.

На мышах можно использовать и такой приём: в половых клетках удалять один, либо два, либо больше генов и изучать организм таких мышей-мутантов. Это позволит понять какой ген или гены за что отвечают, изучать взаимодействие генов между собой.

5. Разница между генами мыши и человека не превышает 1%, а между разными людьми – 0,01%.

На выяснение функций всех генов в клетках каждого типа человека уйдёт много лет. Когда это будет достигнуто, учёные смогут на уровне нормальной клетки каждого типа установить стандарт или идеал нормы: а) последовательности пар оснований для каждого гена и б) функций каждого гена в клетке.

Акад. А.И. Арчаков (2000) подчёркивает, что «теперь стало совершенно очевидно, что ~~все~~ болезни от генов». На этой основе он впервые предложил классификацию всех болезней на «два больших класса»:

1. Наследственные болезни. Они составляют всего 2% от всех болезней. Их причина – дефект гена или генов в половых клетках.

2. Ненаследственные или приобретённые болезни. Они составляют 98% от всех болезней. Их причина – нарушения экспрессии гена или генов в соматической клетке или клетках.

Из причин болезней «сразу» вытекают и методы лечения пациентов: для пациентов первого класса – «перспективна генная терапия», а для пациентов второго класса – «создание новых лекарств».

В настоящее время для оценки функций генов и их изменений в клетках при различных болезнях, в частности, раке, разработан ряд новых методов. Но в клиническую практику они только начинают «входить». Они необходимы для ранней диагностики раковых клеток и для контроля излечения от рака.

1. ПЦР-ММК – это чувствительный и надёжный метод получения фрагментов генов или РНК в неограниченном количестве копий для последующего

их анализа. Им можно выявлять любые фрагменты мутантных генов или избыток иРНК генов из раковых клеток в образцах из плазмы крови и других биологических жидкостей, из клеток рака материала биопсий от пациента. А избыток иРНК и мутации в генах – это маркеры раковых клеток.

2. ДНК-чипы. На них можно определять, какие гены в нормальной клетке каждого типа активны, а какие – «молчат». Такие микрочипы позволяют оценить состояние десятков тысяч генов в клетке и даже сразу всех, т.е. 26-30 тысяч составляющих геном человека.

ДНК-чипы позволяют произвести раннюю диагностику рака, т.е. первую раковую клетку и её первые потомки по исследованию образца плазмы крови от пациента: в ней можно находить фрагменты генов фетальных белков, например, гена ост-4, гена белка «5T4» и другие, а также фрагменты мутантного гена wt53 – «стража» генома из погибших раковых клеток.

Когда будут выяснены функции каждого гена в нормальной клетке каждого типа и гены-причины, вызывающие ту или иную болезнь, медицина будет изменена в корне: она станет молекулярной.

Перед учёными стоят задачи:

1) какие гены в нормальной клетке разного типа, став дефектными, превращают нормальную клетку в раковую клетку;

2) сколько всего дефектных генов вызывает образование из нормальной клетки раковую клетку;

3) влияние таких дефектных генов на организм человека. Для этого необходимо создать мышь-мутант с таким дефектом гена или генов. То есть, работы по идентификации генов теперь могут длиться дни, а не годы, как раньше. Но главная задача молекулярной медицины заключается теперь в том, чтобы выяснить, какие гены и как изменены, что вызывают ту или иную болезнь, в частности, канцерогенез, «трансформировать в знание того, что с этим можно сделать».

Для этого учёным потребуется лучше понять, как, строя и поддерживая наш организм, взаимодействуют между собой белки – молекулы, построенные по генетическим «шаблонам» ДНК.

Наука геномика уже существует и активно развивается, но наука протеомика ещё только в начале своего пути. И здесь впереди ещё «долгий путь».

Диагностика болезней будет основана на выявлении дефекта гена или генов, или изменения экспрессии генов по иРНК. Такие изменения в генах – это маркеры для ранней диагностики болезни и гены – причины конкретной болезни. Они же будут мишенями для воздействия лекарственных препаратов.

Среди лекарственных препаратов могут быть: нормальный ген для замены дефектного гена в клетке, ингибиторы дефектных генов – введение РНКи в дефектные клетки, «ремонт» генов в клетке и др.

Действие лекарственных препаратов будет избирательным, т.е. без повреждения здоровых клеток и направлено не на ликвидацию симптомов болезни, а против гена-причины. Это особенно необходимо соблюдать при лечении рака.

#### Что даст в перспективе для медицины открытие строения генома?

1. Проведение генетических тестов. Для любой болезни будут определены гены-маркеры: а) «до её начала» – это диагностика предболезни и б) «её начало» – это ранняя диагностика болезни – I уровень.

По одному небольшому образцу крови или плазмы от пациента достаточно, чтобы определить степень риска возникновения болезни, в том числе появления первых раковых клеток в организме. Для этого наука быстрыми темпами разрабатывает детальные тесты, что позволит очень рано выявлять предболезнь или болезнь. В таких случаях применение избирательных лекарственных препаратов может предотвратить возникновение болезни, в частности, рак.

2. Создание индивидуальных лекарственных препаратов. Лекарство будет создаваться для конкретного пациента. На уровне ДНК эти лекарства будут направлены против дефектов генов и их иРНК. В отличие от существующих препаратов, новые препараты будут давать максимальный эффект, а их избира-

тельное действие на клетки-мишени предупредит побочные эффекты у пациента.

3. Проведение генной терапии. В настоящее время любой ген можно клонировать или синтезировать. Сам по себе такой ген, введенный в организм любого вида, не отторгается этим организмом.

Для излечения рака генная терапия крайне необходима. Для этого уже разработано много методов, но в клиническую практику только начинают внедряться.

Например: введение в раковые клетки нормального гена-супрессора *wt53* белка *p53* при мутациях его в раковой клетке, «гена-смерти» *bax* для индукции апоптоза в раковых клетках, подавление экспрессии генов *oct-4*, *Nanog*, *hTERT*, циклина *D1*, генов *mts1* и остеопонтина и других генов инвазии раковых клеток.

До сих пор считалось, что хранилищем генетической информации являются только гены, кодирующие белки. Но в некодирующих белки областях ДНК, которые долгое время относили к «хламу», оказалось множество генов, кодирующих только малые, т.е. короткой длины двухцепочечные молекулы РНК. Они то и осуществляют контроль обычных генов – избирательно подавляя их экспрессию в клетке, путем разрушения копии, т.е. иРНК гена. Это интерферирующие РНК (РНКи).

Фенотип клетки любого типа во многом определяется метильными группами – (-CH<sub>3</sub>). Они могут связываться с цитозином (C), когда в одной цепи нуклеотидов за ним следует гуанин (G) – это дуплет CpG. Такие дуплеты часто располагаются в промоторе генов.

При присоединении к CpG – островкам метильной группы метилтрансферазой, – ген выключается, а когда удаляется метильная группа деметилазой, – ген включается. Важно то, что при этом последовательность нуклеотидов не затрагивается. Отсюда и название этого явления – эпигенетическое изменение гена. «Эпи» в переводе с греческого, – это «над» генами.

Открытие строения генома человека, – «это только начало пути», подчеркивает У. Гиббс (2004). В настоящее время учёные приступили к изучению эпигенома, конечная цель которого – составление карты «всех сайтов метилирования в ДНК».

В отличие от мутаций метилирование и деметилирование промотора генов – процесс обратимый. В каждой нормальной клетке разного типа «рисунк» метилирования свой. Кроме редких типов клетки, ошибки в метилировании – главная причина превращения нормальной клетки в раковую клетку.

Для раковой клетки характерны:

- снижение метилирования геномной ДНК в целом;
- деметилирование ряда фетальных генов, что приводит их к дерепрессии;
- метилирование генов-супрессоров, препятствующих в норме превращению нормальной клетки в раковую клетку;
- введение деметилирующих лекарств в эти гены возвращает гены в нормальное состояние. Однако, в раковой клетке в отличие от нормальной клетки, такое изменение часто нестабильно. Учёные заняты решением этой очень важной проблемой для онкологии.

Эпигенетическими изменениями занимается наука эпигенетика – её объект эпигеном человека.

4. Открывается подход к определению состояний живого существа.

«Живое существо» или «живое» начинается с уровня клетки, ниже этого уровня молекулы, ещё ниже – атомы и их электроны. Но это уже не живое.

Понятие «состояния» относится к живому существу, так как только живое существо, а не молекулы или атомы, могут реагировать на раздражители.

Состояния живого существа известны с глубокой древности – из работ нашего великого соотечественника – учёного и врача ибн Сины (980-1037 г.).

Величайший труд ибн Сины «Канон врачебной науки» охватывает все разделы средневекового медицинского знания. Он включает анатомию и физиологию человека, патологию, лекарствоведение, клиническую диагностику и лечение болезней.



Этот труд по своей роли в истории медицины ученые сопоставляют только с Гиппократовым сборником.

«Канон» был составлен в первые десятилетия XI в., впервые был отпечатан на арабском языке в Риме в конце XVI в., затем был ряд переводов его на латинский язык.

Много веков подряд его штудировали в университетах и школах Запада и Востока как обязательное руководство для врачей. Да и сегодня каждый читатель находит в нём много интересного и поучительного.

Ибн Сина определял медицину так: «медицина – наука, познающая состояние тела человека, поскольку оно здорово или утратит здоровье, ради того, чтобы сохранить здоровье и вернуть его, если оно утрачено».

«Познание всякой вещи, если она возникает, достигается и бывает совершенным через познание её причин, если они имеются». Поэтому ибн Сина говорит: «в медицине следует знать причины здоровья и болезни. Причины эти бывают явные и скрытые».

«В истинных изъяснено, что познание вещи приобретается через познание её причин и начал. Материальные причины – это заложенные в теле основы».

Теперь нам можно перейти к определению состояний живого существа.

Среди состояний живого существа ибн Син различал: «здоровье» и «утрата здоровья». В утрату здоровья он включал два состояния: «болезнь» и «нездоровье и не болезнь». Для сегодняшнего дня «нездоровье и не болезнь» – это предболезнь.

Познание состояний живого, писал ибн Син, требует знания их причин. И на это ушли века. Многие учёные пытались дать определение «болезни», а определения «здоровья» практически не касались. Но мы до сих пор не имеем правильного и понятного определения ни здоровья, ни болезни.

На наш взгляд, выделенные впервые ибн Син состояния живого, – основа для их определения.

Лишь недавно прогресс науки – расшифровка генома человека и начало изучения его эпигенома дают нам возможность решить эту проблему или заметно приблизиться к ней. Но для этого прежде надо дать ответ на вопрос: что является причиной этих состояний?

Ответ: причиной является эпигеном живого существа, так как: 1) именно эпигеном «контролирует и регулирует работу каждого гена» в клетке и 2) нарушения экспрессии гена или генов в нормальной клетке – причина болезни (А.И. Арчаков, 2000).

Анализ эпигенома позволит определить каждое из этих состояний, в том числе промежуточное состояние – предболезнь; в схеме это можно было бы сделать так<sup>1</sup>:

а) на уровне соматической клетки

- |  |                      |
|--|----------------------|
| 1. Идеальный эпигеном клетки                             | - Здоровье клетки    |
| 2. Изменения в эпигеноме клетки без нарушений её функций | - Предболезнь клетки |
| 3. Изменения в эпигеноме клетки с нарушениями её функций | - Болезнь клетки     |

б) на уровне эпигенома человека по анализу клеток крови

- |  |  |
|--|--|
| 1. Идеальный эпигеном человека                           | - Здоровье человека                                      |
| 2. Изменения в эпигеноме без нарушений функций организма | - Предрасположенность к болезни или предболезнь человека |
| 3. Изменения в эпигеноме с нарушениями функций организма | - Болезнь человека                                       |

Примечания:

1. В пункте «а» тип исследуемой клетки должен быть одинаковым с типом клетки идеального эпигенома.
2. Регистрация отличий эпигенома исследуемого образца от идеального эпигенома.
3. Сравнение эпигеномов проще проводить на ДНК-чипах.

---

<sup>1</sup> Идеальный эпигеном, т.е. стандарт здоровья.

## **Глава 2. Протеом нормальной соматической клетки**

### **2.1. Протеом клетки – значение для медицины, ранней диагностики раковой клетки и излечения рака**

Скоро нынешняя медицина уйдёт в прошлое. Давняя мечта П. Эрлиха – иметь лекарство без нанесения вреда пациенту – «волшебную пулю», станет реальностью.

Оно будет уничтожать: при инфекциях – возбудителей, при раке – раковую стволовую клетку, не повреждая здоровых клеток, действуя на белок, вызывающий болезнь. Для каждого пациента будут создаваться индивидуальные лекарства. Это началось после открытия структуры генома человека.

#### Что мешало этому раньше?

Причина – нынешний принцип создания лекарств. Их открывают слепым подбором веществ-«кандидатов» на лекарства (А.М. Егоров, 2002). Механизм их действия тот же: действие на те же мишени в возбудителях, в раковой клетке – на её ДНК, повреждая её в той же степени и в окружающих здоровых клетках.

Но раковые клетки – клетки-организмы, очень живучи и коварны. Многие из них остаются не пораженными намертво включением гена MDR1 Р-гликопротеина: лекарства активно выводятся в межклеточную среду и клетки продолжают размножаться. Даже адресная доставка лекарств в раковые клетки, рассеянные по организму, но без подавления этого гена или белка, бессильна против них.

Выход из этого один: отказ от слепого способа создания лекарств, поиск в раковой клетке белков-маркеров и синтез против этих мишеней лекарств.

#### Что такое белок?

Белок-маркер раковой клетки находится на её поверхности, на нормальной клетке того же типа его нет. Все болезни начинаются с уровня гена и его продукта – белков. Простые белки или протеины состоят лишь из остатков аминокислот.

Белки или протеины известны с начала XIX в. Химики выбрали термин «протеины» для этих веществ, от греч. *πρωτεios* – «первый», так как в начале

XX в. стало ясно, что белки – главные участники всех жизненных процессов в клетке. После открытия структуры генома оказалось, что знания о нём можно применить на практике лишь: 1) через белки и 2) именно белки создают все свойства клетки. Любой белок – это продукт гена. В схеме это выражается так:

ген — иРНК — белки

При любой болезни в клетке, в частности, раковой, какой-то ген или гены изменены. Поэтому в её белках произойдут соответствующие изменения: 1) нет белка или его мало; 2) изменена первичная структура белка; 3) избыток нормального белка в клетке; 4) нет деградации дефектного белка в клетке.

### Что такое протеом?

Термин «протеом» образован от слова «протеин» и окончания слова «геном».

Протеом – это набор белков в данной клетке в определенный момент времени. Его изучает наука – протеомика.

Набор генов в каждом типе клетки один и тот же, а набор белков в клетке каждого типа свой. Причина в том, что в одном типе клетки активны одни гены, в другом – другие.

Сколько белков в нормальной клетке каждого типа – никто пока не знает. По некоторым данным в одной клетке может быть до 1 миллиона белков.

Учёные торопились открыть строение генома клетки для того, чтобы понять, какие белки участвуют в выполнении функций в нормальной клетке каждого типа и в дефектных клетках при различных болезнях.

### Как образуются белки?

Для синтеза белка с его гена снимается копия – иРНК. Этот процесс называется транскрипцией. До последнего времени считалось, что с каждого гена снимается копия одного белка. Теперь оказалось, что с различных участков гена снимается несколько копий – до 20, значит, синтезирован будет не один белок, а несколько.

Синтез белка происходит на рибосоме, иРНК, т.е. копия гена, является матрицей для синтеза белка. Этот процесс называется трансляцией. В нём участвуют и другие РНК.

Функции каждого белка зависят от: 1) порядка или последовательности аминокислот в белке и 2) его пространственной структуры, т.е. трёхмерной формы.

Порядок, в котором выстраиваются аминокислоты и какие аминокислоты, диктуются копией гена, т.е. иРНК. Это фрагмент из нуклеотидов, каждый из которых содержит одно из азотистых оснований, которых четыре: аденин, тимин, гуанин, цитозин.

Из трёх нуклеотидов в ряд образуется кодон и порядок оснований в нём диктует, какая из аминокислот будет синтезироваться. Например, участку копии гена Т-Т-Т соответствует аминокислота лизин, а участок цепи гена А-Ц-А – цистеину и т.д.

На рибосоме по последовательности оснований синтезируются аминокислоты, а они в той же последовательности соединяются в цепь – первичную структуру белка. Как транскрипция, так и трансляция осуществляются специальными ферментами, ген в этих процессах даёт только программу синтеза.

После синтеза этот продукт должен претерпеть ряд химических изменений и только после этого принимает пространственную структуру – трёхмерную форму. Только в такой форме молекула белка в состоянии выполнять свои функции в клетке.

Пространственная структура молекулы белка – это «все эти выпуклости, бороздки и изгибы, позволяющие белку реагировать с другими молекулами в клетке» (А.И. Арчаков, 2001). Очень часто дефект именно в этой структуре мешает белку выполнять свои функции в клетке. Информация о пространственной структуре каждого белка – своя, она постоянная и неизменная. Это опознавательный знак или пароль для иммунной системы. Любой незнакомый организму белок подлежит уничтожению.

На поверхности раковой клетки из-за эпигенетических изменений в ней имеются фетальные белки, которых нет на нормальной клетке этого же типа. Они «свои» для клеток иммунной системы, но являются белками-маркерами для диагностики раковой клетки.

На раковой клетке могут быть белки от мутации некоторых генов-супрессоров. Такие белки на клетке могут быть белками-антигенами, так как их синтез не закодирован в геноме организма-хозяина. Это метки или маркеры.

По метке иммунная система распознает раковую клетку, связывается с этим белком, уничтожает этот белок, а вместе с ним и его носителя – раковую клетку.

Считают, что отдельные раковые клетки иммунная система пациента способна уничтожать. Но против потомства раковых клеток, т.е. рака, обычно неэффективна. Это объясняют рядом причин.

В последнее время выяснено, что мутации генов в клетках иммунной системы способствуют «избеганию раковых клеток от клеток иммунной защиты». Такие клетки иммунной системы не способны бороться с раковыми клетками. Ключ к пониманию этого процесса может изменить подход лечения рака.

#### Функции белков в клетке

Все функции клетки каждого типа выполняют белки. Учёные это выражают так.

N.J. Anderson (1998) считает, что: «белки определяют активную жизнь клетки, а гены представляют собой только план этой активности».

Акад. А.И. Арчаков (2003) пишет, что информация в генах – «это знания того, что может быть», а знания о состоянии белков в клетке, – «это конкретное знание того, что есть».

А. Волков (2002): «гены – всего лишь –инструкция” или –схема”, по которой изготавливается подлинный –продукт” – протеины, т.е. белки».

В генах все определяет последовательность нуклеотидов, в белке – последовательность аминокислот.

Функции белков в клетке каждого типа: белки – это строительный материал; белки-переносчики различных сигналов; белки-рецепторы для переносчиков этих сигналов; белки – это антитела в организме; важнейшими среди всех белков в клетке являются белки-ферменты, катализирующие каждую химическую реакцию в клетке и др.

### Методы определения пространственной структуры молекулы белка

Белок устроен намного сложнее гена. Если ген составлен из четырёх видов нуклеотидов и его строение может быть записано в виде текста из четырех букв – А, Т, Г и Ц, то для записи строения белка нужен уже двадцатibuквенный алфавит.

Если генов в каждой клетке человека тридцать тысяч, хотя скорее всего будет больше, то различных белков – около миллиона. Ген лишь кодирует набор аминокислот – «молекулярных кирпичиков», из которых состоит молекула белка.

Линейная последовательность аминокислот в живой клетке сворачивается в молекулу белка со строго определенной для каждого белка пространственной структурой. Такой процесс самосборки называется фолдингом (от англ. to fold – сворачиваться). Этот фолдинг контролируется в клетке агрегатом из белков под названием «шаперон». По форме он напоминает «ведёрко». Он проверяет пространственную структуру у каждой молекулы белка.

Из-за повреждения гена нарушается конфигурация его молекулы белка. В таком случае «шаперон» это распознаёт, втягивает белок в «ведёрко», разворачивает молекулу в исходную цепь аминокислот и выбрасывает «на свободу», т.е. даёт ей попытку ещё свернуться правильно.

Процесс фолдинга для медицины имеет огромный интерес. Правильная структура белка обеспечивает правильную функцию, а нарушение пространственной структуры приводит к неспособности такого белка выполнять свою функцию, и как следствие, к возникновению патологии.

В настоящее время для определения пространственной структуры белка исследователи используют технологии, которые основаны на определении по-

ложения каждого атома в данном конкретном белке. В первую очередь это метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР), а также рентгеноструктурный анализ кристаллов белка.

В этом знании недавно сделан настоящий прорыв. В 2002 г. объявлены Нобелевскими лауреатами по химии специалисты в области масс-спектрометрии американец Дж.Б. Фенн и японец К. Танака, а также швейцарец К. Вютрих – специалист по проблемам ядерно-магнитного резонанса.

Учёные разработали методы, позволяющие быстро и надежно определять: какие белки содержатся в пробах, а также воспроизводить трёхмерное изображение молекул белков в растворе.

В заявлении при вручении премии было сказано, что награды «за успехи в понимании жизненных процессов», т.е. появляется возможность увидеть белковые молекулы и понять механизм их функционирования.

Учёные поясняют, – за разработку мощных аналитических методов для исследования больших молекул – белков, что может привести к появлению новых эффективных лекарств.

Считают, что именно эти учёные дали жизнь протеомике – познанию структуры и функций белков, их роли в поддержании жизни.

Дж.Б. Фенн и К. Танака ранее разработали метод для определения состава и размера больших биомолекул. До них масс-спектрометрия использовалась только для малых молекул.

Тогда же К. Вютрих создал метод, основанный на ядерном магнитном резонансе и позволяющим определять структуру белка.

В результате работ этих учёных стало возможным делать трёхмерное изображение молекул белка, а из этого понимание, как работает в клетке тот или иной белок. В настоящее время с помощью ядерного магнитного резонанса по методу К. Вютриха получают 20% всех «снимков» молекул белка. За эти открытия этих троих учёных называют – «отцы-основатели протеомики».



Но, принимая во внимание громадное количество атомов даже в простейшей молекуле белка, очевидно, что такие методы очень трудоёмки, длительны и дорогие, т.е. «не для нас» (А.И. Арчаков, 2000).

Поэтому учёные заинтересовались, можно ли предсказывать трёхмерную структуру белка, основываясь лишь на известной последовательности его аминокислот или генетического кода, который определяет последовательность аминокислот. Предсказание, какая молекула белка получится из последовательности азотистых оснований конкретного гена – одна из важнейших задач, встающих после определения генома человека.

Оказалось, что с помощью компьютерного моделирования становится возможным правильно предсказывать пространственную структуру белка.

Зная свойства аминокислот притягиваться или отталкиваться друг от друга и применив компьютерное моделирование, теоретически можно спрогнозировать и их расположение в пространстве. Число работ с использованием молекулярного моделирования растёт год от года, и на пути предсказания конформации молекул белка приближаются большие сдвиги. До сих пор неизвестно, почему конкретные белки выглядят именно так, а не иначе.

Используя пространственную структуру белка с помощью передовых технологий, позволило полностью отказаться от «метода проб и ошибок» в поиске новых лекарств – лиганд. Для нас – это поиск лекарств от раковых клеток.

Раковая клетка или клетки возникают в любом организме, даже у здорового человека. Она имеет аномальное строение и нарушенные функции. Её появление обусловлено каким-либо из канцерогенов: радиация, химические вещества, токсические продукты кислорода, а также ошибками в репликации генов и другими причинами.

Возникновение раковой клетки в организме – это ещё не болезнь, но её начало. Если она не будет уничтожена апоптозом, то из неё возникнет потомство клеток, т.е. рак.

Все белки раковой клетки кодируются геномом организма-хозяина, поэтому они не являются белками-антигенами. Исключение могут составлять белки, возникающие из-за мутации в гене-супрессоре раковой клетки.

Отсутствие белков-антигенов на поверхности раковой клетки или их мало и «слабые», – главные причины отсутствия ответа клеток иммунной системы на раковые клетки.

Если бы на раковой клетке были бы белки-антигены, то проблем излечения пациента от рака вообще не существовало бы.

Никакая бактерия или вирус извне, никогда не создадут таких трудностей в диагностике их и излечении от них пациента, какие создает раковая клетка, так как она – «возбудитель» изнутри, т.е. из клетки своего организма.

Как уже было сказано выше, каждый белок, в том числе чужеродный, выполняет определённую функцию в клетке. Наша задача заблокировать его действие или в другом случае восполнить функцию повреждённого белка.

#### Как можно заблокировать фетальный белок в раковой клетке?

Любой белок взаимодействует с другими белками или менее сложными веществами посредством активных зон. Эти активные зоны – как специализированные разъёмы, к которым возможно присоединение других веществ. Для того чтобы заблокировать белок, надо присоединить к его активной зоне некоторое вещество, т.е. молекулу, которая полностью погасит активность этой зоны, а также создаст прочную химическую связь с белком-мишенью, с тем, чтобы эта связь была неразрывна. Такое вещество, т.е. молекула, и называется лиганд.

Молекула-лиганд – это «слепок» с активных зон белка-мишени. Получив его – вот и «волшебная пуля» против раковой клетки. Однако это не совсем так: для каждого белка поиск лиганда требует множество опытов, что на практике занимает ряд лет.

Поэтому учёные и пришли к мысли – моделировать задачу химической реакции белка и лиганда на компьютере. Здесь компьютер в роли «электронной пробирки», в которой по заданным параметрам, проводится процесс отбора

нужных лигандов. На компьютере получают некоторые лиганды, которые он «примеряет» к белку-мишени, вычисляя параметры реакции каждого лиганда с этим белком.

Сейчас учёные приближаются к решению «обратной задачи» – не искать лиганд для известного белка, а определить белок-мишень по структуре избирательно связываемого им лиганда.

### Цели протеомики

1. Инвентаризация белков в нормальной клетке каждого типа; белки-маркеры данного типа клетки.

2. Пространственная структура всех белков нормальных клеток каждого типа и их функции; белки-рецепторы и белки-лиганды клеток.

3. Потенциальная способность белков взаимодействовать с другими молекулами в организме, например, лекарственные средства.

4. Поиск алгоритма формирования пространственной структуры белков в нормальной клетке.

5. Поиск белков, причастных к возникновению разных болезней у человека, в том числе белки, превращающие нормальную клетку в раковую. Эти белки – маркеры больной и дефектной клеток и мишени для воздействия на них лекарств.

6. Составление белковых тестов с помощью белковых микрочипов для ранней диагностики любой болезни, в том числе рака, в самом её начале и даже до её начала. Это есть II уровень ранней диагностики любой болезни, так как белок – это продукт гена.

На основе генов-мишеней и белков-мишеней лекарства и их дозы будут индивидуальными, т.е. для конкретного пациента. На основе белка-мишени можно будет создавать вакцины против любой болезни – для лечения и профилактики.

По изменениям генома раковой клетки будет определён её протеом. В нём будут опознаны белки, специфичные для раковой стволовой клетки, и рассчитана их пространственная структура. С помощью скрининга найдены лекар-

ства, избирательно связывающиеся с этими белками. Геномика найдёт гены-мишени в раковой клетке.

Прицельно действующие лекарства против генов-мишеней и белков-мишеней при различных болезнях – это «волшебные пули». О них мечтал сто лет назад великий П.Эрлих.

Как пишет акад. А.И. Арчаков (2002), рано или поздно генная и белковая диагностика болезней и, прежде всего раковых клеток, «станут массовыми» и окажутся «привычным делом, как анализ крови». Лекарства будут попадать точно «в цель», т.е. в ген-маркер и белок-маркер в дефектных клетках, поэтому, не вызывая побочных эффектов.

Сравнивая генные и белковые картины нормальной клетки данного типа и раковой клетки того же типа, можно будет оценивать эффект лекарств. И, наконец, сама медицина повернётся лицом к пациенту, став персонифицированной.

## **2.2. Сигнальный пептид Г. Блобеля, управляющий транспортом белков и их локализацией внутри клетки,<sup>1</sup> – значение для онкологии**

В клетке любого типа много отделов – органелл: ядро, митохондрии и др. Они окружены мембранами, как и сама клетка. В каждой клетке около миллиарда белковых молекул, т.е. белков разного типа.

ДНК клетки – это «чертёж» построения клетки, а белки – «строители» клетки. Перед делением клетки в ней удваивается набор всех белков для дочерних клеток.

Для белков характерно разнообразие пространственной укладки цепи, что порождает адекватное разнообразие функций белков. Есть белки в роли строительных элементов, белки-переносчики различных сигналов и белки-рецепторы для этих переносчиков, белки-маркеры для данного типа клетки и белки «агрессоры», которые атакуют клетки, несущие чужеродные маркеры. В конечном

---

<sup>1</sup> Сигнальный пептид или Zip-код – это продукт части гена данного белка.

счете, белки создают все свойства клетки и обеспечивают все её функции как части ткани.

В клетке постоянно происходит распад ненужных уже белков и замена их новыми путём их синтеза. После синтеза белки должны быть транспортированы из клетки или в её различные органеллы, проникая соответственно через их мембраны.

Эволюция каждого типа клетки закрепила за каждым белком после его синтеза то место, где ему положено находиться. Если это нарушается, то клетка не выполнит свою функцию или функции.

### Как вновь синтезированный белок находит своё место в клетке?

Этот вопрос был первым, на который ответил Г. Блобель – американский биолог.

Ещё в 1970-х годах он обнаружил, что каждый вновь синтезированный белок содержит в себе информацию о месте его в структуре клетки. Затем в течение 20 лет он изучал – чем является эта информация? В результате он открыл сигнальный пептид в молекуле каждого синтезированного белка.

Оказалось, что при синтезе каждого белка в рибосоме в его структуру закладывается сигнальный пептид или аминокислотный код, назвав его Zip-кодом. Ясно, что он транспортируется вместе с этим белком.

Сигнальный пептид – это короткая цепочка из нескольких аминокислотных остатков – от 10 до 30. Синтез белка в клетке начинается с сигнального пептида. Он прикреплен к белку на его конце – в виде «хвоста», либо внутри белка отдельными участками, а в глобулярном белке в виде единой части (Рис. 1).

Размер и структура сигнального пептида не для вида белка, а для определения его места в клетке; то есть для каждого белка он специфичен. Поэтому сигнальный пептид можно сравнить с «адресом» на почтовом отправлении или с «ярлычком» на багаже, где написано место, куда надо его доставить.

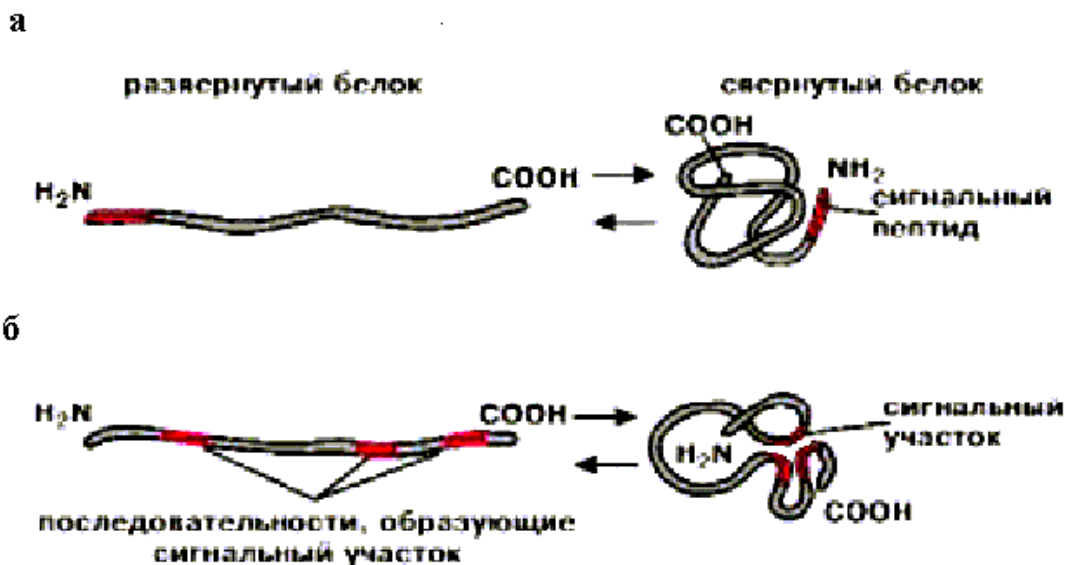


Рис. 1. Два варианта сигнального пептида: а – в виде «хвоста»; б – в виде отдельных участков (рис. и цит. по: В. А.Ткачук, Л. П. Белянова, 2000).

Так что сигнальный белок определяет судьбу каждого белка: направить ли его в митохондрию, и он проникнет в неё, в ядро клетки – для запуска экспрессии генов, или построить из него ионный канал или рецептор и встроить его в клеточную мембрану, или секретировать его в другие участки организма.

Но белок-носитель сигнального пептида, может быть по количеству аминокислот в нём, – большим и малым. Количество аминокислот может достигать от 50 до нескольких тысяч.

#### Как белок проникает через мембрану органеллы, и клеточную мембрану?

Этот вопрос был вторым, на который своими исследованиями также ответил Г. Блобель.

Оказалось, что сигнальный пептид служат пропуском для белка через мембраны. Это вторая функция сигнального пептида<sup>1</sup>.

На мембране органелл и клеточной мембране имеются специфические молекулы-рецепторы, проверяющие сигнальный пептид данного белка. Его структура комплементарна рецептору той органеллы, для которой этот белок предназначен.

При контакте сигнального пептида с рецептором происходит молекулярное узнавание: если их контакт подобен «застежке-молнии». В таком случае

<sup>1</sup> В литературе часто называют сигнальный пептид – «адресная метка».

мембрана пропускает в органеллу этот белок, признавая его «своим». По этому же принципу в органеллу не может проникнуть чуждая, т.е. «не своя» молекула белка, если при контакте не образуется подобия «застежке-молнии». Вот в чем причина удивительной избирательности белков, которая характерна для нормальной, т.е. здоровой клетки.

То же характерно для процесса выхода белка из клетки. Рецептор наружной мембраны клетки выясняет, каков сигнальный пептид у того белка, который хочет выйти из клетки, и делает возможным выход только того белка, сигнальный пептид которого комплементарен рецептору.

Доставка белка в клеточное ядро отличается от доставки какого-либо белка в органеллу. Белки, а их множество, попадают из цитоплазмы в ядро не через липидные слои его мембраны, а через водные поры. Но и здесь требуется механизм молекулярного узнавания. Эти поры работают, подобно клапану, т.е. способны открываться по сигналу от транспортируемого белка и закрываться, когда белок достигает ядерной плазмы.

Когда белок будет доставлен точно на своё место, сигнальный пептид отделяется от молекулы белка, так как уже не нужен. Его отщепляет специальный фермент – сигнальная пептидаза. В сигнальном пептиде кроме адреса доставки белка есть ещё фрагмент, который распознает пептидаза. Через него пептидаза отщепляет сигнальный пептид от белка. Это закрывает белку обратный путь.

Оказалось, что молекулярные механизмы транспорта белка в клетке универсальны: они одинаковы у всех эукариот – растений, дрожжей и животных.

#### В чём значение открытия?

1. Открыт сигнальный пептид, который управляет транспортом белка и его локализацией в клетке.

2. Молекулярные механизмы этих процессов в клетке – это наиболее уязвимые места для возникновения ряда болезней и не только наследственных. Г. Блобель предполагает, что какие-то нарушения в этих механизмах окажутся причиной превращения нормальной клетки в раковую клетку.

#### Возможные применения

1. Ошибки в участке гена сигнального пептида ведут к изменению локализации белка в клетке. Это может стать причиной возникновения некоторых генетических болезней. Изменением структуры этого участка гена можно устранить болезнь.

2. С помощью сигнального пептида можно определить, какие белки в данном типе клетки должны быть встроены в её мембрану. Это даст возможность обнаружить изменения в белках мембраны раковой клетки этого же типа.

3. К сигнальному пептиду и его белку можно присоединять молекулу лекарственного препарата для доставки его в нужное место клетки – в митохондрию, в её ядро и др. Это можно использовать для уничтожения раковой клетки. Однако прежде это лекарство требуется адресно доставить к раковой клетке, что намного труднее (А.С. Соболев, 2003).

4. Расширена возможность использования клетки как «фабрики белковых лекарств». Для этого ген необходимого белка можно соединить с участком гена сигнального пептида. Эту конструкцию затем клонировать, встроив в геном бактерии, – обычно кишечной палочки, для производства препарата (А.С. Соболев, 2003). Для этого больше годятся более сложные клетки – клетки дрожжей.

За открытие у белков сигнального пептида, управляющего их транспортом и локализацией в клетке, Г. Блобель в 1999 г. удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине.

### **2.3. «Убиквитин-опосредованное расщепление» «ненужных» белков в клетке – значение для онкологии**

Каждая клетка человека содержит множество разных белков. Общее их количество в клетке пока никто не знает. Цифры содержания белков в клетке называют разные: сто тысяч и более.



Белки в клетке каждого типа выполняют разные и очень важные функции: глобулины и другие белки – строят клетку, ферменты – регулируют химические реакции, белки-рецепторы и белки-лиганды к ним важны для передачи сигналов между клетками разного типа и др. Так белки обеспечивают все функции каждого типа клетки в организме человека. При этом каждая клетка живёт и выполняет свои функции, как часть ткани и организма в целом.

В каждом типе клетки геном один и тот же, но экспрессия генов в разном типе клетки разная. Экспрессия гена – это синтез его копии, т.е. иРНК, а по ней в рибосоме – синтез белка. Белки создают свойства клетки и её тип.

Многие десятилетия учёных интересовали детали синтеза белков разного типа в рибосомах. Знали, что в клетке белки могут уничтожаться ферментами – протеазами, но не знали, что каждый белок после выполнения функций уничтожается как «ненужный». Оказалось, что в клетке любого типа происходит не только регулируемый синтез белков, но и регулируемый распад белков.

К процессу распада белков в каждой клетке лишь немногие ученые проявляли интерес. Так, учёные – А. Цихановер и А. Гершко из Израиля, а также И. Роуз из США «пошли наперекор этой тенденции». Они в начале 1980-х гг. открыли важнейший процесс в клетке любого типа – регулируемый генами распад «ненужных» белков. Такой распад белков называют также – деградацией или расщеплением их.

Какой белок считается «ненужным»? Белок, выполнивший свои функции в клетке, относится к «ненужным», т.е. уже вредным. Клетка в этот момент должна от него избавиться. Это чётко звучит в работах о значении этого открытия.

В любой клетке белки постоянно деградируют и вновь образуются из аминокислот – «кирпичиков» белков.

Вред для клетки ненужного белка М. Ермолаева объясняет двумя причинами: 1) после выполнения функции этот белок уже не нужен и 2) нужно синтезировать новые белки, а «перегрузка клетки полипептидами может вызвать

апоптоз». Деградации подвергаются как белки цитоплазмы клетки, так и её ядра.

В определенный момент деградации в клетке подвергаются белки, регулирующие клеточный цикл, белки передачи сигналов в клетке и между клетками, белки репарации ДНК, белки для презентации антигена в комплексе с МНС-1, а также мутантные белки и белки дефектные после трансляции. Деградация или расщепление «ненужных» белков происходит в протеасомах.

Открытие учёных состоит в том, что белки, подлежащие распаду в клетке, помечаются специальной молекулой – убиквитином. Это полипептид – вещество из экстракта ретикулоцитов. Оно обнаружено во всех клетках, различных организмов, кроме бактерий. Отсюда и название нового вещества – убиквитин (ubiquitin – от лат. ~~ub~~ique” – «везде»).

В клетке каждого типа убиквитин выполняет роль надсмотрщика: помечает из всего множества белков такие, которые подлежат немедленному и безусловному уничтожению, как «ненужные» клетке белки.

На молекуле уничтожаемого белка крепится цепочка из четырех убиквитинов – мини-белков, состоящих из 76 аминокислот. То есть убиквитин – это метка или маркер на «ненужном» клетке белке. Белок с такой меткой через ряд этапов поглощается специальной органеллой в клетке – протеасомой, и в ней он разрушается на полипептиды длиной 5-24 аминокислот, которые высвобождаются из протеасомы, и в цитоплазме могут разрушаться до аминокислот протеазами.

Протеасома – это частица с протеолитической функцией. Протеасомой названы две частицы: 20S – расщепляет только короткие полипептиды, а 26S – до полипептидов.

Протеасома представляет собой полый цилиндр с каналом внутри. Из канала образуются три камеры: центральная – большая и две меньшие, – по краям. В центральной камере имеются каталитические центры, и там осуществляется расщепление белков.

Процесс распада белка очень избирательный и может быть обратим с момента прикрепления к белку маркера. Белок без маркера не уничтожается в клетке.

Если на белке будет в качестве маркера всего одна молекула убиквитина, то такой белок не подлежит деградации и регуляторы протеасомы не откроют отверстие протеасомы, ведущее в центральный канал.

Метка в виде цепочки молекул убиквитина для белка становится роковой – этот белок будет уничтожен. Для такого случая учёные, открывшие убиквитин, образно назвали его «поцелуем смерти». Наш учёный – проф. В.Л. Карпов (2004) употребляет другое название – «метка смерти».

Процесс присоединения убиквитина к «ненужному» белку происходит в несколько этапов. Он регулируется тремя ферментами – E1, E2 и E3. Типичная клетка человека содержит только один вариант фермента E1, несколько десятков видов фермента E2 и несколько сот видов – E3.

Белок-убиквитин не сам по себе определяет белок-мишень, который подлежит расщеплению. Оказалось, что такой белок-мишень «уже несёт признаки смерти: специфические сигналы», которые включают процесс расщепления или деградации.

Сигналами являются специфические участки в молекуле этого белка: внутри молекулы белка или на её N-конце. Как пишут Е.Б. Абрамова, В.Л. Карпов (2004) при определенных условиях эти участки становятся доступными для узнавания ферментом. Это делает фермент из семейства лигаз, т.е. «сшивающих» ферментов E3. Он их узнаёт и крепит на них цепочку молекул убиквитина.

1. Фермент E1 соединяется с убиквитином, что активирует комплекс. Это выражается в том, что одно звено на конце убиквитина выдвигается в поисках нужного белка. Для этого требуется энергия – АТФ.

2. Комплекс убиквитин-E1 взаимодействует с E2 и молекула убиквитина передаётся ферменту E2. Этот этап повторяется до тех пор, пока не создастся цепочка из нескольких убиквитинов, – не менее четырёх молекул убиквитина.

3. E3 распознаёт белок-мишень, который должен быть уничтожен. Он принимает убиквитин от E2, соединяется с белком-мишенью и «пришивает» к нему цепочку убиквитина (Рис. 1).

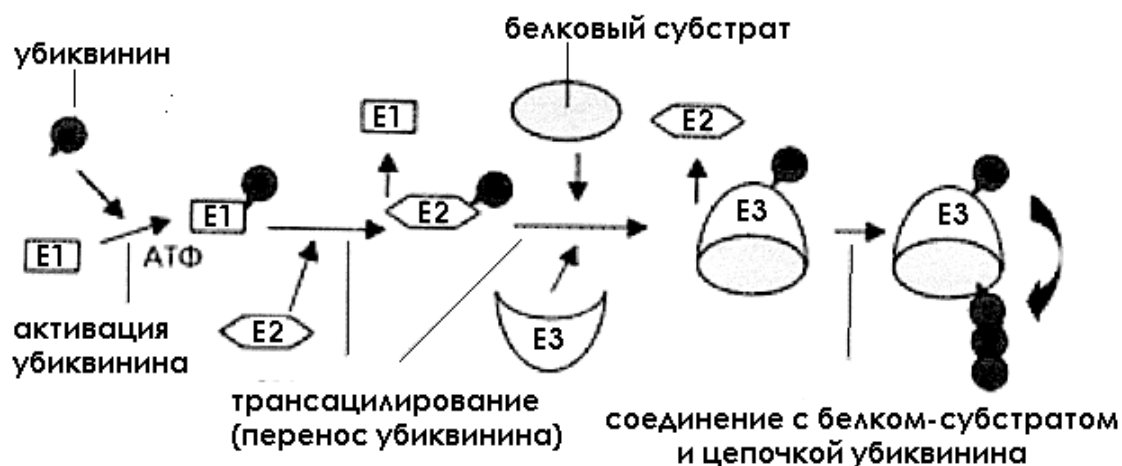


Рис. 1. Этапы образования цепочки белка-убиквитина и присоединения к нему белка-мишени (цит. и рис. из работы Е.Б. Абрамова, В.Л. Карпов, 2003).

4. Цепочку убиквитина узнаёт субъединица специального регулятора и связывается с ней, а значит с белком-мишенью. Этот процесс также требует АТФ.

Линейная молекула белка-мишени протягивается через регулятор, играющего роль «молекулярных ворот» протеасомы и через отверстие проникает в центральную камеру.

Белок-мишень расщепляется на полипептиды короткой длины, они высвобождаются из протеасомы и в цитоплазме разрушаются протеазами до аминокислот. Цепочка молекул убиквитина перед входом в протеасому отделяется и разрушается протеазами на мономеры (Рис. 2).

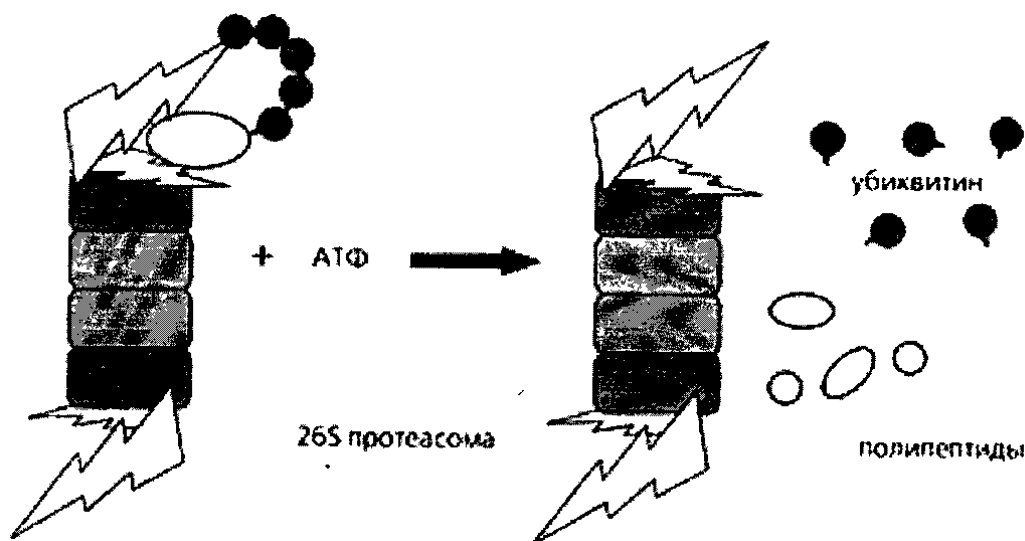


Рис. 2. Расщепление белка-мишени в протеасоме до пептидов и молекул убиквитина (цит. и рис. из работы Е.Б. Абрамова, В.Л. Карпов, 2003).

Так учёным впервые удалось открыть молекулярные причины регулируемого генами распада или деградация «ненужных» белков, а значит, вредных для ряда процессов жизни в нормальной клетке.

Белок-убиквитин регулирует в клетке время функционирования всех белков, удаляет из неё чужеродные и дефектные белки, создаёт в результате разложения белков полипептиды в качестве антигенов в комплексе с МНС I класса. По ним NK-клетки и Т-клетки иммунного контроля определяют в одних случаях, – здоровье клетки, в других – болезнь клетки.

Белок-убиквитин путём разложения «ненужных» белков в клетке управляет делением клеток, репарацией ДНК клеток, проверкой качества только что синтезированных белков в клетке, синтезом белков, участвующих в апоптозе клеток, а также в синтезе важных белков для иммунного ответа организма.

Сбои в работе убиквитина ведут к нарушениям в этих процессах, следствием чего является возникновение ряда тяжелых болезней, в частности, возникновения раковой клетки.

Теперь возможно понять на молекулярном уровне, как в клетке протекают важнейшие процессы путем избирательного действия белка убиквитина – разрушает «ненужные» белки, не трогая нормальные.

За открытие «убиквитин-опосредованного расщепления белков» в клетке, названные трое учёных, в 2004 г. были награждены Нобелевской премией.

Зная роль убиквитина в том или ином процессе в нормальной клетке, можно понять молекулярные причины возникновения определенных болезней. Влиянием на этот процесс при болезни, можно достигать её излечения, а также осуществлять профилактику болезни. Основным условием разработки методов лечения и создания лекарств является, конечно, понимание того, какой белок или белки являются причиной данной болезни.

В информации о вручении Нобелевской премии учёным, а также после этого ряд учёных сделали акценты на возможные пути применения в медицине этого открытия.

1. При вручении премии учёным было отмечено, что понимание убиквитина приведёт к созданию новых видов лекарств. Учёные будут изменять процесс, предотвращая выход из строя белков, либо заставляя клетку уничтожать те из них, которые приводят к болезням.

2. Р. Айкеда: «Открытие учёных имеет очень важное применение. Оно особенно важно, поскольку показало, что разрушение составных частей клетки поддаётся контролю. Каждый из элементов клетки должен оставаться в ней определённый отрезок времени, а потом выведен вовне подконтрольно, иначе он может стать канцерогеном».

3. Открытие, сделанное этими учёными, привело к созданию средства от рака в США под названием Velcade.

Как подчёркивают учёные, этот препарат «бьёт прицельно по больным клеткам. Ранее при лечении рака клетки убивались indiscriminately, что зачастую приводило к тяжёлым осложнениям и летальным исходам».

4. В. Грибанов: «Открытие лауреатов позволило понять на молекулярном уровне механизм регуляции ремонта ДНК, транскрипцию гена и управление качеством синтезируемых клеткой белков. Они также пролили свет на возникновение дефектов иммунной системы, которые приводят к ряду тяжёлых болезней, включая рак».

5. Наши учёные Е.Б. Абрамова, В.Л. Карпов (2003). «Сбои в деградации белков протеасомой нарушают равновесие между пролиферацией и апоптозом и этим служат причиной разных болезней». Они делят болезни на две группы: болезни, «обусловленные тем, что деградационная система не работает, и болезни, которые возникают из-за усиления её функции. Первые – это результат стабилизации субстратов», т.е. белков-мишеней, быстро разрушаемых в норме, «вторые, наоборот, аномально быстрого распада белков-мишеней».

а) Регуляция клеточного цикла. Клеточный цикл состоит из нескольких фаз, их смена регулируется белками-циклинами. Так как каждую фазу регулирует свой регулятор, – белок-циклин, жизнь его должна быть короткой. Это делает 26S протеасома.

Белки-циклины в качестве метки для узнавания ферментом E3 содержат разные участки в молекуле белка-циклина. Узнанный «по той или иной метке» регуляторный белок, т.е. циклин «сшивается» своим ферментом из семейства E3 с убиквитиновой цепочкой и разрушается 26S протеасомой. Исходя из этого, учёные подчеркивают, что «сбой в её работе вызовет остановку клеточного цикла в той или иной фазе».

б) Перерождение нормальной клетки в раковую клетку. В нормальной клетке белки скорости транскрипции, определяют во многих случаях судьбу этой клетки: станет ли делиться как нормальная клетка, пойдёт ли по пути бесконтрольного деления, как раковая клетка, или будет разрушена, как опасная клетка.

Поэтому регуляторные белки могут быть или белками, вызывающими неконтролируемое деление клетки, или, наоборот, белками-онкосупрессорами.

Пример. Белок p53. Его уровнем в нормальной клетке удерживается равновесие между делением и апоптозом. Но ситуация может меняться, например, при заражении человека вирусом папилломы. Его белок E6 находит белок p53 и подаёт сигнал ферменту E3 присоединить к p53 цепочку убиквитинов. Фермент выполняет свою функцию, и p53 становится белком-мишенью для деградации

протеасомой. В результате его быстрого разрушения нормальная клетка перерождается в раковую.

в) Иммунная система. 26S протеасома участвует в иммунном ответе клетки. Она расщепляет аномальные или чужеродные белки до полипептидов, некоторые из них – короткой длины аминокислот, выставляет в качестве антигенов. Такие полипептиды в цитозоле клетки соединяются с белком-транспортёром и переносятся в эндоплазматический ретикулум. Там они взаимодействуют с белками МНС1 и переносятся на поверхность клетки. Как незакодированные в геноме этой клетки белки-антигены, их обнаруживают Т-клетки иммунной системы и разрушают эти клетки, так как в них синтезируются необычные для них белки.

6. Исследования учёных из разных стран показали, что от того, как функционирует в клетке белок-убиквитин, которого некоторые учёные называют клеточный «дворник», зависит продолжительность фаз деления клеток, т.е. клеточный цикл, репликация ДНК перед делением клетки, структура хромосом. И когда в работе «дворника» случаются неполадки, возникают тяжёлые болезни.

Так, сбой в деградации белка, отвечающего за разделение хромосом в процессе деления клетки, приводит к неправильному числу хромосом в дочерних клетках. Это может быть причиной превращения нормальной клетки в раковую клетку, а также вызывать другие болезни.

Понимание молекулярного механизма разрушения «ненужных» белков может быть полезно для лечения рака и ряда других болезней путём уничтожения определенного белка введением протеасомных стимуляторов. В других случаях, уменьшать или увеличивать содержание того или иного белка в дефектной или больной клетке.

Итак, процесс распада молекул белка в клетке интересовал учёных в течение многих десятилетий значительно меньше, чем синтез белка.

Теперь оказалось, напрасно: нарушения в молекулярных механизмах расщепления белков в клетке, а значит, в организме человека, могут привести к последствиям не менее тяжёлым, чем сбои в синтезе новых молекул белка.



Учёные открыли такой молекулярный механизм, который может ликвидировать угрозу любой болезни в зародыше, уничтожая опасные белки.

По этой причине Шведская академия наук заявила, что это открытие в будущем «даст возможность побороть рак: знания химических механизмов помогут создать нужные лекарства».

## **Глава 3. Нормальная соматическая клетка**

### **3.1. Смертность нормальной соматической клетки: молекулярные причины**

В 1891 г. известный биолог А. Вейсманн (A. Wesmann) впервые предположил, что соматические клетки животных и человека «должны иметь ограниченный потенциал деления», т.е. они смертны. Но учёный не дал подтверждений этому предположению.

Знания о том, что соматическая клетка того или иного типа у человека смертна или бессмертна очень важно для понимания раковой клетки.

Для решения вопроса – смертна или бессмертна сама по себе нормальная клетка, имеются два метода:

1) нормальную клетку после выделения из ткани организма можно перенести на питательную среду, т.е. в культуру и проследить её способность к размножению;

2) нормальную клетку из ткани организма можно пассировать на изогенных лабораторных животных, пометив её специфическим маркером для отличия от нормальных клеток хозяина.

По наличию размножения клетки можно сделать вывод – смертна или бессмертна нормальная клетка.

В начале XX в. А. Каррель – известный специалист по культуре клеток, – изучал этот вопрос в культуре фибробластов, взятых из сердца цыпленка.

По его данным, фибробласты в культуре имели неограниченную способность к размножению, т.е. они бессмертны. Это было признано открытием. Но оно просуществовало до 1961 г., когда было доказано, что это не так.

В 1961 г. Л. Хейфлик и П. Мурхед (Hayflick L. and Moorhead P.S.) на нормальных фибробластах от человека показали ограниченную способность фибробластов в культуре к делению, т.е., что они смертны. Перед началом своих опытов они исключили все артефакты и неадекватные условия культуры для изучаемых клеток.

В этих опытах учёные обнаружили, что фибробласты от эмбриона человека были живыми, т.е. удваивались в числе, в среднем до  $50 \pm 10$  раз. Чем старше донор, тем меньше удвоений делали взятые от него клетки. Фибробласты от человека 20 лет, уже делились только  $30 \pm 10$  раз. К концу среднего срока ни одна клетка уже не делилась, и клетки гибли. Этим было доказано, что нормальные клетки человека имеют ограниченную продолжительность жизни.

Предел числа деления нормальной клетки –  $50 \pm 10$ , в литературе стали обозначать словами – «лимит Хейфлика».

В другом опыте учёные хранили часть клеток в жидком азоте при температуре  $-190^\circ$  ниже нуля. В таких условиях клетки могут храниться сколько угодно. Но как только фибробласты оттаивали и помещали в питательную среду, они снова начинали делиться. При этом оказалось, что клетки «считают», сколько удвоений у них было до того, как их поместили в холодильную камеру, так как доводят число удвоений до положенного значения –  $50 \pm 10$ . Например, клетки, помещённые на хранение после 30 делений, удваивались ещё, но только 20 раз. Это означает, что причина ограниченного числа делений нормальной клетки, а затем её смерть, является «внутренним свойством» самой клетки. Но какая причина делает клетки неспособными к делению и затем приводит их к смерти, учёные не смогли установить.

На основе анализа процесса репликации ДНК, проф. А.М. Оловников – предположил, что с каждым делением клетки «как-то меняется длина её ДНК». Если это так, то причина «лимита Хейфлика» должна быть в процессе, который происходит в области концов каждой из цепей ДНК во время её удвоения перед делением клетки. Так он в 1971 г. впервые в мире предсказал причину ограниченного числа деления нормальной клетки, предложив гипотезу – «маргинотомии». От лат. слова *margo* – край и греч. *to me* – отсечение, то есть усечение копии ДНК с краёв.

Цепи ДНК расходятся, и на каждой из цепей достраивается её копия с помощью фермента ДНК-полимеразы. Ясно, что цепь исходной ДНК – это матрица, по ней строится дочерняя цепь путём комплементарного связывания азо-

тистых оснований. В результате перед делением клетки удваивается ДНК, а с этим и хромосома.

В своей гипотезе учёный исходил из того, что фермент ДНК-полимераза – это не «точка», а объёмная молекула. Её каталитический центр достраивает дочернюю цепь ДНК, но занимает «лишь ничтожную часть молекулы». Остальные участки фермента каталитически неактивны. С их помощью фермент узнаёт матрицу и движется по ней, но в копировании цепи ДНК эти участки «не заняты».

По причине неактивных участков фермент синтезирует копию цепи: «либо не с самого начала матрицы (Рис. 1), либо не до самого её конца» (Рис. 2). В результате дочерняя цепь получается короче, чем матрица. Поэтому после каждого деления дочерние клетки получают «в наследство» всё более короткие молекулы ДНК. В этом и заключается «усечение копии ДНК с краев».

Еще в 1932 г. Нобелевский лауреат Г. Мюллер задолго до открытия структуры ДНК, понял, что концевые участки хромосом содержат материал, защищающий проксимально расположенные гены от разрушения. Он назвал эти концевые структуры теломерами (от греч. – telos – конец, meros – часть, доля).

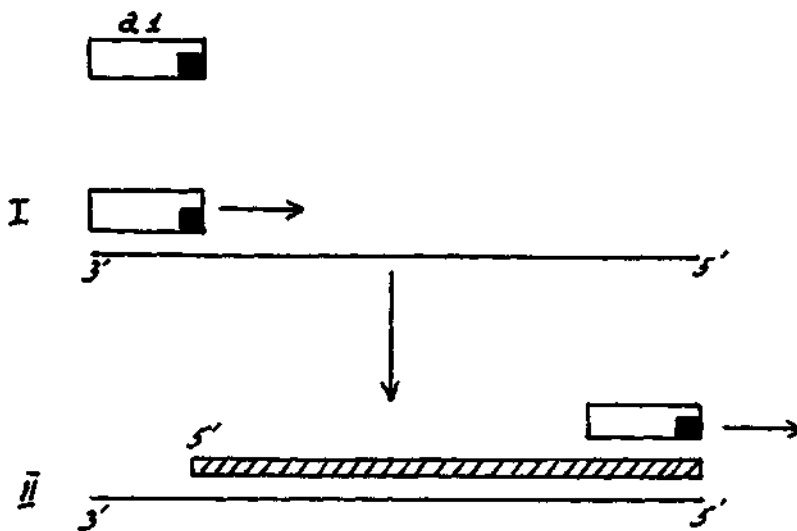


Рис. 1. Схема проксимальной маргинотомии ДНК.  $a_1$  – молекула ДНК-полимеразы с «правокраевым» расположением каталитического центра (рис. и цит. по: А.М. Оловников, 1971).

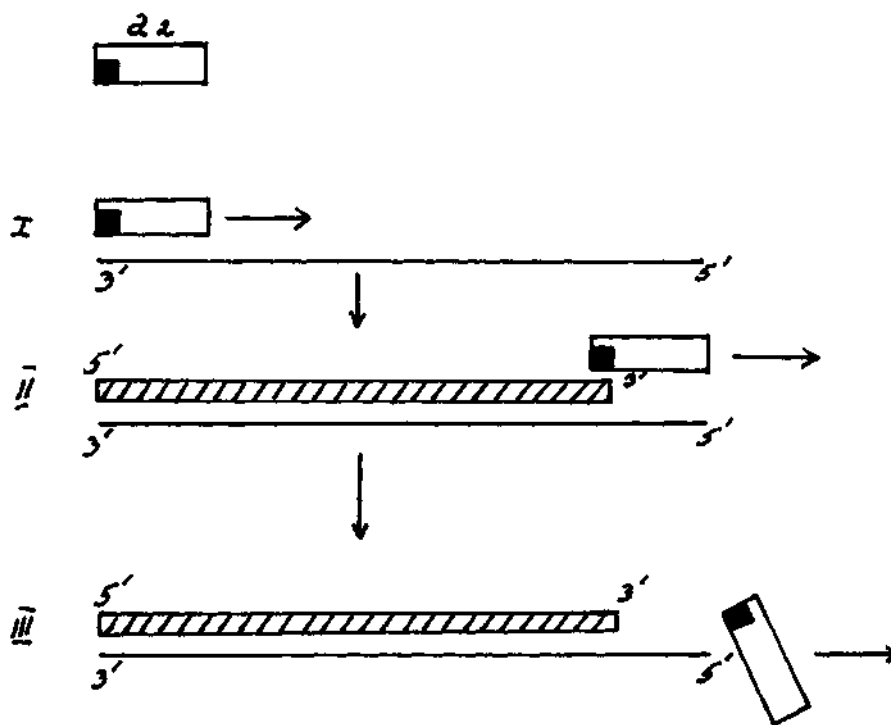


Рис. 2. Схема дистальной маргинотомии ДНК.  $a_2$  – молекула ДНК-полимеразы с «левокраевым» расположением каталитического центра (рис. и цит. по: А.М. Оловников, 1971).

По мнению А.М. Оловникова, усечение копии ДНК не дойдёт до «исчерпания всей длины ДНК, а значит хромосомы», клетка перестанет делиться и погибнет раньше. Он допускал, что на концах ДНК находятся «буферные» гены, которые не кодируют белки, а лишь «страхуют клетку». Концевые гены называли телогенами. На каждом конце хромосомы находится по одному телогену. Гены, кодирующие белки, расположены ближе к середине хромосомы; если усечение не затрагивает их, клетка будет функционировать нормально.

«Буферный» ген состоит примерно из 50 сегментов. В процессе маргинотомии сегменты телогена утрачиваются. А.М. Оловников даже предположил, как это происходит. В процессе каждой репликации не воспроизводится крайний сегмент телогена, и так к 50-му делению клетки все сегменты телогена расходуются. Вместе с этим клетка утрачивает способность удваиваться, затем погибает.

Итак, маргинотомия ДНК в процессе деления нормальной клетки,— это и есть молекулярная причина и «счётчик» ограниченного числа деления, старения и смерти нормальной клетки.

Маргинотомия или укорочение теломер молекулы ДНК является повреждением ДНК клетки. Поэтому считают, что гибель клетки после «лимита Хейфлика» происходит через апоптоз. Это имеет биологический смысл: клетки всех тканей должны обновляться, иначе живое не может существовать. Так что природа живого предусмотрела ограничение числа делений нормальной клетки и её гибель с этой целью.

При репликации дочерней молекулы ДНК в качестве матрицы используется одна из ее цепей: нематричная — для одной дочерней молекулы ДНК, матричная — «стяжками Оказаки назад» — для другой. Предположение нашего учёного — проф. А.М. Оловникова о том, что репликация ДНК с помощью ДНК-полимеразы всегда происходит с укорочением концов дочерней молекулы, а значит и хромосомы, многие учёные называют открытием «на кончике пера» (А.Г. Голубев, 1996). Это предположение было подтверждено в 1972 г. Д. Уотсоном (J.D. Watson, 1972). Он учёл другую особенность фермента при репликации ДНК, но с теми же последствиями, что предсказал А.М. Оловников.

Оказалось, что ДНК-полимераза не может синтезировать копию из нуклеотидов ни нематричной, ни матричной цепи, а может только достраивать уже существующую короткую цепочку нуклеотидов и только с 3'-конца растущей цепи ДНК. Что из себя представляет эта короткая цепочка нуклеотидов, и кто её синтезирует?

Это короткая цепь из 10 до 20 нуклеотидов, комплементарных материнской цепи, т.е. матрице, и называется затравкой. Она образует начальный 5'-концевой участок дочерней цепи. Её синтезирует другой фермент — РНК-полимераза, называемая праймазой (от англ. primer — затравка). ДНК-полимераза присоединяется к 3'-концу затравки и удлиняет дочернюю цепь комплементарными нуклеотидами в направлении от 5' к 3', но с 3'-конца затравки (Рис. 3).

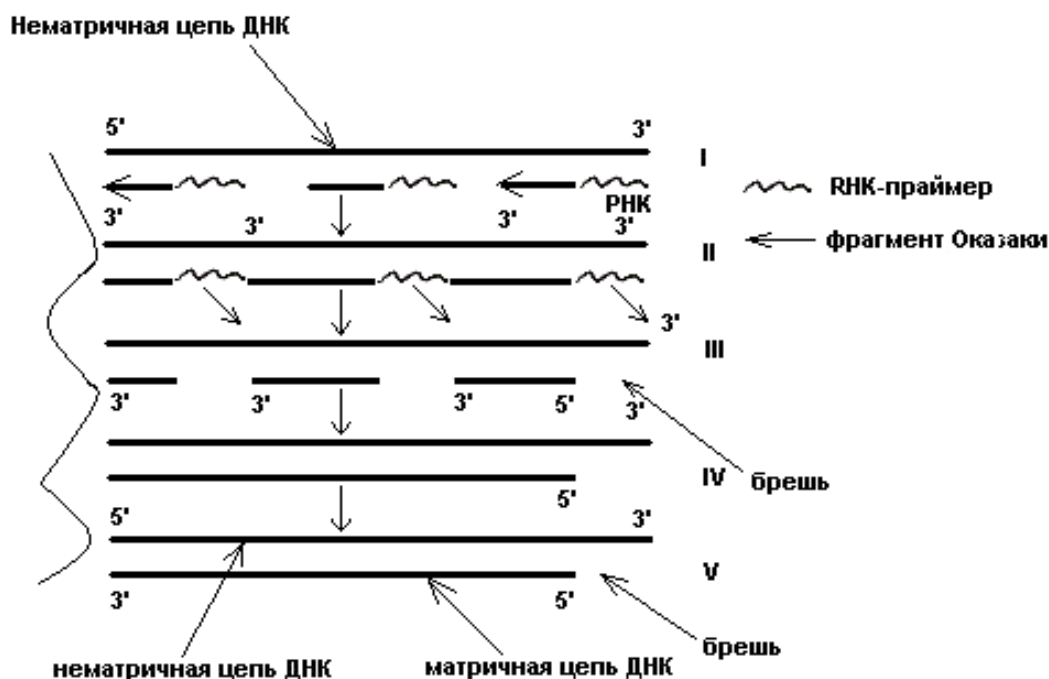


Рис. 3. Репликация нематричной цепи ДНК: I-II – достраивание нуклеотидами 3'-концов праймерами на нематричной цепи материнской ДНК; II-III – выщипление рибонуклеотидов праймерной РНК; III-IV – заполнение брешей от праймерной РНК, начиная от 3'-концов фрагментов Оказаки; V – дочерняя ДНК с укороченной нематричной цепью (рис. и цит. по: А.Г. Голубев, 1996).

После репликации дочерней цепи молекулы ДНК, крайняя затравка удаляется, т.е. выщипляется специальным ферментом. В матричной цепи также удаляется затравка из фрагментов Оказаки.

Удаление самой крайней затравки приводит к тому, что дочерняя цепь как нематричной, так и матричной цепи оказывается короче на длину затравки, т.е. на 10-20 нуклеотидов. В результате 3'-конец нематричной цепи материнской ДНК остается недореплицированным, а 5'-конец матричной цепи дочерней молекулы ДНК оказывается укороченным на длину затравки.

В результате этой особенности репликации, ведущей к укорочению 5'-конца дочерней цепи, 3'-конец нематричной цепи в дочерней молекуле ДНК получается ни с чем не спаренным и образует выступающий 3'-конец материнской цепи, его называют 3'-оверхенг. В нормальной клетке этот одноцепочечный конец уничтожается каким-либо ферментом, в результате дочерняя моле-

кула укоротится с конца, а значит, укоротится перед делением клетки и хромосома.

Ясно, что с каждой последующей репликацией перед делением нормальной клетки, концы цепей дочерней молекулы ДНК – 3'- и 5'-конец – укорачиваются на величину затравки (Рис. 4).

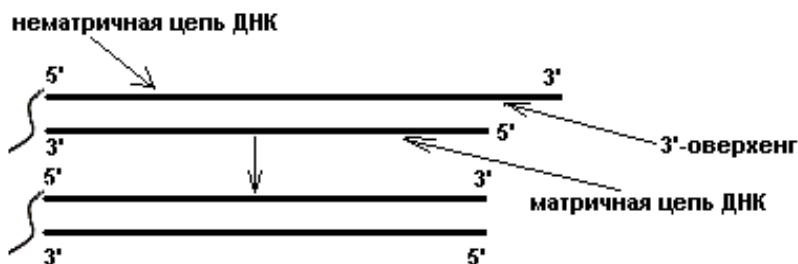


Рис. 4. Уничтожение выступающего 3'-конца нематричной цепи в дочерней молекуле ДНК. В результате: укорочение 3'- и 5'-го конца цепей в дочерней молекуле ДНК на одинаковую длину.

Итак, то, что считалось сегментом телогена, теперь это – РНК-праймер, а телоген – это теломера, или теломерная ДНК.

Г. Мюллер (1932) раньше всех понял, что теломеры на концах хромосомы предохраняют хромосому от разрушения. Но многие годы о теломерах больше ничего не было известно, в частности, из чего они состоят.

Лишь в конце 1970-х – начале 1980-х годов американские генетики Е. Блэкберн и Дж. Голл открыли строение теломеры.

Оказалось, что теломера в хромосоме человека – это гексануклеотид с тиминном на 5'-конце и целиком из гуанина – на 3'-конце, т.е. – ТТАГГГ. Эта последовательность создаёт концы молекулы ДНК, а в комплексе с белками, – концы хромосомы.

ТТАГГГ создаёт фрагмент Г-цепи, а комплементарные ему основания – фрагмент Ц-цепи. Такой двухцепочечный фрагмент многократно повторяется и создаёт концы молекулы ДНК, а в комплексе с белками – концы хромосомы. В литературе употребляются равнозначные термины – теломера или теломерная ДНК.



Именно теломера укорачивается на длину РНК-праймера при каждой репликации цепи перед делением клетки. Но укорачивается теломера, а гены при этом обычно не страдают.

Укорочение теломеры на величину праймера каждый раз перед делением клетки – это метка, указывающая сколько ещё клетке осталось делиться, то есть жить.

Нормальная клетка прекращает делиться, когда её теломеры становятся слишком короткими, чтобы защитить концы хромосом от склеивания или их неправильного распределения – анеуплоидии и пр. На этом этапе в клетке возникает сигнал на самоуничтожение, т.е. апоптоз, а не тогда, когда теломеры полностью «расходятся».

Потери теломеры на 10-20 нуклеотидов при каждом делении нормальной соматической клетки, позволяют ей делиться, т.е. жить не более «лимита Хейфлика»:  $50 \pm 10$  раз.

Итак, предположение немецкого биолога А. Вейсманн (1891) о том, что способность нормальной клетки к делению «не вечна, но ограничена», впервые нашло подтверждение в 1961 г. в работе Л. Хейфлик с П. Мурхедом в опытах с нормальными клетками в культуре. Однако, выяснить причины этого явления им не удалось.

В 1953 г. была открыта структура молекулы ДНК и, исходя из неё, был объяснен механизм ее репликации, которая необходима любой клетке перед её делением.

Однако, в 1971 г. наш учёный, ныне сотрудник Института биохимической физики РАН, проф. А.М. Оловников, впервые обратил внимание на то, что ДНК-полимераза «не в состоянии» полностью копировать концы цепочек нуклеотидов молекулы ДНК. Следствием этого должно быть укорочение, т.е. недорепликация ДНК перед каждым делением нормальной клетки. Это и оказалось молекулярной причиной ограниченного числа деления нормальной клетки любого типа – лимит Хейфлика.

Проф. А.М. Оловников предсказал и способ, которым клетка могла бы решать эту проблему: «наращивание некодирующей белок последовательности нуклеотидов, которую не жалко было бы потерять при репликации» (акад. В.П. Скулачёв, 1997).

По его мнению, для наращивания нуклеотидов необходим особый фермент. В 1985 г. его открыли другие учёные, – это фермент теломераза.

Понимание механизма работы и регуляции этого фермента позволит учёным глубже проникнуть в сущность процессов старения и бессмертия раковой клетки.

Акад. В.П. Скулачёв (1997) писал так: «Работа А.М. Оловникова – один из немногих примеров, когда блестящая мысль отечественного учёного не осталась забытой, но, к сожалению, получила развитие, не у нас в стране, а за рубежом, причем приоритет автора общепризнан и нигде не подвергается сомнению».

### **3.2. Передача сигнала извне для деления нормальной клетки**

Организм взрослого человека из  $5 \cdot 10^{13-14}$  клеток (В.Н. Сойфер, 1998 и др.). По признакам структуры и функции эти клетки разделены на типы, – их более 200.

Функции любого типа клетки в многоклеточном организме определяются генами через их продукты – белки. В разных клетках имеет место экспрессия разных генов, остальные гены «молчат». Клетка в организме – его часть; своими функциями она вносит свой вклад для нужд организма как целого. Так что в жизни клетки каждого типа определено: «что ей позволено, а что – нет» (Е.Д. Свердлов, 1999).

Деление клетки, т.е. размножение, – признак того, что она живая. Этим свойством старые и дефектные клетки ткани заменяются новыми, а, значит, обновляется организм. Без этого многоклеточный организм не может жить.

В организме нормальная клетка может делиться лишь после получения сигнала к делению. Без сигнала ей это «запрещено» генами.

Любое свойство клетки определяется микросредой, окружающей клетку. В состав этой среды входят: 1) соседние клетки, с которыми она связана молекулами; 2) внеклеточный матрикс – продукт самих клеток; с ним клетка также связана молекулами; 3) жидкая среда – тканевая жидкость, кровь и лимфа (Ю.М. Васильев, 1997).

Для деления клетка получает сигнал из микросреды – из тканевой жидкости, от клеток-соседей и от внеклеточного матрикса.

Чем является сигнал для клетки в организме? Это сигнальная молекула, иначе – молекула-лиганд. Для размножения клетки ей нужны молекулы-лиганды. Среди них – это молекулы фактора роста и цитокины. С химической точки зрения, это белки. Через молекулы-лиганды клетки разного типа осуществляют связи между собой, обмениваются информацией и этим создают многоклеточный организм как единое целое.

Откуда берутся молекулы-лиганды для нормальной клетки? Они не синтезируются в самой этой клетке. Они синтезируются в других клетках, выделяются из них и мигрируют к другим клеткам, в том числе и к ней.

Это важно для отличия нормальной клетки от раковой клетки.

Что нужно, чтобы молекула-лиганд подействовала на клетку? Для этого нужна молекула-рецептор на клетке, на которую будет действовать молекула-лиганд.

В клетке разного типа синтезированный белок обычно своей частью выставляется на поверхность клетки. Это продукт генов данного типа клетки. Белки данного типа клетки своего рода антенны – это и есть молекулы-рецепторы. Они определяют набор молекул-лиганд, с которыми может реагировать клетка данного типа. Реагирование клетки означает, что её молекула-рецептор будет узнавать в межклеточной среде свою молекулу-лиганд и соединяться с ней. Молекула-лиганд своей поверхностью комплементарна поверхности молекулы-рецептора, т.е. подходит, как субстрат к своему ферменту. Если

клетка не имеет специфического рецептора, она «слепа» в отношении этого сигнала. Клетку, способную воспринимать свой сигнал, называют клеткой-мишенью.

Что представляет собой молекула-рецептор? Это молекула белка, например, ростового фактора. В ней различают три части: внешняя часть – на поверхности мембраны клетки, контактирует с межклеточной жидкостью; средняя часть – пересекает насквозь мембрану клетки, и внутреннюю часть – выступает в цитоплазму клетки (Рис. 1).



Рис. 1. Схема строения молекулы-рецептора.

Для деления нормальной клетки молекулой-лигандом обычно являются факторы роста (GF): эпидермальный фактор роста (EGF), тромбоцитарный фактор роста (TGF), интерлейкины 1, 2 и др. Но только прохождение фазы  $G_1$  клеточного цикла стимулируется такими митогенами. У многих молекул-рецепторов внутренняя часть является ферментом – протеинкиназой. Функция киназы – присоединять фосфатную группу к белку и этим активировать его. Другие ферменты фосфатазы отщепляют фосфатную группу и этим прекращают активность белка.

Так как для деления клетки необходима репликация её ДНК, а также ряд белков, в том числе ферменты, то ясно, что путь передачи сигнала к делению начинается на мембране клетки и заканчивается в ядре клетки (Рис. 2).

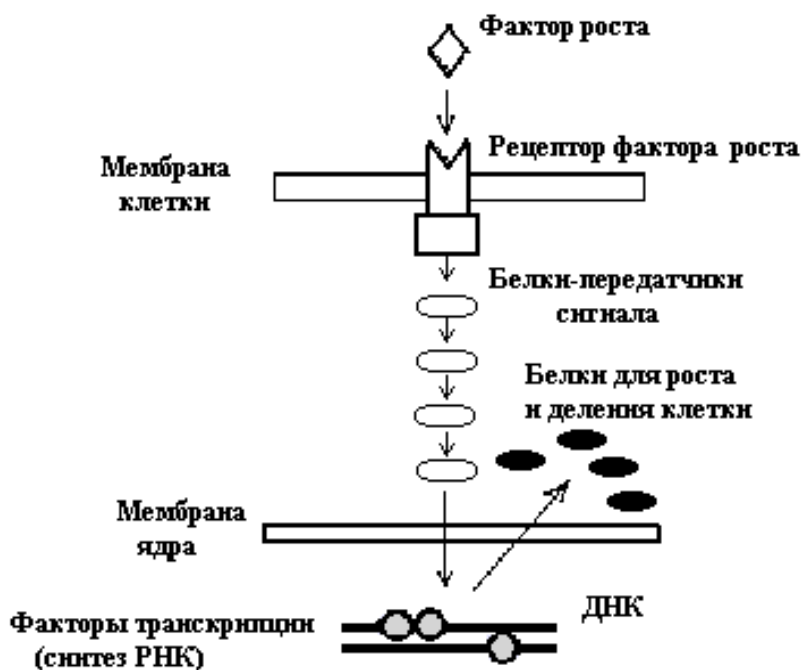


Рис. 2. Схема этапов передачи сигнала для деления клетки (рис. и цит. по: Г.П. Георгиев, 1999) с изменениями.

1-й этап. Молекула-рецептор своим участком связывается с молекулой-лиганд. Это вызывает аллостерическое изменение внутренней части молекулы-рецептора. Изменение формы этой части активирует рецептор (Рис.3).

2-й этап. Протеинкиназа активирует цепочки белков в цитоплазме присоединением к белку фосфатной группы, активируя его; он активирует следующий в цепочке белков и т.д.

3-й этап. Передача сигнала активированным белком переходит в ядро клетки. Там активируются белки транскрипции для синтеза иРНК и др. иРНК после выхода из ядра направляются в рибосомы, где по ним синтезируются новые белки для следующего деления клетки, в ядре – синтез ДНК, т.е. её репликация и затем деление клетки.



Рис. 3. Схема связывания рецептора с молекулой-лигандом.

Все этапы передачи сигнала в клетке обратимы, как только молекула-лиганд отделяется от рецептора или в результате распада самой молекулы-лиганда. Обратимы также и промежуточные этапы цепи передачи сигнала – путём удаления фосфатной группы с белка.

Передача сигнала извне для деления нормальной клетки регулируется рядом генов через их продукт – белки. Эти белки в нормальной клетке являются молекулой-лигандом, молекулой-рецептором, протеинкиназой C и белками цепочки передачи сигнала в цитоплазме, а в ядре – белками транскрипции.

Это были обычные белки-рецепторы для вызова ответа нормальной клетки.

Но на мембране клетки имеется также универсальные белки-рецепторы, сопряженные с G-белком, их обозначают – GPCR, от англ. G-protein coupled receptor. Он реагирует на молекулу-лиганд любого типа.

GPCR – это белок, полипептидная цепь которого семь раз пересекает мембрану клетки. В нём два участка: с внешней стороны мембраны участок, вылавливающий молекулу-лиганд, а участок, контактирующий с G-белком, – на её цитоплазматической стороне.

Его действие на клетку реализуется по химическому сигналу к внутриклеточным мишеням через G-белок. Пока с активным центром GPCR не свяжется молекула-лиганд, он находится в неактивном состоянии – «выключен». Причина: нет контакта его участка с G-белком. Результат – нет ответа клетки (Рис. 4).



Рис. 4. GPCR в клетке «выключен». Нет ответа клетки (рис. и цит. по: Т. Кенакин, 2007).

GPCR «включается», когда молекула-лиганд связывается с его активным центром, и тогда участок его молекулы связывается с G-белком. Этот белок активируется и посылает сигналы клетке. Результат – возникает ответ клетки (Рис. 5).



Рис. 5. GPCR в клетке «включен». Есть ответ клетки (рис. и цит. по: Т. Кенакин, 2007).

Знания о функциях GPCR и G-белка в нормальной клетке важны для понимания нарушений в раковой клетке. Эти молекулярные структуры становятся новыми мишенями для создания селективно действующих лекарств, уничтожающих раковые клетки.

## **Глава 4. Раковая соматическая клетка**

### **4.1. Бессмертие раковой соматической клетки: молекулярные причины**

В организме человека есть некоторые типы клеток, которые преодолевают недорепликацию ДНК перед делением и поэтому способны размножаться бесконечно, т.е. становятся бессмертными. К таким клеткам относятся: половые и стволовые клетки, лимфоциты, делящиеся во время иммунного ответа, и опухолевые клетки, в том числе, раковые клетки.

В 1971 г. наш учёный – проф. А.М. Оловников предсказывал, что может быть фермент, который позволяет раковой клетке преодолевать «лимит Хейфлика» при делении, и так становиться бессмертной. Его предсказание сбылось спустя 14 лет.

В 1985 г. С. Грейдер и Е. Блэкберн (Greider C.W., Blackburn E.N.) обнаружили такой фермент. Он удлинняет теломеру, т.е. G-цепь после каждого деления раковой клетки. Поэтому этот фермент был назван учёными теломеразой.

Теломераза – это комплексный фермент, кодируемый несколькими генами. Он состоит не только из белка, а включает ещё и участок РНК. Этот фермент находится в цитоплазме клетки и регулирует длину теломер, т.е. наращивает на концах молекулы ДНК многократно повторяемый гексануклеотид – ТТАГГГ. Общая длина их может достигать 10 тысяч пар нуклеотидов. В комплексе с белками такие повторы образуют теломеры, защищающие концы ДНК от экзонуклеаз, неправильной рекомбинации и позволяющие концам хромосомы прикрепляться к оболочке ядра. За счёт активности теломеразы раковая клетка может делиться, т.е. жить как в организме хозяина, так и на питательной среде, без конца.

Теломераза – это обратная транскриптаза или ревертаза, подобная той, что имеется в ретровирусах. С её помощью матричный синтез фрагмента G-цепи идёт по участку теломеразной РНК. У человека теломеразная РНК состоит из 460 нуклеотидов и включает последовательность 3'-ЦУААЦЦУААЦ-5'.



Матричный участок в РНК теломеразы представлен только один раз. Его длина не более двух повторов, т.е. G-фрагмента цепи.

Теломераза синтезирует G-фрагменты много раз, используя только один матричный участок своей РНК. Поэтому она обладает способностью после синтеза каждого повтора перемещать, т.е. транслоцировать матричный участок в область 3'-конца синтезируемого G-фрагмента цепи.

На рис. 1 дана схема этапов синтеза одного теломерного повтора с помощью теломеразы.

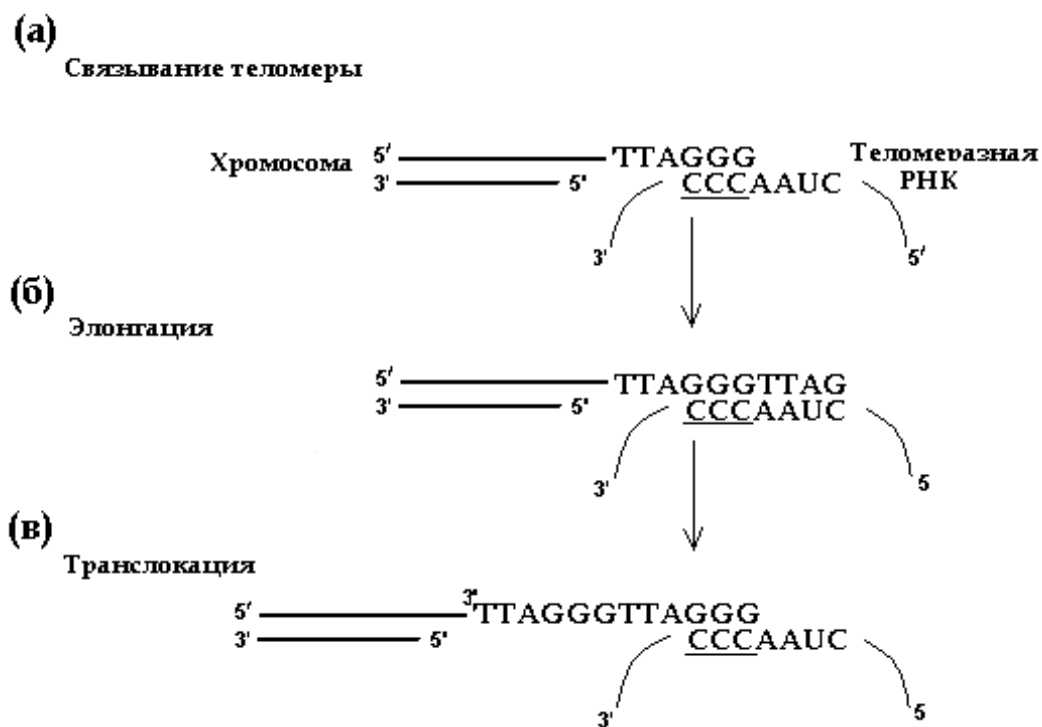


Рис. 1. Этапы синтеза одного фрагмента G-цепи теломеразой (цит. и схема рис. по: С.С. Докудовская и соавт., 1997).

1-й этап. Теломераза узнаёт 3'-конец, т.е. оверхенг нематричной цепи, с которым часть матрицы РНК теломеразы связывается по принципу комплементарности пар оснований. 3'-конец цепи в реакции в качестве праймера. В РНК вместо Т, т.е. тимина, – урацил (У).

2-й этап. Элонгация – удлинение 3'-конца за счёт синтеза G-цепи. Теломераза синтезирует лишь небольшой участок теломеры, т.е. утрачиваемый вследствие концевой недорепликации. Происходит синтез одного повтора, т.е. G-фрагмента цепи.

3-й этап. Транслокация – матричный участок перемещается в область 3'-конца синтезируемой теломерной ДНК.

Синтез G-цепи теломеры или теломерной ДНК у эукариот осуществляется обычной ДНК-полимеразой. Так удлиняется теломера – продукт генов, которые включаются в раковой клетке. Такое достраивание 3'-конца G-цепи в раковой клетке происходит после каждого деления клетки. Поэтому раковая клетка и её потомки делятся без конца, т.е. становятся бессмертными. В нормальной же клетке ген теломеразы выключен, поэтому в ней теломеры в процессе репликации ДНК только укорачиваются. Это и делает нормальную клетку смертной.

В 80% образцов раковых клеток разного типа, взятых из культуры или из опухоли пациента, страдающего от рака, раковые клетки синтезируют фермент теломеразу в большом количестве. Теломераза и создаёт одно из свойств раковой клетки – бессмертие её. В 20% раковых клеток разного типа не обнаруживается теломераза. В таких раковых клетках имеется альтернативный механизм удлинения теломер – ALT (Alternative Telomere Maintenance).

Так как теломераза активна в раковых клетках любого типа, учёные видят в ней мишень для различных лекарств и средств от неё, а значит, и уничтожения раковых клеток. К настоящему времени открыт ген РНК – компонента теломеразы – hTR и ген каталитической белковой субъединицы теломеразы в раковых клетках человека. Но перед любой попыткой лечения рака нужно прежде выяснить, что действует в раковой клетке у этого пациента – теломераза или ALT.

Раз теломераза – комплексный фермент, кодируемый несколькими генами, то мишенями для уничтожения раковых клеток могут быть: 1) ген теломеразы – hTERT; 2) РНК теломеразы и её ген hTR; 3) белковая субъединица, ген которой также открыт и клонирован.

Попытки учёных уничтожать раковые клетки через воздействие на теломеразу или её компоненты не прекращаются. Ведь это путь к созданию лекарств и средств от раковой клетки любого типа у пациента. Но теломераза – до

сих пор очень загадочный фермент. Воздействия против него во многом зависят от того, как скоро будет понятна роль его в процессе деления и выживания клеток.

Проф. Н. Кейт (2001) и его группа из Центра молекулярной онкологии (Англия), несмотря на побочные эффекты, разработали новый метод лечения рака любого типа раковой клетки. По их словам, «на этот раз с раком будет покончено раз и навсегда».

Регуляторную часть гена теломеразы, которая подавляет транскрипцию теломеразы в нормальной клетке взрослого организма, учёные внедрили в состав трансгенного вектора, но сам ген там был заменён геном, кодирующим токсин – нитроредуктазу. В нормальных клетках такой вектор не экспрессируется, а в раковых клетках – регуляторная часть активируется, в результате в раковой клетке синтезируется токсин, и она погибает.

То есть суть нового метода лечения в том, что раковые клетки заставляют активировать не теломеразу, а другой, токсичный для них токсин, – фермент нитроредуктазу. Так раковые клетки сами себя уничтожают, что приводит к их исчезновению и выздоровлению пациента. Нормальные клетки самостоятельно не могут активировать нитроредуктазу, и поэтому они не повреждаются.

Учёные считают, что «это открытие является потенциальной панацеей от любого типа рака, в том числе лейкоз и др.».

Ожидается, что в ближайшем будущем будут созданы ещё другие лекарства, которые будут действовать по этому же принципу, после чего лекарства будут проходить тестирования. Врачи надеются, что через ряд лет новая методика лечения рака разного типа клетки станет общедоступной.

Однако авторы выделяют побочные эффекты этого метода: 1) так как синтез фермента теломеразы в половых клетках – яйцеклетке и сперматозоидах пациента в норме не блокирован, то после такой генной терапии пациент станет пожизненно бесплодным; и 2) возможны временные проблемы, вызванные быстрым самоуничтожением «целой половой системы репродуцирующихся клеток».

Механизм действия фермента нитроредуктазы, который заставляют синтезировать раковые клетки, в том, что этот фермент вырабатывает свободные радикалы, разрушающие клетку через апоптоз. В нормальных клетках теломераза не образуется, поэтому препарат никак на них не влияет.

Д-р Н. Кейт прокомментировала полученные результаты так: «Разработанный нами метод лечения рака является действительно универсальным и безопасным. Более 80% раковых клеток независимо от типа клетки синтезируют теломеразу и реагируют на наш препарат. Обманув их и заставив совершить самоубийство, мы устраняем рак и не повреждаем окружающие ткани. А этого пока не удалось добиться никому».

Проф. Р. Уэйнберг и его группа (1997) из США сделали открытие – обнаружили ген хЕСТ2, «на котором лежит основная ответственность» за синтез теломеразы. Был выявлен синтез теломеразы в четырёх типах раковой клетки, в нормальных клетках «этот процесс не происходил».

Р. Уэйнберг считает, что «теперь появляется реальная возможность создания лекарства, которое будет «выключать» в раковых клетках синтез теломеразы и этим «лишать их возможности осуществлять неконтролируемое деление». По мнению учёных, на основе этих данных появляется возможность создания лекарства, которое можно будет использовать против не одного, а многих типов раковой клетки.

В клетках эмбриона человека этот ген «включён» для «ремонта» теломер на концах хромосом после каждого деления клетки, а в организме человека «выключается». Учёные сосредоточили свое внимание на вопросе: что заставляет в раковой клетке «спящий ген вновь заработать?».

Проф. Э. Жилбоа (Eli Gilboa, 2000) и его группа, – учёные Университета Дьюка (США), создали универсальную противораковую вакцину. Так как теломераза синтезируется в раковой клетке разного типа, эти учёные выдвинули идею «о возможности создания универсальной противораковой вакцины, направленной против теломеразы».

Ими уже создана вакцина на основе дендритных клеток, нагруженных фрагментом теломеразы. Введение этой вакцины вызывало у мышей развитие ответной иммунной реакции, «достаточной для подавления имплантированного рака кожи, молочной железы и мочевого пузыря человека». Активированные Т-лимфоциты оказывали цитотоксическое действие и на раковые клетки в опытах *in vitro*.

Эксперты считают, что применение такой вакцины может сопровождаться «побочными эффектами».

Так как ген теломеразы «включается» в 80-90% случаев раковой клетки разного типа, то информация о содержании теломеразы может быть использована как общий маркер для:

- ранней диагностики раковой клетки любого типа у пациента;
- контроля лечения и излечения пациента от рака;
- разработки, наряду с другими маркерами, стадий рака и оценки прогноза. Для выявления теломеразы широко используют TRAP-анализ и его модификации, экспрессию гена hTR и hTERT методом RT-ПЦР.

#### **4.2. Нарушения в передаче сигнала к делению в раковой клетке: новые мишени для уничтожения раковых клеток**

Стандартные лекарства против раковых клеток действуют на них через повреждения их ДНК. Но при этом такое же действие их и на здоровые клетки организма пациента. То есть эти лекарства неизбирательные, с тяжелыми побочными эффектами.

Для избежания этого, учёные долго искали новые мишени для лекарств, чтобы уничтожать только раковые клетки. Их нашли в «участниках» передачи сигнала к делению в раковой клетке.

Без сигнала к делению никакая клетка многоклеточного организма делиться, т.е. вступать в клеточный цикл, не может. Каждая функция нормальной клетки любого типа запрограммирована генами для подчинения её нуждам ор-

ганизма как целого. Такое разделение функций клеток разного типа осуществляется с помощью передачи сигналов между клетками. Сигналом является молекула – лиганд, часто это какой-либо фактор роста: TGF-альфа, эпидермальный фактор роста (EGF) и другие.

Для действия сигнала на клетку необходим рецептор. Рецептор – это молекула белка, интегрированная в цитоплазматическую мембрану клетки. В ней различают три части: внешняя часть – она вне клетки, средняя часть – внутри мембраны клетки и внутренняя часть – она внутри цитоплазмы. Рецептор может связываться только со своей сигнальной молекулой так же, как субстрат взаимодействует со своим ферментом.

В нормальной клетке молекула-лиганд всегда извне. Она выделяется из других клеток и мигрирует к тем клеткам, на поверхности которых имеется рецептор именно к этой молекуле-лиганду. Поэтому нормальная клетка не может быть независимой, т.е. она является частью своей ткани.

Факторы роста в своем действии паракринны, так как секретируются соседними клетками и диффундируют на коротком расстоянии – местное действие.

Раковая клетка возникает из нормальной клетки ткани и при этом утрачивает все контакты: с нормальными клетками своей ткани и с внеклеточным матриксом ткани. Это одна из причин, что превращает раковую клетку в клетку-организм. Нормальная же клетка при утрате таких контактов перестает размножаться и погибает через апоптоз (Ю.А. Ровенский, 2001).

Однако, раковая клетка при утрате таких контактов остаётся очень жизнеспособной: размножается без конца, её потомки мигрируют в окружающие ткани и по организму, в половине случаев раковой клетки разного типа она обходит апоптоз.

Причина в том, что в раковой клетке включается аутокринная регуляция деления клетки. Это открытие сделали М. Спорн и Г. Тодаро (M.B. Sporn, G.J. Todaro, 1980).

Оказалось, что молекула-рецептор и молекула-лиганд синтезируются в самой раковой клетке. Для этого в ней включаются сразу два гена. В нормальной клетке взрослого организма эти гены репрессированы.

Один синтезирует фактор роста, а другой – рецептор к нему. Это продукты через копии их генов – иРНК. После синтеза молекула-рецептор встраивается в мембрану раковой клетки, а молекула-лиганд т.е. фактор роста, секретируется в межклеточную среду вблизи от раковой клетки. Молекула-рецептор вылавливает эту молекулу-лиганд и соединяется с ней. Это изменяет конформацию внутренней части молекулы-рецептора. В результате запускается один из биохимических ответов клетки – она включается в клеточный цикл. Это явление ученые назвали аутокринным механизмом размножения клетки (Рис. 1).

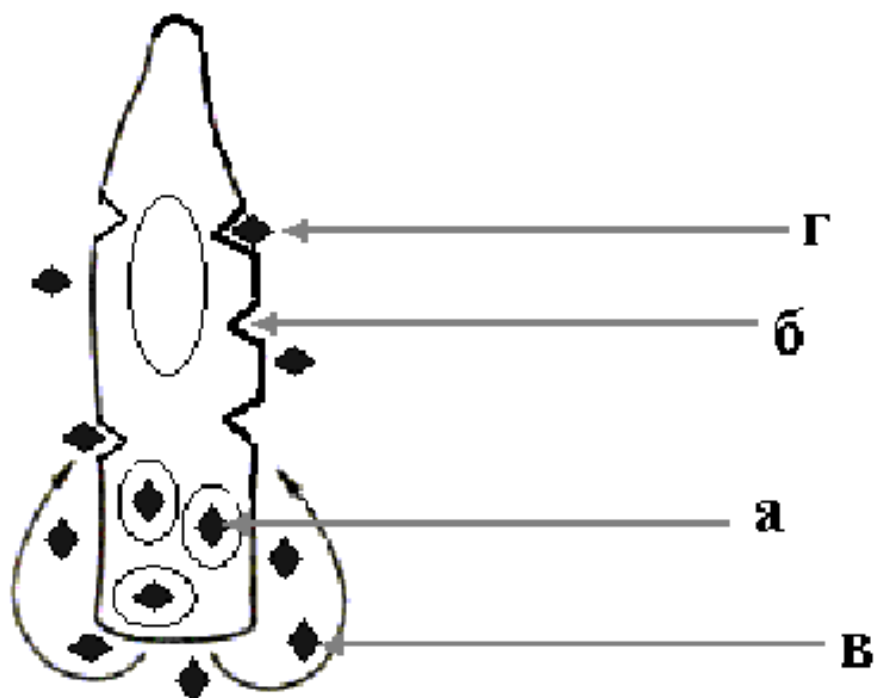


Рис. 1. Аутокринная секреция и механизм превращения нормальной клетки в раковую: а – молекула фактора роста в скрытой форме внутри клетки; б – молекула-рецептор; в – молекулы фактора роста; г – взаимодействие молекулы-рецептора клетки с молекулой фактора роста.

Но главное – другое. М. Спорн и Г. Тодаро (1980) в опытах с культурой клеток доказали, что аутокринный механизм размножения клетки является причиной превращения нормальной клетки в раковую клетку. Они пишут, что

меньшая потребность раковой клетки в экзогенных факторах роста может быть без труда объяснена эндогенным синтезом их, т. е. в самой клетке.

В ряде опытов на питательной среде были выращены нормальные клетки. Затем в эту среду добавляли белки из раковых клеток опухолей человека, а также из клеток опухолей животных. Эти белки вызвали превращение нормальных клеток в раковые клетки. Поэтому учёные называли такие белки – трансформирующими факторами роста – TGFs-альфа. Они были выделены также из питательной среды, в которой выращивали клетки, взятые из опухолей человека. Эти факторы роста имеют свои рецепторы на поверхности раковой клетки и являются стимулом для постоянного размножения раковых клеток.

Действие TGFs-альфа на клетки в культуре проявляется следующим образом:

- они для клеток являются сильными митогенами – повышают плотность культур, снижается лимит концентрации сыворотки для пролиферации, вплоть до того, что клетки приобретают способность размножаться в среде без сыворотки;

- при наличии их в среде происходит морфологическая трансформация клеток;

- появление у клеток в их присутствии способности к пролиферации без прикрепления к субстрату в полужидких гелевых средах;

- тест на образование колоний в «мягком агаре» считается одним из наиболее устойчивых «*in vitro*» признаков способности клеток образовывать опухоли «*in vivo*»;

- все эффекты TGFs-альфа обратимы: при переносе клеток в среду без этих факторов «клетки возвращаются в исходное состояние» (G.J. Todaro et al., 1981).

Авторы считают, что аутокринные механизмы потенциально очень опасны для выживания организма, если они не находятся под жестким регулированием как только надобность в них отпадает. Эти гены были необходимы клет-



кам в раннем эмбриогенезе. Поздняя экспрессия их в нормальной клетке превращают ее в раковую клетку.

В заключение учёные подчеркивают, что рак в будущем можно лечить: репрессией этих генов или с помощью специфических веществ, тормозящих синтез и активность этих факторов роста и рецепторов к ним.

Однако, раковые клетки характеризуются не только неограниченным делением, но и способностью к инвазии, т.е. свойством, которое не зависит от факторов роста.

Включение генов аутокринной регуляции деления в раковой клетке делает ее независимой от сигналов извне не только для размножения. Она становится способной жить в организме изолированно от других клеток, но среди них, т.е. становится самостоятельным одноклеточным организмом. Это клетка-организм возникает в организме-хозяине и паразитирует на нём.

В нормальной клетке факторы роста и рецепторы к ним, G-белки, связанные с мембраной клетки, белки-передатчики сигнала в цитоплазме, а в ядре клетки – транскрипционные белки, – это продукты нормальных генов экспрессии. Их экспрессия находится под контролем генов-супрессоров, в частности, гена белка p53.

При отсутствии в клетке такого контроля в результате мутаций в гене-супрессоре белка p53 или репрессии гена-супрессора Rb1 дерепрессия генов факторов роста и рецепторов к ним превращает нормальную клетку в раковую. Но для клинической практики очень важен тот факт, что раковые клетки можно вернуть в исходное состояние, если перенести в среду без TGFs-альфа.

Концепция аутокринного механизма возникновения раковой клетки и его молекулярных причин открывает новые пути воздействий на раковые клетки. Ликвидация раковых клеток может осуществляться двумя путями: 1) уничтожением клеток и 2) возвращением их в нормальное состояние, т.е. реверсией.

В настоящее время онкологи заняты удалением и уничтожением раковых клеток в организме пациента, но реверсия раковых клеток подтверждена во многих экспериментах.

Факторы роста и их рецепторы раковой клетки, G-белки, связанные с мембраной клетки, белки-передатчики сигнала в цитоплазме, белки транскрипции в ядре клетки – это новые мишени для создания избирательно действующих средств и лекарств против раковых клеток. Большой вклад в это внесли учёные нашей страны и их материалы мы здесь цитируем – Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн (1996), С.А. Тюлядин (1999), Н.Е. Кушлинский (1999), Д.А. Носов (2001).

1. В раковой клетке чрезмерная экспрессия рецептора факторов роста.

Например, рецептор эпидермального фактора роста – EGFR. Он продукт гена *c-erbB1*. За счет амплификации гена, т.е. избытка его иРНК, синтез рецептора чрезмерен.

Для подавления чрезмерной экспрессии рецептора, можно подавлять этот ген разными способами, например, интерферирующей РНК (РНКи) к иРНК этого гена. Можно избирательно связать белок-рецептор моноклональным антителом или синтезировать по его пространственной структуре избирательно действующее химическое соединение. Молекула этого соединения будет комплементарна активным участкам молекулы-рецептора. В результате будет прекращена передача сигнала к делению в раковой клетке, что затем может вести к регрессу рака.

2. Тирозинкиназа C. Она составляет цитоплазматическую часть белка-рецептора для многих факторов роста – эпидермальный фактор роста (EGF) и TGFs-альфа, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-1) и другие. Присоединяя фосфатную группу, этот фермент становится активным и затем фосфорилирует молекулы-передатчики сигналов. Для подавления тирозинкиназы C уже синтезированы химические соединения, которые ингибируют фосфорилизацию её, что исключает сигнал от этого фермента к молекулам-передатчикам сигналов в раковой клетке.

3. Эпидермальный фактор роста (EGF) и трансформирующий фактор роста (TGFs-альфа). Они имеют общий рецептор на раковой клетке. Эти молекулы-лиганды при связывании с рецептором на раковой клетке, вызывают её деле-

ние. В раковой клетке их синтез чрезмерен. Здесь могут быть два воздействия: подавление синтеза и секреции факторов роста в раковой клетке и блокада связывания его с молекулой-рецептором на раковой клетке. Для этого создаются химические соединения. Но проще создать интерферирующую РНК к иРНК гена фактора роста и/или то же к гену белка-рецептора этого фактора роста.

4. Белок гена семейства *ras*. Из-за мутации в этом гене белок Ras не способен терять фосфатную группу, поэтому постоянно активен, стимулируя раковую клетку к делению.

Белок гена *ras* для выполнения своего действия должен прежде приобрести необходимую для него пространственную структуру и прикрепиться к внутренней поверхности мембраны раковой клетки. Для этого ему требуется фермент – фарнезилтрансфераза. Без него белок гена *ras* не может присоединять к себе фосфатные группы, а значит передавать сигналы от белка-рецептора к ядру раковой клетки. Для подавления фермента создаются ингибиторы его, что будет тормозить пролиферацию раковой клетки.

5. Раковая клетка-мишень для лекарств и других средств. На раковой клетке имеются белки-рецепторы к эпидермальному фактору роста, к эмбриональному белку альфа-фетопротейну. На этой основе можно создать гибридный белок из этого фактора роста или альфа-фетопротейна, к нему химически присоединить молекулу цитотоксического препарата. При этом молекула белка служит средством адресной доставки, т.е. только в раковые клетки, не затрагивая здоровые клетки, и так уничтожать их.

Можно создать моноклональное антитело к р-гликопротеину – он на раковой клетке любого типа. Его химически соединить с цитотоксическим препаратом и также адресно доставить в раковые клетки. Побочного эффекта у пациента может не быть совсем или будет минимальным, так как на раковой клетке экспрессия р-гликопротеина намного больше, чем на нормальной клетке.

6. Внедрение нормальной копии гена белка p53 в раковые клетки.

При наличии мутаций в гене этого белка, в раковые клетки можно вводить с помощью вирусного вектора, в том числе вируса Т4, нормальную копию

гена p53. Это восстановит апоптоз в раковых клетках у пациента, что и уничтожит их.

Наличие мутаций в гене p53 – ценный маркер для ранней диагностики раковых клеток в организме пациента по анализу образца плазмы крови от него.

Итак, лекарства стандартной химиотерапии направлены для уничтожения всех раковых клеток в организме пациента. Но это не удастся достичь, так как сами лекарства не могут отличить раковую клетку от нормальной клетки. Мишенью для них является ДНК раковых клеток, она же оказывается мишенью в той же степени и для нормальных клеток.

Лекарства, действующие на факторы роста и молекулы – передатчики сигналов в раковых клетках, «больше подавляют пролиферацию раковых клеток, но не убивают их». Но в отличие от химиотерапии, их действие избирательное – на раковые клетки. Это новый метод, для которого необходимо выявлять в раковой клетке от конкретного пациента генетические и биохимические «отклонения» (С.А. Тюляндин, 1999).

В разделе 3.2. мы рассматривали GPCR и G-белок в передаче сигналов в нормальной клетке.

Т. Кенакин (Т. Kenakin, 2006) отмечает, что GPCR-рецепторы имеют еще одно свойство – «конститутивную активность». То есть «иногда они активируют G-белки без всякой видимой причины, т.е. в отсутствие лиганда».

Учёный подчеркивает, что на раковых клетках «необычно много конститутивных рецепторов» и предполагает, что с этим может быть связана «их способность к бесконтрольному делению». Такой «сбой в поведении раковой клетки от конститутивных рецепторов не удаётся устранить никакими известными сегодня лекарственными средствами» (Рис. 2).



Рис. 2. Конститутивный GPCR-рецептор в активной форме в отсутствие лиганда (рис. и цит. по: Т. Кенакин, 2006).

Для этого необходимы лекарства «совершенно иного действия, которые фиксировали бы конститутивные GPCR-рецепторы в неактивной конформации».

Автор предлагает для достижения этой цели ингибитор – обратный ингибитор или агонист, который связывается с этим рецептором и инактивирует его, устраняя его контакт с G-белком, и прерывая этим сигнал (Рис. 3).



Рис. 3. Инактивация GPCR-рецептора и прерывание сигнала присоединением обратного агониста к рецептору (рис. и цит. по: Т. Кенакин, 2006).

Проф. Джон Дэйви, – факультет биологии Варвикского университета и компания «Септеген» (Англия) в 2003 г. разработали технологию быстрого испытания лекарств для лечения различных болезней, в том числе и рака.

Мишени этих лекарств – рецепторы, связанные с G-белками (GPCR), которые обеспечивают передачу сигналов между клетками в организме. Дефекты этих белков ведут ко многим болезням и к возникновению раковой клетки. Это причина того, что связанные с ними рецепторы стали той мишенью, на которую должны воздействовать новые лекарства.

Секвенирование генома человека дало специалистам информацию о функции нескольких сотен рецепторов, многие из которых могут стать мишенями лекарственного воздействия. Однако, говорит проф. Джон Дэйви, «знать, что эти мишени или цели существуют – это одно, а способность воздействовать на них – совсем другое».

Проф. Джон Дэйви разработал новый метод, который позволяет выявить возможное воздействие лекарств на эти рецепторы.

По технологии GPCR человека помещают в живую клетку простых дрожжей и наблюдают за действием лекарства. По мнению автора, новая технология позволяет «определять мельчайшие различия между рецепторами разных людей, что дает возможность выявить лекарства, наиболее эффективные для каждого пациента».

## **Глава 5. Клеточный цикл. Молекулы-регуляторы клеточного цикла открывают пути к диагностике и уничтожению раковых клеток**

В организме взрослого человека  $5 \cdot 10^{13}$  (В.Н.Сойфер, 1998) или  $5 \cdot 10^{14}$  (В. Тарантул, 2003) клеток. Каждая клетка любого типа – это часть своей ткани и организма в целом.

Раковая клетка в организме человека – это уже не часть ткани и своего организма, а самостоятельная клетка, отделившаяся от них. Это клетка-организм.

Деление клетки – это основное свойство и признак того, что она живая. В раковой клетке свойство деления нарушено, и она делится без конца.

Если в организме нормальная клетка того или иного типа делится для существования организма, то размножение раковой клетки – для его уничтожения.

То, что клетки размножаются путем деления, известно более 100 лет. Но почему клетка делится, оставалось не ясно до конца 70-х годов XX века.

Каждая клетка после деления делает выбор: либо она начинает синтез ДНК и в таком случае будет вновь делиться, либо она избирает путь к дифференцированной клетке и это означает, что она уже больше никогда не разделится. Молекулярные причины, регулирующие этот «выбор» долго оставались не выясненными, а это важно для понимания превращения ее в раковую клетку.

Период жизни клетки от одного деления до другого или от деления до её смерти – это клеточный цикл. Он состоит из интерфазы – вне деления, и самого деления клетки. Интерфаза – период, во время которого клетка растёт и удваивает все свои компоненты. Митоз – это процесс, в результате которого из одной клетки образуется две. Он из двух стадий: митоз – деление клеточного ядра, и цитокинез – деление клетки на две дочерние клетки.

В интерфазе различают три этапа или фазы: G1, S, G2, а в митозе четыре: профаза, метафаза, анафаза и телофаза.

### Этапы интерфазы

1. G1 фаза (от англ. *gap 1*”, то есть интервал 1) – рост клетки и удвоение всех её компонентов.

2. S фаза (от *synthesis*”) – синтез ДНК путем репликации, формирование копий каждой хромосомы; удвоение центросомы.

3. G2 фаза (*gap 2*”) – подготовка к митозу, продолжение роста клетки, синтез необходимых белков.

### Этапы или фазы митоза

М фаза (от. *mitosis*”) – деление клетки на две дочерние. В митозе четыре фазы, им заканчивается клеточный цикл.

Профаза. Каждая хромосома – это пара хроматид, соединённых в месте центромеры. Центриоли расходятся к противоположным полюсам клетки. От каждой центриоли в виде лучей расходятся микротрубочки, многие из которых становятся фибриллами митотического веретена. В каждой хроматиде в области центромеры имеется богатый белком участок – кинетохор – важный элемент веретена. Кинетохоры в роли сцепления, которое позволяет взаимодействовать фибриллам веретена с хромосомами: как только к кинетохору присоединяется микротрубочка, хромосома начинает двигаться. Ядерная мембрана распадается и образуется веретено деления.

Метафаза. Хроматиды прикрепляются к фибриллам веретена кинетохорами. Оказавшись связанными с обеими центросомами, хроматиды движутся к экватору веретена до тех пор, пока их центромеры не выстроятся по экватору веретена перпендикулярно его оси. Это позволяет хроматидам беспрепятственно двигаться к соответствующим полюсам. Характерное для метафазы размещение хромосом очень важно для сегрегации хромосом, т.е. расхождения сестринских хроматид. Если отдельная хромосома «замешкается» в своём движении к экватору веретена, задерживается обычно и начало анафазы. Метафаза завершается разделением сестринских хроматид.

Анафаза. Каждая центромера расщепляется на две, нити веретена оттягивают дочерние центромеры к противоположным полюсам. Центромеры тянут



за собой отделившиеся одна от другой хроматиды, которые теперь становятся независимыми хромосомами.

Телофаза. Хромосомы достигают полюсов клетки, деспирализуются, и их уже нельзя четко различить. Нити веретена разрушаются, а центриоли реплицируются. Вокруг хромосом на каждом из полюсов образуется ядерная оболочка. За телофазой может сразу следовать цитокинез – разделение всей клетки на две (Рис. 1). Каждая из дочерних клеток имеет идентичный набор хромосом. После деления клеточный цикл завершается, и клетка переходит в фазу G1.

Длительность цикла определяется типом клетки. Обычно она составляет от 10 до 30 часов. Клетки в фазе G1 не всегда делятся, они могут выйти из цикла и перейти на фазу покоя – G0 фаза.

Лишь после 1970-х годов было установлено, что прохождение клетки по всем фазам клеточного цикла строго регулируется. При движении по циклу в них появляются и исчезают, активируются и ингибируются регуляторные молекулы, которые обеспечивают: 1) прохождение клетки по определенной фазе клеточного цикла и 2) переход из одной фазы в другую. Причём прохождение по каждой фазе, а также переход из одной фазы в другую контролируется различными ключевыми молекулами. Они регулируют клеточный цикл в организмах всех эукариотов – дрожжей, животных и человека.

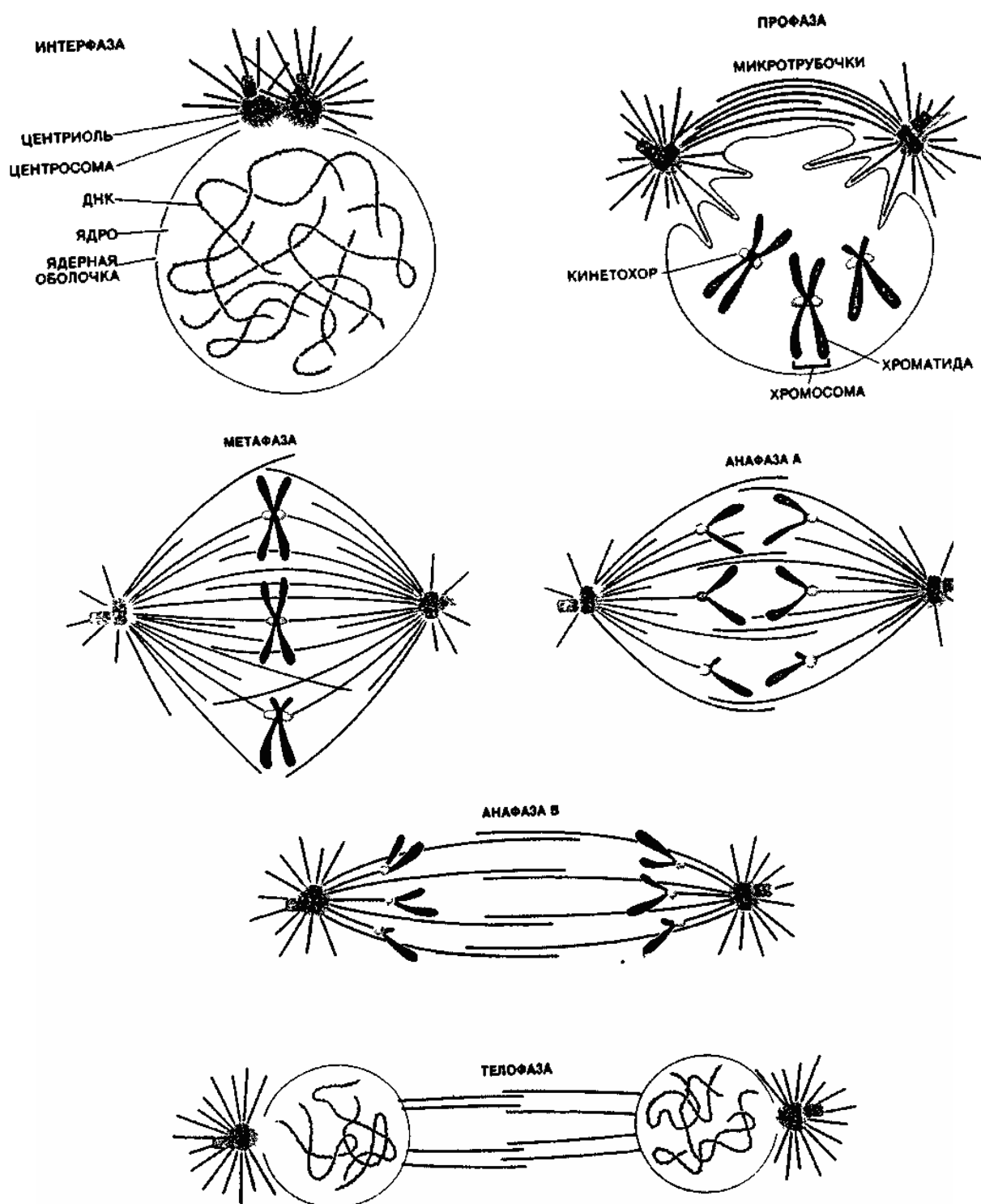


Рис. 1. Схемы последовательных фаз митоза в эукариотической клетке (цит. и рис. по: Дж.Р. Макинтош, К.Л. Макдоланд (1989) с изменениями).

Теперь мы кратко изложим, что это за ключевые молекулы, и что они делают в клетке. Ясно, что мы будем называть учёных, которые открыли эти молекулы, и вклад каждого из них в эти знания. Пока мы скажем, что результаты их исследований очень важны для понимания любой болезни, а в онкологии

могут произвести настоящую революцию как в диагностике рака, так и в лечении от него.

Л. Хартуэлл (L. Hartwell) из США в 1970-1971 гг. впервые для изучения клеточного цикла применил генетические методы. Он первым для этого использовал клетки пекарских дрожжей. Дрожжевая клетка – удобная модель для этого, так как: умеет размножаться, отвечать на сигналы внешней среды, осуществлять «ремонт» генов при мутациях от влияния среды. Кроме того, клетки дрожжей имеют гены, родственные всем основным генам человека. Идея учёного: изучение клеточного цикла и его регуляции в клетках дрожжей может помочь понять это в нормальной клетке человека, а затем и в раковой клетке.

В серии опытов Л. Хартуэлл выделил клетки дрожжей, в которых гены, управляющие циклом, были изменены. Так он выделил более 100 генов, участвующих в управлении клеточным циклом – гены сдс (от англ. – гены цикла деления клетки). Наиболее важным из них оказался ген сдс28 – «стартовый». Он управляет первым шагом в прохождении клеточного цикла через фазу G1.

Он изучал чувствительность клеток дрожжей к радиации. Оказалось, что ответом клетки на это – остановка клеточного цикла. Учёный смог выделить гены, которые в этих опытах тормозили клеточный цикл клетки. Их оказалось много, он дал им имя – *rad*.

Белок таких генов «чувствует», что в ДНК клеток от облучения появились «разрывы» или неправильно спаренные основания. Другие белки этих генов проверяют состояние ДНК. Для этого они останавливают клеточный цикл, а ферменты репарации ДНК производят её «ремонт».

На основе этих результатов Хартуэлл ввел понятие «контрольной точки». На этом этапе проверяется идентичность ДНК: если она повреждена, то цикл останавливается, чтобы дать время для исправления ДНК прежде, чем клетка перейдёт в следующую фазу. Если исправление ДНК невозможно, клетка получает сигнал на апоптоз.

Теперь такая проверка осуществляется в нескольких точках клеточного цикла, получивших название сверхочных точек – чекпоинтов (checkpoint). Эти

точки расположены в концах G1, G2 и M фаз. В первой точке осуществляется проверка наличия повреждений ДНК, во второй наряду с повреждениями ДНК проверяется завершенность репликации, в третьей проверяется правильность расхождения хромосом в митозе.

П. Нерс (P.M. Nurse) продолжил начатые исследования клеточного цикла Хартуэллом. Он использовал клетки дрожжей другого типа. В середине 70-х гг. открыл в клетках этих дрожжей ген *сдс2*. Он обнаружил, что этот ген играет ключевую функцию в управлении делением клетки – переход от G2 к M.

В 1987 г. он выделил такой же ген у человека, назвав его *Сдк1*, его продукт белок – циклин-зависимая протеинкиназа. Теперь уже открыто целое семейство белков Сдк. П. Нерс показал, что активизация Сдк зависит от обратимого фосфорилирования.

Позже учёный выяснил, что ген *сдс2* имеет и более общую функцию, аналогичную той, что Хартуэлл открыл в «стартовом» гене клеток пекарских дрожжей, а именно – управление переходом цикла от G1 к S.

Учёный также клонировал ген человека, отвечающей за переход клетки через фазу G1. В клетки дрожжей с дефектом гена *сдс2* ввёл человеческий ген *сдс2*. Результат: клетки начали размножаться и образовали колонию, т.е. чужеродный ген «спас» эти клетки. Этим впервые учёный показал, что гены «несхожих организмов, как человек и дрожжи, взаимозаменяемы» (А.В. Баранова, 2000). Из этого следовал вывод, что законы жизни клетки, изучаемые на одноклеточных дрожжах, верны и для клеток человека».

Т. Хант (R.T. Hunt) из Англии в 80-х гг. обнаружил первую молекулу белка, который внезапно исчезал при каждом митозе и накапливался вновь только в интерфазе. Он назвал этот белок циклином, так как его концентрация изменяется периодически в соответствии с фазами клеточного цикла, в частности, падает перед началом деления клетки. Т. Хант обнаружил первый циклин в опытах над оплодотворенной яйцеклеткой морских ежей. Позднее циклины были найдены и в других живых существах. На этих клетках учёный обнаружил, что периодическое снижение уровня этого белка является важным и об-

щим управляющим механизмом клеточного цикла. Оказалось, что циклины образуют комплексы с Сдк, т.е. с протеинкиназами, запускающими процесс деления клетки. Без циклинов эти ферменты не способны работать – они неактивны. Поэтому их называют циклин-зависимыми киназами (Цзк или Сдк).

Заслуга Т. Ханта состоит в том, что он показал периодический распад циклина В в клеточном цикле, первым клонировал ген циклина и нашёл гомологичные гены у других организмов.

Сдк являются главными регуляторами, влияющими на смену фаз в клеточном цикле.

В клетках млекопитающих существуют по меньшей мере шесть различных Сдк. Их обозначают как Сдк2–Сдк6 в порядке их открытия.

Сдк1 ассоциируется с циклинами А и В и участвуют в переходе G2-M.

Сдк2 может связываться с циклинами А, Е, Д2 и Д3, но не Д1, и является одной из основных киназ, регулирующих переход G1-S и прохождение через S-фазу.

Сдк4 и Сдк6 участвуют в регуляции перехода G1-S. Они являются основными каталитическими партнёрами, циклинов Д-типа, образуя с ними комплексы, обладающие субстратной специфичностью для белка Rb.

Регуляция активности Сдк осуществляется за счёт направленного изменения уровня определённых циклинов в определённые фазы клеточного цикла. Кроме того, активность Сдк регулируется изменениями фосфорилирования их определённых аминокислотных остатков. В активной форме комплексы циклин-Сдк фосфорилируют регуляторные белки, контролирующие протекание данной фазы.

«Клеточным мотором деления» называют циклины их первооткрыватель – они управляют скоростью киназ. В настоящее время открыты 10 циклинов с разной ролью в клеточном цикле.

Открытия троих исследователей, соединённые вместе, дали биохимическую модель митоза, т.е. деления эукариотических клеток. Они открыли молекулярные причины, регулирующие клеточный цикл.

Общее число молекул Сдк является постоянным в течение клеточного цикла, но их активность изменяется за счёт регуляторной функции циклинов (Рис. 2).

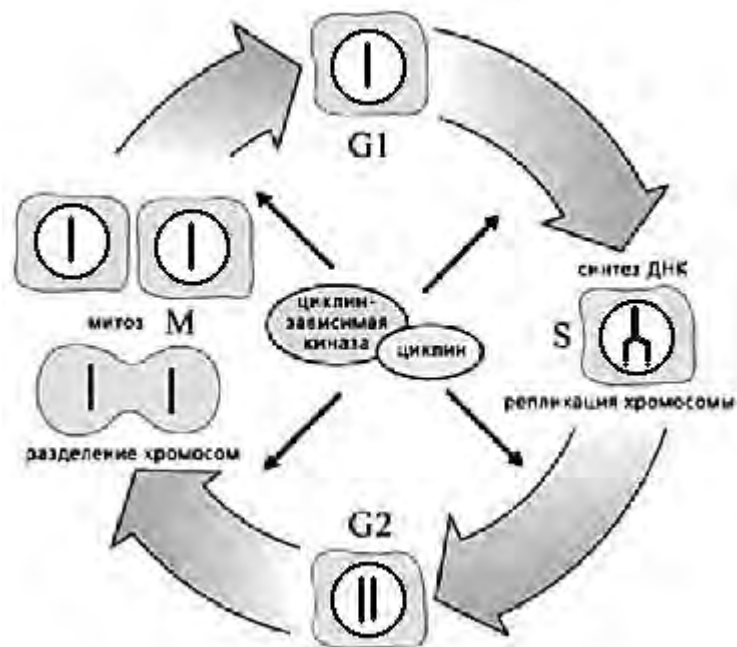


Рис. 2. Фазы клеточного цикла эукариотической клетки. G1 – от конца митоза до начала синтеза ДНК; S – синтез ДНК; G2 – от конца синтеза ДНК до митоза; M – митоз. В центре – белковый комплекс циклина с циклин-зависимой киназой, активность которой определяет ту или иную фазу (рис. и цит. по: А.В. Баранова, 2000).

Жизнь организма эукариотов прямо зависит от четкости в клеточном цикле. Фазы должны следовать в правильном порядке, и предшествующая фаза должна быть завершена прежде, чем начнется следующая. За открытие ключевых молекул контроля над делением клеток эти трое биологов в 2001 г. были награждены Нобелевской премией.

Открытия учёных важны для понимания того, как осуществляется клеточный цикл в нормальной клетке того или иного типа и какие нарушения в нём превращают эту клетку в раковую.

В клетке одна группа генов ответственна за синтез циклинов, а другая – за синтез циклин-зависимых киназ (Сдк). Концентрация циклинов меняется в

зависимости от стадии клеточного цикла. Клеточный цикл включают циклин-зависимые киназы. Но они без циклина не способны работать, а только в комплексе с ними.

В целом митоз регулируется двумя группами генов. Гены экспрессии включают фазы митоза, а гены-супрессоры ингибируют его в границах нормы для клетки данного типа.

Ген-супрессор p53. Его экспрессия повышается в клетке при изменениях структуры в её геноме. Он останавливает клеточный цикл для репарации ДНК. Если репарация ДНК не удаётся, тогда белок индуцирует в этой клетке апоптоз.

Репарация и остановка клеточного цикла защищают организм от репликации и амплификации дефектных генов, а значит, от возникновения раковой клетки.

Потеря функций гена p53 из-за мутаций приводит к утрате контроля над клеточным циклом: клетка-мутант будет пролиферировать, несмотря на дефекты в её генах (Рис. 3 и Рис. 4).

Открытие ключевых молекул, во власти которых находится регуляция деления клетки любого типа в организме, позволяет управлять клеточным циклом. Дефекты в работе этих молекул приводят к изменениям в экспрессии ряда генов и к мутациям некоторых генов, что превращает нормальную клетку в раковую.

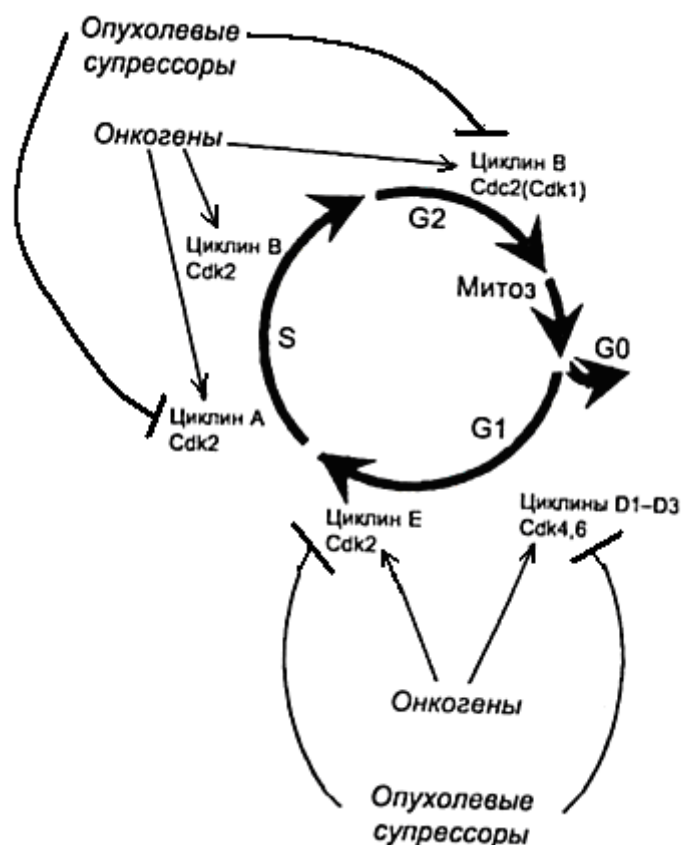


Рис. 3. Движение по клеточному циклу определяется последовательной активацией различных комплексов циклин – Cdk. Они – мишени действия генов экспрессии или генов-супрессоров (рис. и цит. по: Б.П. Копнин, 2000).

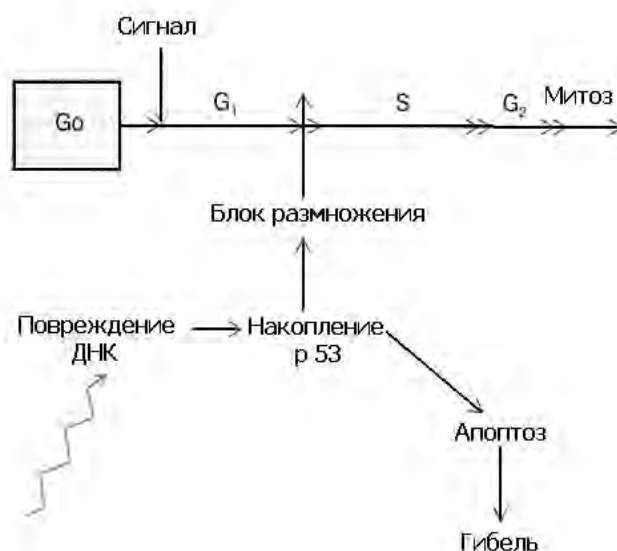


Рис. 4. Схема фаз клеточного цикла и реакции, защищающие геном (рис. и цит. по: Ю.М. Васильев, 1997).



В «теле» гена p53 имеются одиночные CpG динуклеотиды. Нередко они подвергаются метилированию в клетке, что может привести к мутации гена при замене Г-Ц на А-Т, а клетка может превратиться в раковую.

Ген-супрессор Rb1. Он в клетке подвергается фосфорилированию, такая клетка может стать раковой. В нормальной клетке его белок связывает белки перехода клетки из фазы G1 в фазу S. Когда с помощью циклин D1-Сдк4 к его промотору присоединяются фосфатные группы, ген выключается и дефектная по геному клетка из фазы G1 переходит в фазу S.

Ген-супрессор белка p16 INK4a. Это ингибитор Сдк D и, тем самым, прохождение G1 фазы клеточного цикла.

При репрессии за счёт метилирования его промотора или реже мутации в нём в разных типах клетки, такие клетки превращаются в раковые. Путь к этому: Сдк присоединяет фосфатные группы к промотору гена Rb1, высвобождается белок транскрипции E2F и клетка вступает в фазу S.

Возможными кандидатами на использование в качестве ингибитора пролиферации является белок p21, ингибирующий циклин-зависимые киназы всех типов, а также белок p27 KIP 1.

Открытие учёными ключевых молекул клеточного цикла незаменимо в диагностике раковых клеток в организме пациента и для их уничтожения.

Повышение концентрации молекул Сдк и циклинов обнаруживается в раковых клетках разного типа. Это важно для диагностики раковых клеток и для лечения. Сдк и циклины станут новыми мишенями для лекарств-ингибиторов с целью избирательного уничтожения раковых клеток.

Таким образом, открытия учёных становятся основой для разработки нового пути уничтожения раковых клеток в организме пациента – воздействия на отдельные фазы клеточного цикла раковой клетки любого типа.

Значение открытий ключевых регуляторов клеточного цикла для лечения от рака наши ведущие учёные оценивают так.

Проф. Б.В. Копнин (2003): «В процессе деления клетки есть несколько этапов, каждый из которых контролируется особыми точками – ~~чек~~чекпоинтами”.

Если на одном из этапов в делении произошёл какой-то сбой, клетке даётся команда на самоуничтожение. Но раковая клетка тем и отличается, что у неё этот механизм сломан. Клетки как бы «затупели», перестают слышать команды, и в результате опухоль растёт бесконтрольно. Новые лауреаты внесли большой вклад в понимание этих механизмов.

Учёные не только установили, что в процессе деления дублирование хромосом может происходить не полностью или не в том порядке, что у «материнской клетки». Но и доказали, что раковые клетки часто содержат как раз «неправильные» хромосомы. Они определили и белки, которые отвечают за правильность и чёткость деления клетки, их открыто уже около 10».

Акад. М. Давыдов (2001) – директор ОНЦ им. Н.Н. Блохина. «Работы Хартвелла, Нерса и Ханта имеют колоссальное значение для перспектив создания новых лекарственных средств, которые будут влиять конкретно на этапы клеточного цикла злокачественных новообразований. Открытие молекул, регулирующих процесс развития живых организмов, позволяет работать над созданием препаратов, которые способны действовать не только на сами клетки, но даже на отдельные звенья клеточного цикла. Это является современным ключевым подходом к развитию новой стратегии онкофармакологии. Однако не следует ждать немедленных практических результатов. Разработка препаратов – процесс длительный. Он проходит много стадий: сначала создание активно действующего вещества, затем экспериментальная проверка его, наконец продолжительные испытания в клинических условиях. Потребуется не менее 10 лет. И я не думаю, что это будет универсальное средство, с помощью которого можно будет лечить все злокачественные опухоли. Дело в том, что злокачественных опухолей существует колоссальное количество, они разного происхождения и по-разному себя ведут. Поэтому рассчитывать на какую-то панацею не приходится.

Нобелевскими лауреатами этого года открыт конкретный механизм, который позволяет вмешиваться в определённые этапы клеточного цикла. Они открыли молекулы, которые регулируют процессы развития клеток в живых ор-

ганизмах. Это, по сути, может оказаться конкретным путём к познанию механизма жизни клеток, что само по себе принципиально важно, но вовсе не даёт гарантии создания в ближайшее время лекарств, действующих на опухоль».

Проф. Р.И. Якубовская (2001). «Сам цикл деления клетки уже описан и давно известен, ценность же открытия в том, что этот процесс можно контролировать. Учёным удалось определить, какая молекула регулирует этот цикл у дрожжей, растений, животных и людей, то есть во всех эукариотических организмах», в клетках которых есть ядро».

Открытие нобелевских лауреатов учёные считают ключевым моментом в клеточной биологии. В первую очередь это необходимо для борьбы с раковыми клетками. «Очень важно знать, как делится раковая клетка, какие ключевые биохимические механизмы при этом работают, какие это влечёт за собой последствия, а также, какие молекулы участвуют в процессе».

«Сейчас многие учёные уже проводят эксперименты, пытаясь остановить деление раковых клеток». Тот факт, что в своей работе нобелевские лауреаты использовали патогенетический подход к лечению рака, я считаю очень важным. Они пытались найти причины образования злокачественных опухолей на молекулярном уровне.

Сейчас учёные считают одной из причин образования раковых клеток нарушения в структуре ДНК. Именно этот подход и использовали нобелевские лауреаты в своём исследовании.

Прогнозировать, в каком направлении дальше будут развиваться исследования, специалисты сейчас не могут. «Однако работа нобелевских лауреатов открыла перед медиками целый спектр направлений в области борьбы с раком».

В заключение приведём пример использования открытий Нобелевских лауреатов 2001 г. в эксперименте.

Ученые из Иллинойского университета США (2002) изучали «работу» гена Сдк4. Когда его выключали, то нормальные клетки оставались устойчивыми

к трансформации в раковые клетки даже, если их ген-супрессор белка p53 был поврежден «клетки благополучно старели».

Находка таких свойств гена привела ученых к идее уничтожения раковых клеток путем повреждения гена Cdk4 или его продукта.

В опытах на мышах, у которых этот ген был удалён, развития меланомы при обработке их кожи канцерогенами получить не удалось.

В новом опыте исследователи хотели уточнить причину ингибирования возникновения раковых клеток. В фибробластах мышей удалили Cdk4, а затем подвергли их раковой трансформации, повредив опухолевые гены-супрессоры – p53 и Ink4a. «Клетки постарели, не начав неконтролируемый процесс деления». Этим было доказано, что наличие гена Cdk4 обязательно для превращения клетки в раковую.

Дальнейшие исследования этой лаборатории будут «сфокусированы на разработке стратегии саботажа работы Cdk4 и его продукта у людей, страдающих от рака».

В печати имеется ряд экспериментальных работ по применению гена Ink4a для уничтожения раковых клеток разного типа.

## Глава 6. Канцерогенез

### 6.1. Канцерогенез из стволовой клетки ткани: молекулярные причины

Термин «канцерогенез» (от лат. *«carcinus»* – краб и *«genere»* – создавать) означает процесс превращения нормальной клетки в раковую клетку. Из неё путём деления, т.е. «из самой себя», образуется потомство дочерних клеток, т.е. рак.

В настоящее время термин «рак» ограничен теми опухолями, которые возникают из эпителиальной раковой клетки, а все другие – из неэпителиальной клетки, обозначаются термином – «саркома».

Для понимания канцерогенеза необходимо знать его источник, т.е. какая клетка превращается в раковую клетку и молекулярные причины превращения клетки.

До сих пор считалось, что раковая клетка может возникнуть из незрелой клетки ткани, т.е. способной к делению.

Ю. Конгейм (J. Conheim, 1877) высказал гипотезу, что раковая клетка возникает из остатков в процессе эмбриогенеза человека эмбриональных клеток в тканях различных органов, но доказать не мог.

Акад. В.С. Репин (2001) пишет, что почти во всех тканях любого органа человека имеются эмбриональные стволовые клетки в виде «вкраплений». Такие клетки называют региональными стволовыми клетками.

Стволовая клетка – это недифференцированная клетка и имеет необычные свойства:

- высокая способность к самообновлению или самоподдержанию;
- продолжительный период жизни, но способность к делению всё же ограничена;
- низкая скорость деления и продолжительность цикла деления;
- обычно делится асимметрично: одна дочерняя клетка – остаётся стволовой клеткой, другая – дифференцированная клетка для замены погибших клеток данной ткани;

- стволовые клетки в тканях живут не сами по себе, а в специальной микросреде или нише из регуляторных клеток и обычно закреплены в ней молекулами адгезии;

- ниша необходима стволовым клеткам для выживания и сохранения свойства «стволовости».

Внутри ниши передаются молекулы-сигналы от клеток стромы ниши к стволовым и их дочерним клеткам, остающимся в нише. Эти сигналы блокируют активность определенных генов в дочерних клетках и активируют в других, выходящих из зоны влияния микросреды.

Еще мало знаний о клетках, образующих ниши, и как они создают возможности для нормальных стволовых клеток выполнять их функции. Очень мало известно о нишах раковых стволовых клеток.

Проблемы в нишах могут вести к болезням. Есть мнение, что из-за отсутствия молекул адгезии стволовая клетка ниши может отделяться и превращаться в раковую клетку, а образование ниш в тканях различных органов – место для метастазов раковых стволовых клеток.

Деление стволовой клетки в тканях организма – это регулируемый генами процесс.

Каждая клетка рака – это клетка-организм. До сих пор считалось, что клетки рака имеют одинаковые свойства. Поэтому цель излечения от рака – уничтожение всех его клеток.

В 50-60-х гг. XX в. начали появляться данные о том, что источником канцерогенеза является стволовая клетка ткани (Pierce G.B., Wallace C., 1971; Pierce G.B., 1972).

Исследования стволовых клеток во многом помогло исследованию канцерогенеза, были выявлены молекулярные причины свойств нормальных стволовых клеток и их потомков.

Оказалось, что асимметричное деление имеется и в раковой клетке любого типа. Это в пользу того, что раковая клетка – это стволовая клетка.

Уже в начале 1980-х гг. были получены данные, что клетки одного и того же рака различаются по способности давать начало раку.

Джон Дик (Dick J. E., 1997) и его группа из университета Торонто провели опыты на мышах. Они инфицировали мышей кровью больных лейкозом. Однако раком заболели лишь несколько животных, т.е. не все лейкозные клетки способны быть причиной болезни в новом организме. Из этого учёные сделали вывод, что при лейкозе в организме имеется множество клеток, но лишь некоторые из них являются раковыми стволовыми клетками.

Они изолировали и описали эти клетки – их белки-антигены, по которым их можно идентифицировать.

При лейкозе среди клеток имеется множество «выродившихся», но все же дифференцированных клеток, которые непрерывно делятся, создавая основную массу клеток рака. Среди этих «работниц» имеется несколько «королев» – раковых стволовых клеток. Именно они – причины рака, из них в процессе деления образуются как дифференцированные клетки с коротким сроком жизни, так и раковые стволовые бессмертные клетки. При этом дифференцированные клетки при прививке их мышам – не вызывали рак, а стволовые клетки – вызывали образование рака, т.е. они раковые стволовые клетки.

Как видно, разница в способности клеток рака при прививке животным вызвана раковой стволовой клеткой за счет её асимметричного деления. Количество раковых стволовых клеток при разном типе рака варьирует: например, среди тысячи клеток рака может быть лишь одна раковая стволовая клетка.

Последующие эксперименты других учёных позволяют предположить, что раковые стволовые клетки являются причиной, если не всех типов раковой клетки, то многих.

Приведённые наблюдения привели к разработке канцерогенеза из стволовой клетки данного типа – рака крови, а затем его обнаружили в некоторых типах клеток солидного рака.

М. Кларк (M. Clarke, 2003) и его группа из лаборатории Мичиганского университета сообщили первые данные о наличии раковых стволовых клеток в солидном раке молочной железы.

Учёные начали с того, что пересадили самкам мышей с ослабленной иммунной системой клетки рака из опухоли, взятые у 9-ти пациенток с раком молочной железы. В итоге у всех мышей развились аналогичные опухоли.

Затем учёные приготовили из раковых клеток суспензию и снова ввели её мышам. В суспензии содержались все типы клеток, обнаруженные в опухолях. Мыши заражались каждый раз, когда им вводили 5000 или более клеток. Когда же количество клеток было сокращено до 1000, рак возникал только у четверти из подопытных мышей. М. Кларк сделал вывод, что при уменьшенной дозе инъекции количества клеток-возбудителей рака не хватает для возникновения рака.

Чтобы выявить клетки, вызывающие рак, учёные рассортировали различные типы клеток, используя моноклональные антитела, которые связаны с различными типами белков на поверхности клеток. И делали мышам инъекции. Оказалось, что многие типы клеток вообще не вызывают рак. Но рак постоянно возникал под воздействием всего лишь 200 клеток, характерным признаком которых были способность вырабатывать на поверхности белки CD44 и ESA – эмбриональные белки-антигены, а так же недостаток белка CD24.

«Небольшое количество клеток этого типа способно дать толчок для образования рака, соизмеримый с воздействием 50000 несортированных клеток», – сказал М. Кларк.

Раки, вызванные этими редкими клетками, содержат полный набор клеток, присущий ткани, в которой возник рак. В их числе и те, которые не способны вызвать образование нового рака. Значит, можно предположить, что, как и стволовые, клетки могут образовывать различные типы клеток.

Клетки-возбудители сходны с эпителиальными стволовыми клетками, которые также имеют на своей поверхности белки CD44 и ESA. «Это имеет ог-



ромное значение с точки зрения практического лечения, – подчеркивает М. Кларк. – У нас есть надежда разработать способы борьбы с ними».

Таким образом, в образованных этими двумя сотнями клеток раках, присутствовали все типы раковых клеток. Это означает, что те 200 клеток-убийц действуют примерно так же, как и стволовые клетки здорового организма, способные создавать ткани любых типов. По словам проф. М. Кларка, по своим признакам они напоминали эпителиальные стволовые клетки.

Джеймс Троско (J.E. Trosco, 2005) из Мичиганского университета пишет, что раковая клетка может возникать из двух источников: 1) из стволовой клетки ткани и 2) из любой специализированной, т.е. дифференцированной клетки ткани. Проблема второго источника в том, что для того, чтобы дифференцированная клетка стала раковой, она должна сначала вернуться в «стволовое» состояние.

Ген *oct-4* является геном-регулятором, т.е. через свой белок Oct-4 выполняет контроль экспрессии других генов для поддержания «стволовости» стволовой клетки ткани. В нормальной соматической клетке ткани у взрослого человека этот ген выключен.

Учёные во главе Джеймс Троско открыли, что экспрессия этого гена во взрослой стволовой клетке превращает её в раковую клетку. Клетка, в которой не было экспрессии этого гена, не могла снова стать взрослой стволовой клеткой и трансформироваться в раковую клетку. Теперь ген *oct-4* и его белок Oct-4 являются маркерами для идентификации раковой стволовой клетки.

Авторы видят применение своего открытия так: «зная, как остановить экспрессию этого гена в раковой стволовой клетке или даже в ее клетке-предшественнице, мы можем добиться потрясающих результатов в лечении и даже предотвращении возникновения раковой клетки».

Использование гена *oct-4* и его белка Oct-4 в качестве мишеней для новых химических агентов и других препаратов «может быть крайне полезным против рака». «Это особенно важно в свете открытий того, что среди миллиардов нераковых клеток есть несколько стволовых раковых клеток, и именно они не под-

даются лечению против рака», – сказал Джеймс Троско. Другими словами, существующие методы лечения рака направлены не на те раковые клетки.

То есть мишенью для лекарств и других средств должны быть только раковые стволовые клетки, а дефектные нераковые клетки в опухоли, составляющие основную массу клеток, как неопасные и с конечным сроком жизни, будут погибать сами собой через апоптоз.

Так в раке молочной железы был доказан канцерогенез из стволовой клетки, как и в раке крови. Вскоре были получены такие же данные в других типах солидного рака – рак нервной ткани, мозга, предстательной железы, меланомы.

М. Кларк и М. Бекер (M.F. Clarke, M.W. Becker, 2006) пишут, что раковые стволовые клетки, по-видимому, «появляются в результате сбоя в регуляторной системе поврежденных стволовых клеток или их прямых потомков».

Внешние сигналы из клеток ниш держат под контролем, как нормальные стволовые клетки, так и раковые стволовые клетки.

1. Если культивировать нормальные стволовые клетки в среде, где отсутствуют сигналы, сдерживающие их специализацию, то «они очень быстро пролиферируют и дифференцируются».

2. Если раковые стволовые клетки трансплантируют в новую нишу, «они не иницируют образование рака».

Эти опыты демонстрирует, насколько важно для стволовых клеток их микроокружение, т.е. ниша без которого они не могут сохранять свои «стволовые» свойства.

Исходя из этого, некоторые учёные предполагают, что ниша может быть мишенью для воздействия лекарствами на раковые стволовые клетки. Ниши могут стать «ведущим путем к новой терапии, ограничивающей потенциал раковых клеток».

Итак, гипотеза канцерогенеза Ю. Конгейма (1877) проверена учёными лишь теперь и подтверждена: стволовая клетка ткани – истинный источник

канцерогенеза. Теперь остается выяснить молекулярные причины канцерогенеза.

Р. Холлидей (R. Holliday, 1979) обнаружил, что «несмотря на существование множества канцерогенов и мутагенов, нет прямого доказательства, что фенотип раковой клетки является результатом мутаций». В опытах по трансплантации он доказал, что причиной превращения нормальной клетки в раковую клетку являются эпигенетические изменения в её генах.

Автор разработал концепцию канцерогенеза на основе метилирования и деметилирования промотора генов, создающих все свойства раковой клетки. Это истинные, за редким исключением, причины всех свойств раковой клетки и их обозначают терминами: «эпигенетические изменения» или «эпимутации». «Эпи» в слове «эпимутация» от латинского «над», означает, что при этом структура последовательности оснований гена не затрагивается.

При мутации гена изменяется его структура, что в принципе является необратимым процессом. В таком случае реверсия, т.е. возврат свойств раковой клетки к нормальным свойствам клетки, невозможна.

При эпимутации присоединение метильной группы  $-CH_3$  к промотору гена выключает ген, – репрессия, при удалении метильной группы  $-CH_3$ , ген включается, – дерепрессия. При этом реверсия свойств раковой клетки возможна (В.Л. Карпов, 2003).

А.С. Браун (1965) подтвердил концепцию эпимутации на раковых клетках растений и раковых клетках животных.

Для канцерогенеза необходимы: дерепрессия «молчащих» в нормальной клетке генов и одновременно репрессия в ней генов-супрессоров. Первый тип генов – это гены фетальных белков, создающие все свойства раковой клетки. Второй тип генов – это гены, которые своим продуктом – белками препятствуют возникновению раковой клетки.

Переключение генов осуществляется присоединением метильной группы:  $-CH_3$  к цитозину – одному из четырех оснований ДНК; местами метилирования являются дуплеты цитозин – гуанин.

В «работе» гена следует различать: саму «работу» – это транскрипция иРНК на одной из цепей ДНК, и проявление этой работы – экспрессию гена. Она выражается в трансляции, т.е. синтезе белка в рибосомах.

При метилировании дуплета CpG (цитозин – гуанин) ген будет инактивирован, т.е. репрессирован. Причины: метильные группы препятствуют связыванию фактора транскрипции с промотором гена или присоединяется белок-репрессор к нему.

Присоединение метильных групп к промотору гена осуществляет фермент метилтрансфераза, а удаляет их другой фермент – деметилаза. Это определяет судьбу гена: быть ему включённым или выключенным в клетке.

Модификация промотора гена метильной группой сохраняется при делении клетки и передается её дочерним клеткам.

В канцерогенезе за счет эпимутации участвует ряд генов, ниже мы кратко характеризуем некоторые из таких генов по материалам статьи А.В. Лихтенштейн, Н.П. Киселевой (2001) и работ других авторов.

1. Ген метилтрансферазы 1. Повышенная экспрессия этого гена ведет к избытку его продукта, что вызывает канцерогенез. Ген и его фермент – маркеры раковой клетки.

2. Ген wnt и его белок Wnt. Этот белок блокирует синтез веществ, которые связывают стволовую клетку с клетками её ниши в ткани. Дело в том, что адгезия к другим клеткам – необходимое условие для асимметричного деления стволовой клетки.

Исследователи считают, что именно нарушение адгезии и как следствие неспособность адекватно взаимодействовать с клетками ниши может вести к раковому перерождению стволовой клетки.

3. Ген E-cadherin и его белок-рецептор в мембране клетки. Они сохраняют межклеточные контакты. Эти белки-рецепторы регулируют деление и миграцию клеток, а их потеря или нарушение функции связаны со способностью раковой клетки к инвазии и метастазированию.

Связь кадгерина с раковой клеткой носит причинный характер: когда восстанавливается образование кадгерина, деление раковой клетки прекращается, её фенотип нормализуется. Отсюда: увеличение уровня экспрессии Е-кадгерина должно предотвращать инвазию раковых клеток и вернёт их в нормальное состояние.

Репрессия гена имеется в разных типах раковой клетки за счет метилирования CpG-островков в его промоторе (M. Takeichi, 1993; W. Birchmeier, J. Behrens, 1994; A.K. Perl et al., 1998).

4. Ген-супрессор wt53. Это «хранитель генома» от дефектов генов в клетке. В «теле» гена имеются отдельные метилированные CpG-динуклеотиды, за счет которых могут возникать мутации заменой пары G – C на A – T.

5. Ген Hic-1. Это ген-супрессор, продукт его – белок транскрипции. Эпигенетические изменения его за счёт метилирования CpG-островков встречается в разных типах раковой клетки.

6. Ген WWOX. Это ген-супрессор, уничтожающий клетки с дефектами в геноме. Открыт в 2005 г. проф. Кау Huebner в университете Огайо. Ген выключается метилированием его промотора в раковых клетках разного типа. Восстановление даже его одного «вызывает цепную реакцию апоптоза раковых клеток. Именно торможение активности WWOX метилированием считается важнейшей причиной возникновения раковой клетки разного типа». «Для восстановления функций выключенного гена WWOX необходимо создать деметилирующее лекарство, над этим и работают сейчас учёные».

7. Ген Ink4a играет ключевую роль в защите организма человека от раковых клеток. Его белок – p16-Ink4a препятствует старым стволовым клеткам воспроизводить себя, когда они накопили много генетических дефектов и много белка. При отсутствии этого гена стволовые клетки обретают исключительную способность к размножению и превращаются в раковые клетки, – доказано учёными.

8. Ген-супрессор PTEN – управляет ферментом, стимулирующим деление клеток, и отвечает также за деление и выживание стволовых клеток. Он подавляет раковые клетки всех типов, но в них «отсутствует или выключен».

Итак, мы знаем истинную причину рака – раковую стволовую клетку, её свойства и их молекулярные причины. Из этого вытекают важные следствия.

В диагностике рака – выявлять только раковую стволовую клетку и её потомки по генам-маркерам и белкам-маркерам её свойств.

В излечении рака – достаточно уничтожить только раковые стволовые клетки, а остальные – нераковые клетки рака, погибнут сами собой через апоптоз. Но, если в процессе лечения пациента останется где-то даже одна раковая стволовая клетка, то рецидива рака в этом месте «не избежать».

Раковая стволовая клетка возникает в результате эпигенетических изменений в клетке. Поэтому её можно не только уничтожать, но и подвергать реверсии. Но это лишь начинает «входить» в клиническую практику.

Как видно, знания того, что раковая клетка – это стволовая клетка, дает онкологу принципиально новые возможности не только в диагностике раковых клеток, но и в излечении от рака.

R.K. Busch (1976) отмечал, что канцерогенез начинается вследствие депрессии фетальных генов, детерминирующих деление и инвазию эмбриональной клетки. «Отсутствие ингибиторов этих генов, продуцируемых только эмбриональными клетками», создает болезнь – рак.

Я.Г. Эренпрейс (1982) подчеркивал, что раковая клетка – «это эмбриональная клетка, лишённая возможности участия в нормальном эмбриогенезе».

Так как эмбриональные свойства в организме взрослого передаются не эмбриональным клеткам, «последние лишены возможности участия в эмбриогенезе, то эмбриональные свойства манифестируются как рак». Из-за несоответствия между эмбриональными свойствами клеток и неэмбриональными условиями их существования, делает клетки раковыми.

Из этого автор делает для онкологов вывод, что «устранение этого несоответствия, например, путем введения раковых клеток в эмбрион, лишает кле-

ток злокачественного фенотипа». Но из этого напрашивается другой важный для клинической практики вывод: введение в организм, страдающего от рака, эмбриональных клеток, так же должно лишать раковые клетки злокачественного фенотипа.

Теперь оба пути ликвидации раковых клеток подтверждены, как в экспериментах на животных, так и частично в клинической практике. Широкое внедрение этого метода в клиническую практику для излечения пациента от рака – вопрос только времени. Это естественный и верный подход не только для излечения уже рака, при том любого типа, но и для предотвращения рака, когда регистрируется у пациента явная угроза его.

Первые сообщения о попытках лечения от рака эмбриональными субстанциями – гомогенаты и экстракты из эмбриональных тканей появились в 30-х годах XX века.

Fichera G. (1932) и др. заметили, как от введения пациентам, страдающих от рака, гомогенатов эмбриональных органов замедлялся рост рака и в некоторых случаях его рассасывание. Когда же они применили экстракты из тканей этих органов, «увидели, что действие экстрактов не менее эффективно».

По мнению учёных, такой эффект лечения рака вызывают «факторы», которые вырабатываются тканями эмбриона и плацентой. Уже в то время делались попытки использования эмбриональных экстрактов в качестве вакцин. Тогда впервые было показано, что введение крысам эмбриональной ткани за 2-3 недели до прививки им саркомы Иенсена, приводит к отторжению раковых клеток.

В настоящее время во многих странах мира для лечения рака делаются попытки применения препаратов из эмбриональных тканей. Для приготовления препаратов берётся материал от абортов человека и из плаценты. Выделяют так же отдельные белки альфа-фетопротеин и другие для изготовления лекарств, препаратов для диагностики.

Проф. Джон Итон (J. Eaton, 2006) и его группа из США уже протестировали на мышах два типа вакцин, приготовленных из эмбриональных стволовых

клеток, полученных из мышинных бластоцист. Учёные показали, что вакцинация эмбриональными стволовыми клетками предотвращает возникновение рака легких у животных, которым вводят клетки рака лёгких или воздействуют канцерогенными веществами. Материалы исследований ими доложены на международном онкологическом симпозиуме в Праге (2006).

## **6.2. Что такое предрак?**

Кто автор термина «предрак», до сих пор неизвестно. Разные авторы называют разные фамилии изобретателя этого термина. По мнению Т. Венкеи и Я. Шугар (1962), впервые он встречается в работе дерматолога В. Дюбрейля (1896).

До сих пор также неясно, что такое предрак. По смыслу и значению предрак должен отвечать двум критериям: всегда предшествовать раку и превращаться в рак неизбежно, т.е. во всех случаях. Иначе это не предрак.

Если предрак соответствует этим двум критериям, то его значение понятно всякому: диагностика предрака и его ликвидация должны предотвращать рак. Это единственный путь уменьшения числа больных раком. В настоящее время это крайне необходимо, т.к. стандартные методы лечения рака – хирургический, лучевой и лекарственный – позволяют удалить и уничтожить лишь часть раковых клеток, но не все, т.е. продлить жизнь пациента.

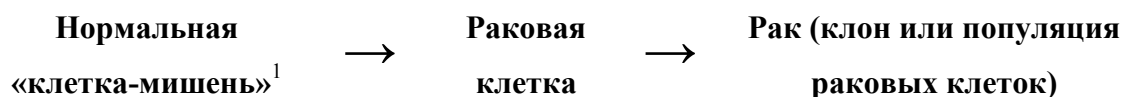
Согласно теории Р. Вирхова, в основе любой болезни лежит патология клетки или клеток. Клетка – наименьшая единица жизни, подвержена заболеваниям. Отсюда не будет ошибкой, если употреблять выражение «больная клетка».

Рак в широком смысле – это популяция злокачественных клеток из любой ткани, клетки которой обладают зловещими свойствами – инвазии и метастазирования. Процесс образования рака в виде схемы можно представить так<sup>1</sup>:

---

<sup>1</sup> По такой же схеме образуется незлокачественная опухоль.





Из схемы видно, что рак – это конечный результат болезни клетки-мишени. Но сам рак возникает из раковой клетки вследствие её неограниченного деления. Из схемы следует также, что если есть предрак, то его место должно быть между клеткой-мишенью и раковой клеткой. То, что может быть на этом месте, и должно быть предраком. Назовем это пока «кое-что», о чём узнаем из последующего изложения.

Ещё Аристотель писал: «Чтобы познать какую-либо вещь, нужно знать её возникновение и развитие». Для нас это означает выяснение того, как нормальная клетка-мишень превращается в раковую клетку, т.е. нам необходимо обратиться к канцерогенезу. Однако прежде следует привести некоторые сведения о клетке и её свойствах.

Жизнь клетки и её свойства определяются генотипом. Каждый ген через свой продукт – белок, создаёт какое-то свойство клетки. Все свойства клетки – это её фенотип. Генотип клетки нарушается от воздействия на клетку канцерогена – химического, физического или биологического – вирус. В таком случае изменяется и фенотип клетки: изменяются или исчезают прежние свойства, появляются новые. Свойства раковых клеток: способность к инвазии и метастазированию – главные причины трудностей для излечения от рака. Таким образом, клетка-мишень может стать опухолевой лишь после воздействия на её генотип канцерогена.

В настоящее время выяснено, что генетическими нарушениями, в результате которых клетка-мишень превращается в раковую клетку, могут быть: 1) дерепрессия в ней ряда фетальных генов – эпимутации и 2) изменения в генах-супрессорах, репарации ДНК, в генах клеточного цикла, апоптоза и иммунного ответа в клетке – эпимутации и мутации.

Хотя картина генных причин ещё неполная, но уже сейчас имеющиеся знания могут быть использованы в практике.

---

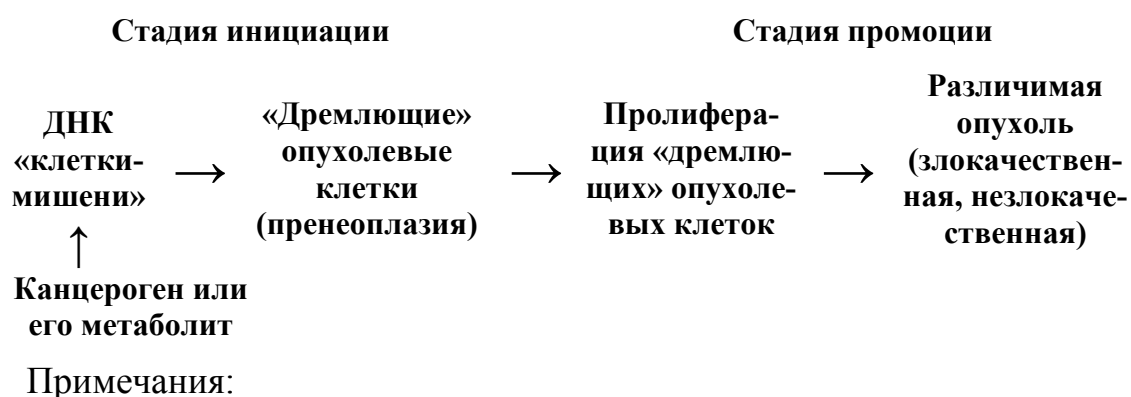
<sup>1</sup> «Клетка-мишень» – это клетка ткани, подвергшаяся воздействию канцерогена.

Основным методом для выявления эпимутаций в клетке является метил-специфическая полимеразная цепная реакция (МС–ПЦР), для выявления мутаций полимеразная цепная реакция методом молекулярных колоний (ПЦР–ММК). Такие методы позволяют выявить раковой клетки по изменениям в их генах в материале биопсии, а также в образцах из биологических жидкостей от пациента – плазма крови и др.

Канцерогенез – это процесс превращения нормальной клетки в опухолевую. В него могут вовлекаться только незрелые клетки ткани и чаще тогда, когда они находятся в стадии деления. Есть два пути канцерогенеза: 1) «де ново» – из клетки-мишени нормальной ткани и 2) «на почве» («на фоне») – из клетки-мишени, измененной тем или иным воздействием ткани; в измененной ткани больше пул делящихся клеток, чем в нормальной ткани.

В эксперименте доказано, что канцерогенез в ткани любого органа состоит из двух стадий: 1-я – инициации и 2-я – промоции. Эти стадии вначале были открыты И. Бирнблумом (1947, 1956), Г.П. Руш, Б.Е. Клайн (1950) и др. на коже мышей, а затем подтверждены на различных тканях других органов и других животных.

Схема двухстадийной концепции канцерогенеза (J. Berenblum, P. Shubik, 1947)<sup>1</sup>.



1) для индукции опухоли необходимо соблюдение последовательности воздействий – канцероген, затем промотор;

<sup>1</sup> Эти стадии имеют место при любом типе канцерогенеза. По ним возникает и незлокачественная опухолевая клетка.

2) инициация обратима и может осуществляться в считанные часы или дни;

3) промоция обратима, но требует длительного и повторного воздействия агента;

4) позднее при исследовании на генетическом уровне было показано включение различных генов на стадиях канцерогенеза (Н. Land, I.F. Parada, R.A. Weinberg, 1983).

Концепция канцерогенеза будет более понятной из примера опыта на животных.

Опыт на коже мышей. Однократно смазывают участок кожи подпороговой, т.е. минимальной дозой канцерогена, которая сама по себе не приводит к возникновению опухоли. Через некоторое время – от недели до нескольких месяцев, это же место на коже начинают смазывать не канцерогенным веществом – кротоновым маслом, которое также само по себе не вызывает рака. Это смазывание производят в течение определенного минимального периода, равного нескольким неделям. В результате на коже образуются множественные папилломы и рак.

Примечания:

1) в опыте в качестве промотора применено кротоновое масло – неспецифический раздражитель, вызывая раздражение ткани, приводит к выраженной пролиферации клеток этой ткани;

2) если в качестве промотора применяется канцероген, то опухоли возникают в более ранние сроки, чем от неспецифического раздражителя.

Стадия инициации вызывается только специфическим раздражителем, т.е. канцерогеном, поэтому его называют инициатором. Период времени от первого воздействия канцерогена на ткань до появления видимой глазом опухоли называется латентным. Стадия промоции может быть вызвана как канцерогеном – его неспецифической частью свойств, так и различными неспецифическими раздражителями. Раздражитель, вызывающий стадию промоции, называется промотором. Роль промотора двоякая: усиление пролиферации «дрем-

лющих» опухолевых клеток или усиление пролиферации незрелых клеток исходной ткани.

В 1-й стадии воздействие канцерогена вызывает в клетке-мишени нарушения генотипа, т.е. опухолевый генотип, а затем и опухолевый фенотип, т.е. клетка становится опухолевой. Она осуществляет не менее одного цикла деления, и эти клетки остаются в ткани в таком состоянии – как бы «дремлют»; для их активации необходимо воздействие промотора. На этом канцерогенез заканчивается. Это стадия «дремлющих» опухолевых клеток.

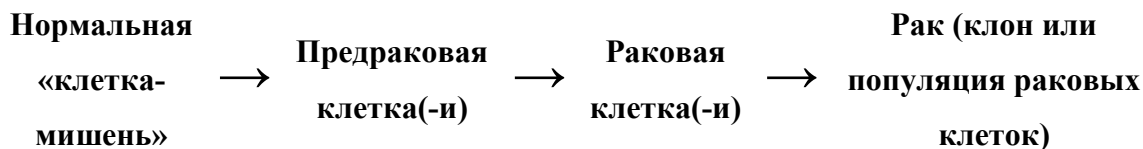
Во 2-й стадии лишь под воздействием промотора, даже не канцерогенного характера, например, кртонового масла, происходит активация «дремлющих» опухолевых клеток и их пролиферация, ведущая к образованию видимой глазом опухоли. Из этих данных И. Бирнблум сделал вывод, что «дремлющие» опухолевые клетки являются предраком.

Однако позднее рядом авторов (В.В. Худолей, 1985; Я.Г. Эренпрейс, 1986-1987; И.Ф. Сейц, 1986) в сущность стадий были внесены дополнения: клетка-мишень не сразу становится опухолевой. В 1-й стадии в клетке под воздействием канцерогена возникают эпигенетические изменения – опухолевый генотип. Это состояние сохраняется после прекращения действия канцерогена, но изменение признаков инициации возможно, клетка ещё сохраняет нормальный фенотип, т.е. это предраковая клетка. Она не менее одного раза делится, и образовавшиеся клетки остаются до того момента, пока на них не подействует промотор. Это стадия инициированных клеток (Я.Г. Эренпрейс, 1986).

Во 2-й стадии под воздействием промотора инициированные клетки, т.е. предраковые, приобретают опухолевый фенотип, т.е. превращаются в раковые клетки. На этом канцерогенез заканчивается. После этого раковые клетки неограниченно делятся, образуя опухоль. При числе клеток  $10^8$ - $10^9$  в опухоли она различается невооруженным глазом.

Из анализа сущности стадий следует, что в 1-й стадии клетка-мишень вначале становится предраковой, а во 2-й стадии – стадии промоции, приобретая опухолевый фенотип, превращается в раковую. Итак, «кое-что» – это ини-

цированная клетка или клетки в ткани, т.е. предрак (1-я стадия – стадия иницированных клеток). В связи с этим в схему образования рака между «клеткой-мишенью» и раковой клеткой необходимо добавить недостающий этап – этап предраковой клетки:



Оценка опытов на мышах И. Бирнблумом (1947, 1956) проводилась по конечному результату, т.е. по образованию рака. Отсюда логично вытекал вывод: предрак – это «дремлющая» опухолевая клетка.

Однако, в опытах:

1) не изучалось состояние клеток в промежутке между однократным смазыванием кожи канцерогеном и действием промотора. Это причина того, что этап предраковой клетки оказался незамеченным;

2) предраковая клетка имеет опухолевый генотип, но нормальный фенотип. Поэтому морфологическими методами её нельзя отличить от нормальной клетки ткани. Для этого необходима ПЦР – метод, который был разработан лишь в 1983 г.

Отсюда следует, что предрак сегодня – это предраковая клетка, а определение: предрак – это «дремлющая» опухолевая клетка, теперь не точно.

Таким образом, за столь длительный период времени – от предложения термина «предрак» по настоящее время, многие учёные пытались выяснить, что же такое предрак, но достичь этой цели им так и не удалось. Главная причина в том, что предрак искали в отрыве от канцерогенеза. В основе такого подхода лежал принцип: если в каком-либо местном изменении ткани, например, лейкоплакия, возникает рак, то такое изменение и есть предрак. На этом и с учетом степени атипии клеток ткани – А, В, С (Т. Венкеи и Я. Шугар, 1962) созданы классификации «предраковых заболеваний» – кожи, слизистой оболочки и красной каймы губ проф. А.Л. Машкиллейсоном (1970) и «Комитетом по изу-

чению опухолей головы и шеи» (1977), а также другими авторами. Но это ошибочный подход.

В настоящее время всякое местное изменение ткани не считают предраковым заболеванием и обозначают его термином «фоновый процесс».

В онкологии пока существуют два критерия предрака: очаг дисплазии III степени, возникающий в каком-либо участке фонового процесса и выявляемый морфологическими методами, и предраковая клетка. Но дисплазия III степени по некоторым признакам не отвечает критериям предрака. Это ясно из характеристик дисплазии:

- она трактуется по-разному – очаг незрелых клеток или очаг незрелых клеток с атипией клеток и структуры ткани;

- по морфологии – это самое близкое к раку изменение клеток и нередко дисплазия III степени превращается в рак;

- обнаруживается она в ткани морфологическими методами, но ими нельзя определить генотип её клеток;

- в каждом конкретном случае её судьба неизвестна: превращение в рак или регресс;

- очаг дисплазии III степени в качестве предрака рекомендуют использовать для любой ткани. Возникает вопрос: если очаг дисплазии III степени – это предрак, тогда почему никто не говорит, что её клетки – предраковые?

Н.А. Краевский и соавторы (1993) пишут: «Патологоанатом видит под микроскопом или нормальную клетку, или клетку опухоли, а при картине, которую считают предраком, он не имеет четырёх морфологических данных для выяснения его подлинной сущности». Каков генотип клеток дисплазии III степени – пока не ясно. Для этого клетки дисплазии необходимо исследовать с помощью ПЦР–ММК и МС–ПЦР методами. Ясно, что без опухолевого генотипа клеток очага дисплазии III степени её нельзя считать предраком.

Новый подход к ответу на вопрос, что такое предрак, возник с открытием стадий канцерогенеза. Из анализа стадий, предрак – это инициированная клетка

в той или иной ткани. Его характеристики отвечают тем двум критериям предрака, о которых мы сказали в начале этого раздела.

В этапах канцерогенеза участвует не ткань, а только клетка этой ткани. Если она имеет опухолевый генотип, но нормальный фенотип, – это предраковая клетка. Важно и то, что в любой ткани предрак – это предраковая клетка данного типа клетки. Отсюда: есть предрак, но нет предраковых заболеваний. (А.И. Рукавишников, 1994, 1999).

О связи предрака с 1-й стадией – стадией инициации, раньше нас сказал проф. В.М. Дильман (1986). Он подчёркивал: 1) «наличие стадии инициации можно трактовать как состояние биологического предрака, так как в этот период клетка уже генетически отличается от нормальной, но ещё не является раковой»;

2) «...после действия иницирующего агента на клетку, она уже не является нормальной, так как фаза инициации, по-преимуществу, необратима. Но эта клетка не является и злокачественной, поскольку вне промоции опухолевый процесс не проявляется. Следовательно, клетка, претерпевшая изменения под влиянием иницирующего агента, уже является предраковой» (цит. по: И.Ф. Сейц, 1986).

Итак, предраковая клетка имеет дефектный генотип, но нормальный фенотип. В норме в организме такая клетка должна уничтожаться апоптозом, т.е. самоубийством, как дефектная, и клетками иммунной системы, как чужеродная.

Акад. В.П. Скулачёв (2002) об этом пишет так: «Предраковые клетки уничтожают сами себя с помощью апоптоза. В половине случаев рак появляется тогда, когда «ломается» ген *wt53*, кодирующий белок *p53*, который «следит» за поломками ДНК. При их обнаружении он посылает предраковой клетке с измененным генетическим материалом сигнал «закончить жизнь самоубийством»».

Иммунные клетки организма – цитотоксические Т-лимфоциты «распознают и уничтожают чужеродные предраковые клетки». «Но если вдруг изменения в генетическом аппарате клетки зашли слишком далеко и происходит

сбой в иммунной системе, предраковая «клетка перерождается в раковую клетку».

Очаг предраковых клеток в ткани в условиях эксперимента (1-я стадия инициации) сходен с очагом дисплазии III степени, выявляемым морфологическими методами в ткани от пациента. И тот, и другой в самом начале процесса представляет небольшую группу или узелок из клеток в ткани размером 1-2 мм в диаметре. Заманчиво выяснить, не окажутся ли они идентичными по генотипу и фенотипу своих клеток. Такое предположение можно проверить с помощью ПЦР–ММК и МС–ПЦР в таких клетках материала биопсии из подозрительных мест в области фонового процесса. В случае совпадения генотипов и фенотипов их клеток можно сделать вывод: предрак в эксперименте есть то же, что очаг дисплазии III степени из предраковых клеток, но в условиях макроорганизма. Пока мы не встретили работ, в которых бы клетки дисплазии III степени из фонового процесса от пациента, были проверены методами ПЦР–ММК и МС–ПЦР.

А.В. Лихтенштейн, Г.И. Потапова (2005) пишут, что «устоявшаяся к настоящему времени практика выявления и уничтожения уже существующего рака – это момент, когда «битва» в значительной степени проиграна. С этой точки зрения, значительно, более благодарной мишенью для терапевтических воздействий является предшествующий раку массив мутантных клеток, не обладающих ещё всеми свойствами злокачественности». Такие мутантные клетки – не что иное, как предраковые клетки, – Прим. – А.Р.

В онкологии до сих пор используются термины: облигатный и факультативный предрак. Они вошли в монографии и во все учебники, в которых есть раздел онкологии.

При этом под предраком понимают измененную ткань в целом, а не очаг дисплазии III степени и не предраковую клетку в ткани. Термин «облигатный» означает, что эта измененная ткань во всех случаях превращается в рак, а «факультативный» – не всегда. Эти представления о предраке, а также и термины



его обозначающие, не соответствуют уровню знаний о предраке и поэтому должны быть исключены из медицинской литературы.

Поиск предраковой клетки и рака в подозрительных местах в области фонового процесса проводится на материале фрагмента ткани из этих мест, взятого при биопсии. Любой фоновый процесс на коже или слизистой оболочке, или в других местах тела и предраковая клетка в ткани – это онкопатология, и такой пациент относится к 1б клинической группе диспансерного наблюдения у врача-онколога.

На наш взгляд, для пациентов с фоновым процессом и предраком в каждом крупном городе должен быть организован предраковый центр. В таком центре, должны быть организованы: ПЦР-лаборатория, лаборатория культуры клеток, лаборатория стволовых клеток и др.

При наличии предракового центра вклад врача-стоматолога или врача другого профиля поликлиник в отношении пациентов с фоновым процессом и предраком, будет сведён к решению двух задач: 1) диагностировать клиническими методами фоновый процесс у пациента и направить его в предраковый центр. В отсутствие предракового центра, пациента необходимо направлять к специалисту в онкологический диспансер. В нём врачом-онкологом будет сделана биопсия из подозрительных мест в области фонового процесса и материал исследован морфологическими методами, а в будущем ПЦР–ММК и МС–ПЦР методами.

Для лечения пациента с фоновым процессом и предраком на слизистой оболочке и коже применяются два метода: криодеструкция жидким азотом и иссечение. Иссеченный материал направляют на исследование в патогистологическую лабораторию. Такое лечение должно выполняться в условиях онкологического учреждения. Это уже закреплено в лечебно-диагностической тактике врача-стоматолога выпускника в «Программе по хирургической стоматологии для студентов стоматологических факультетов медицинских учебных заведений. М., 1996 г.»:

### Лечебно-диагностическая тактика врача-стоматолога выпускника

Нозологическая форма	Диагностирует сам	Лечит сам	Направляет к онкологу
Фоновый процесс	+	—	+
Предрак	—	—	+

### **6.3. Инвазия раковых клеток: молекулярные причины и пути предотвращения**

В истории первым методом лечения рака было хирургическое иссечение, хотя в I в. н.э. делались попытки лечения рака лекарствами (W.R. Belt, 1957).

Уже тогда хирурги столкнулись с трудностями иссечения рака: очень часто возникал в области иссечения «возврат», т.е. рецидив рака, и крайне редко — «местное» излечение. Это заставило хирургов разрабатывать принципы операций при раке.

Ибн Сина (Авиценна, 980-1037 гг.) считал возможным хирургическое лечение рака, но советовал: «вырезать опухоль, отступя от её краёв, а дно раны прижигать раскалённым железом».

Причиной рецидива рака после иссечения хирурги объясняли оставлением части раковой опухоли. Для улучшения результата лечения рака позднее к иссечению его добавили иссечение регионарной клетчатки с лимфатическими узлами.

Результаты оперативного лечения рака вплоть до 1910 г., как писал акад. Н.Н. Петров (1910) были «совершенно безотрадными».

Не зря известный английский хирург Дж. Педжет (J. Paget, 1814- 1899) в 1853 г. оценил результаты лечения рака хирургическим методом так: «Хотя излечение рака вырезыванием и нельзя назвать делом совершенно невозможным, однако оно до такой степени мало вероятно, что надежда на такое излечение в

каком либо определённом случае не может быть разумно поддерживаема» (цит. по: Н.Н. Петров, 1910).

Очевидно, Реклингаузен был первым, кто «открыл движение и перемещение раковых клеток» (цит. по: А. Люке, 1870). Он предположил, что перемещение раковых клеток «может иметь важнейшее значение в развитии и распространении рака». Это явилось началом наших знаний об инвазии раковых клеток и причины «возврата», т.е. рецидива рака.

Первое описание инвазии раковых клеток в окружающие ткани мы нашли в работе проф. А. Люке (1870). Так как его данные имеют значение для нас и сегодня, мы приводим ряд выдержек из этой работы.

1. Рак распространяется на окружающие ткани «таким образом, что провести точную границу часто невозможно даже ножом». Он называл такое распространение «инфильтрацией».

Он выделил два варианта рака: 1) «от главной массы опухоли отходят корнеобразные отростки, углубляющиеся в соседние ткани»; 2) в этом случае «собственно массы опухоли не существует, а скорее разлитое набухание; при ячеистых наростах только микроскоп может решить, где граница новообразованного пропитывания». Из этого для врача вытекают весьма важные правила в оперативном отношении: необходимо всегда оперировать не иначе как в здоровых частях, если не хотят иметь «возврата».

2. «Всем известно, что наросты, удалённые каким-либо оперативным способом, к сожалению, в особенности хирургов, часто развиваются вновь в ране или в рубце».

«Чем разлитее опухоли, тем больше их способность к возвратам». Причиной «такой большой склонности к местным возвратам» он считает «способ распространения разлитых опухолей обыкновенно почти на все ткани, их окружающие».

Вот так описывает автор этот способ: «чем дальше от главной массы, тем гнёзда новообразования всё меньше и меньше; между тем как сначала ячейки видны ещё непрерывными рядами, потом они попадают уже только отдель-

ными группами всё меньшей и меньшей величины, разделяясь островками здоровой ткани; такие разбросанные группы могут окружать всю опухоль как по плоскости, так и в глубину; между тем как те из них, которые лежат ближе к центру и образуют более крупные скопления, заметны для невооруженного глаза и наощупь, более отдалённые могут быть открыты лишь с помощью микроскопа. Если мы удаляем при операции только то, что кажется больным на глаз и на ощупь, то остающиеся на месте микроскопические гнёзда беспрепятственно развиваются далее и ведут к возвратам».

«Я вполне убеждён, что местных возвратов не было бы никогда, если бы мы, удаляя названные опухоли, могли бы удалять вместе с тем и мельчайшие микроскопические гнёзда их».

3. «Если мы имеем перед собою опухоль, способную к возвратам, то отнюдь не следует оставлять на месте соседние с болезненным гнездом части. Выше мы видели, что наши диагностические средства не в состоянии указывать нам на присутствие микроскопических гнёзд в окружности опухоли. И поэтому необходимо без всякой жалости оперировать в здоровых частях, на достаточном расстоянии от больных тканей; требование это есть для больного *indicatio vitalis*. Перед ним должны умолкнуть, конечно, всякие косметические соображения. Все разумные хирурги настоящего времени согласны между собою в этом отношении, ибо, только поступая таким образом, можно справиться с болезнью и наверное предотвратить возврат».

4. О показаниях к оперативному лечению автор пишет так: «при злокачественных опухолях нужно руководствоваться тем основным правилом, чтобы удалять их, как можно раньше, дабы спасти всё тело от опухолевой болезни».

«При каких бы то ни было условиях, врач всегда одинаково должен настаивать на операции и не тратить дорогого невозвратимого времени на какое-нибудь бесполезное лечение. Чем опухоль меньше, тем легче можно положиться на некровавые способы, в особенности на прижигание. Но раз она представляется уже разлитой и захватившей соседние ткани, необходимо вырезывание ножом».

Что доказал проф. А. Люке? Он обнаружил, что: 1) инвазия раковых клеток происходит «вширь» и «вглубь»; 2) инвазия раковых клеток «без чётких границ»; 3) причиной рецидива рака после его иссечения является остающиеся в тканях раковые клетки.

Из этого он пришёл к выводу, что результат оперативного лечения рака зависит «от двух условий»:

1) «Раковые опухоли должны быть удаляемы как можно раньше».

2) «Они должны быть удаляемы вполне». Здесь слово «вполне» означает удалять рак так, чтобы не оставить в тканях ни одной раковой клетки.

А. Люке подчёркивает, что первое из этих условий «заслуживает распространения в массе более всякого другого, ибо мы знаем, что всегда имеется только один первичный раковый узел и что с его полным удалением прекращается и вся болезнь. Чем дольше мы будем медлить, тем менее надёжен будет исход всякого лечения». Теперь доказано, что при раке любого размера, видимого глазом, у пациента уже имеются метастазы. Из этого следует, что удаление даже ограниченного рака любой локализации к прекращению болезни в таком случае не приведёт.

Второе условие невыполнимо при «разлитом распространении страдания» из-за «микроскопических гнёзд, границу между здоровым и больным невозможно определить невооружённым глазом».

Как при раке определить здоровые ткани, чтобы через них иссекать рак? Проф. А. Люке рекомендует оперировать «на достаточном расстоянии от больных тканей», но как определить его во время операции, не даёт ответа.

Акад. Н.Н. Петров пишет, что зона здоровых тканей находится на расстоянии «не менее 1,5-2 см от осязаемого края опухоли, а при язвенно-инфильтративном раке – и больше».

Начиная от А.Люке (1870) и до сих пор, многие хирурги говорят и пишут: «рак инвазирует» или «рак прорастает». На самом деле это делает не рак, а его раковые клетки, так как рак не одно целое.

Ясно, что раковые клетки могут жить поодиночке, т.е. порознь, так как каждая раковая клетка – это одноклеточный организм. В таком случае следующим шагом должно стать познание причин свойства к инвазии раковой клетки.

Раковая клетка без этого свойства не была бы раковой, а значит, не было бы из неё этой самой опасной болезни – рака. Свойство к инвазии заложено в самой раковой клетке, – это выражение её хоуминга, т.е. миграция в свою нишу, так как раковая клетка – это стволовая клетка, а реализуется это генетическими нарушениями в ней.

Инвазия раковой клетки – это процесс из нескольких стадий, каждая из них создаётся за счёт изменений в соответствующих генах, через их продукт – белки.

В процессе инвазии раковой клетки различают три стадии (Ю.А. Ровенский, 1998, 2001):

- 1) приобретение раковой клеткой свойства отделяться от клеток своей ткани и от внеклеточного матрикса;
- 2) приобретение раковой клеткой свойства разрушать внеклеточный матрикс;
- 3) миграция раковой клетки в «очищенное» вследствие деструкции окружающей ткани место. Каждая из этих стадий – результат изменений в ряде генов.

Первая стадия. В тканях клетки «скреплены» друг с другом молекулами адгезии – кадгеринами. Это не позволяет им отделяться друг от друга. Молекула кадгерина обеспечивает адгезию клеток друг с другом – это межклеточные контакты.

Молекула кадгерина – это белок. В этой молекуле различают три части: наружная часть – вне клетки, средняя часть – в мембране клетки, третья часть – в цитоплазме клетки.

Наружная часть молекул кадгерина – это рецепторы, связывающиеся со своими лигандами, имеющимися на поверхности соседних клеток, а также с лигандами внеклеточного матрикса. Внутренняя часть молекулы кадгерина свя-

зывается с концом  $\beta$ -катенина, а другим его концом – с молекулой  $\alpha$ -катенина, затем  $\alpha$ -катенин связывается с цитоскелетом клетки.

«Скрепление» клеток с внеклеточным матриксом в ткани осуществляется отдельными участками клетки – фокальными контактами. В них сосредоточены молекулы адгезии – интегрины.

Молекула интегрин – это тоже белок, состоящий из  $\alpha$ - и  $\beta$ -частиц. В его молекуле также различают те же три части. Третья её часть через связь с другими белками связывается с цитоскелетом клетки (Г.П. Георгиев, 2000).

Адгезия клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом – основное условие целостности ткани. Через эти контакты клетка каждого типа выполняет свои функции, как часть этой ткани и организма.

В возникшей в какой-либо ткани раковой клетке возникают изменения в генах молекул адгезии – кадгеринов и интегринов, а также в других генах – ген wt 53 и др. В результате утраты контактов её с соседними клетками и внеклеточным матриксом, раковая клетка отделяется от них необратимо. С этого момента она уже не часть своей ткани, а элементарная единица живого – это клетка-организм. Она живёт в организме отдельно, сама по себе, бесконтрольно размножается в борьбе за место: её потомки инвазируют в окружающие ткани и разрушают их, погибают нормальные клетки, а раковые клетки-потомки занимают их место.

Вначале раковая клетка-организм делится и из своих потомков создаёт скопление в виде горстки клеток или узелка размером 1-2 мм в диаметре. Включение генов инвазии в раковой клетке возникает сразу или при диаметре узелкам в 1-2 мм.

Вторая стадия. Чтобы размножаться дальше и инвазировать в окружающую её здоровую ткань, раковой клетке надо разрушить её. А ткань – это сцепленные друг с другом клетки, а также пространство между ними, заполненное матриксом, – белковые волокна, мембраны и др. в геле. Для этого в раковой клетке включается ряд генов, ответственных за синтез гидролитических ферментов – протеиназ. Синтез их в раковой клетке больше, чем в нормальной

клетке, выше также и активность этих протеиназ. Они разрушают белки матрикса здоровой ткани (Г.П. Георгиев, 2000).

Третья стадия. В этой стадии раковые клетки активно перемещаются в разрушенный матрикс ткани. Но это свойство раковой клетки возникает в результате воздействия на неё молекул-мотогенов. Свойство клетки активно перемещаться по внеклеточному матриксу называется локомоцией.

Молекулы-мотогены – это различные факторы роста (GF) – эпидермальный (EGF), инсулиноподобный (IGF-1), фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующий фактор (TGF- $\alpha$  и TGF- $\beta$ ) и др. Многие из них способны вызывать не только локомоцию клеток, но и стимулировать их пролиферацию, т.е. быть митогенами. Синтез мотогенов может осуществляться аутокринным, т.е. самой клеткой, или паракринным, т.е. соседними клетками, способом.

Для индукции локомоции раковой клетки среди мотогенов особую роль играет рассеивающий белок или фактор. Это скеттер-фактор – СФ (от англ. to scatter – разбегаться, рассеиваться), открытый М. Стокером (M. Stoker, 1989).

М. Стокер показал, что при добавлении СФ в среду культуры эпителиоцитов, клетки утрачивают «склеивание» друг с другом в пласты. Они приобретают «локомоторную форму»; по краю переднего конца, имеющего вид широкой и тонкой пластинки, непрерывно образуются короткие и узкие выросты. Эти выросты – псевдоподии то выпячиваются и прикрепляются к подлежащему матриксу, то втягиваются обратно и расползаются поодиночке по подложке, т.е. «рассеиваются». Таким путём раковые клетки внедряются в окружающие здоровые ткани.

СФ синтезируется соседними клетками – фибробластами и другими клетками по сигналу – белку, секретируемому раковой клеткой. Для СФ на поверхности раковой клетки имеется белок-рецептор, который синтезируется ею в результате активации гена *c-met*. Т.е. раковая клетка – мишень для мотогенного воздействия СФ.



Есть мотогены, которые вызывают локомоцию клеток, но не стимулируют их пролиферацию. К ним относятся: аутокринный фактор локомоции – AMF и фактор стимуляции миграции – MSF. Оба обладают аутокринным действием, вызывая локомоцию самих клеток-продуцентов: AMF – меланобластов человека, а также фибробластов, трансформированных изменениями в гене *ras*. MSF фибробластов придаёт им, кроме того, свойство инвазии во внеклеточный матрикс.

При введении в эпителиоциты мутантного гена *N-ras* происходит перестройка их цитоскелета, что придаёт этим клеткам свойство к инвазии. При встрече друг с другом, они наползают друг на друга, но контакты между ними не формируются, это свойство раковой клетки.

Мы узнали основные молекулярные причины, создающие свойство инвазии раковой клетки. Это открывает пути для управления этим свойством раковых клеток.

Причины свойства инвазии – это метки или маркеры. Их можно использовать для оценки степени инвазии раковых клеток. Они же – мишени лекарств с целью подавления свойства инвазии раковых клеток.

Что можно было бы использовать для подавления свойства к инвазии раковых клеток из того, что мы сказали выше о его молекулярных причинах?

1. Подавлять инвазию с помощью ингибиторов протеиназ. Для этого можно создать моноклональные антитела или химические соединения против протеиназ.

2. Подавлять синтез или действие мотогенов, вызывающих локомоцию раковой клетки, в том числе средства против СФ.

Но как подчёркивает Ю.А. Ровенский (2001), «все те средства, которыми пользуются раковые клетки, применяют для перемещения и нормальные, т.е. здоровые клетки».

Протеиназы и мотогены синтезируют как раковые клетки, так и нормальные клетки и действуют «тоже на оба типа клеток, индуцируя их подвижность и деление». Отсюда, такие лекарства могут оказывать побочные действия.

Поиск лекарств от свойства к инвазии крайне необходим для уменьшения числа рецидива рака после лечения его оперативным методом. К счастью, для пациентов, страдающих раком, учёными, в том числе нашей страны, открыты гены инвазии раковых клеток.

П. Стик (P.S. Steeg, 1991) открыла ген белка nm23 в опухолевой клетке, подавляющий свойство инвазии. Если этот ген отсутствует или неактивный, т.е. нет его белка или изменён белок, то клетка приобретает свойство инвазии. Этот ген можно клонировать и применять как препарат против инвазии, действуя через свой продукт-белок nm23.

Акад. Г.П. Георгиев и его группа (1999) открыли ген *mts1* и его продукт-белок Mts1, или метастазин 1, который активируется и создаёт свойство инвазии раковых клеток. Ген обнаружен в клетках мыши и человека. В нормальной клетке этот ген «молчит» и его белок отсутствует. Если этот ген подавить или связать его белок в раковой клетке, то свойство инвазии этой клетки будет подавлено.

Проф. М. Фрейм (M. Frame, 2002) и её группа из Института Битсена (Шотландия) приблизились к пониманию молекулярных причин инвазии раковых клеток.

Они открыли особую молекулу Src-белок, способствующий инвазии раковых клеток в окружающие здоровые ткани. Это вещество разрушает связи между нормальными клетками, мешая их ограничительной функции.

Механизм действия этой молекулы удалось открыть не сразу. Оказалось, что Src-белок приводит к исчезновению с поверхности здоровых клеток белка Е-кадгерина. Мы уже знаем, что этот белок обеспечивает «скрепление» здоровых клеток друг с другом. Кроме того, исследователи полагают, что Src-белок вместе с молекулами-интегринами формируют новый, – менее «интегрированный тип структуры этой ткани», благодаря чему раковые клетки имеют возможность «двигаться и инвазировать».

«Теперь мы знаем, что эта молекула инициирует сразу несколько химических сигналов, влияя на клетки несколькими различными способами», – заявила она.

По мнению проф. М. Фрейм, более детальное понимание того, как инвазируют раковые клетки в окружающие ткани, способно помочь созданию лекарств, блокирующих этот процесс.

Открытие учёными особой молекулы – Src-белка предвещает новый путь к применению оперативного метода лечения рака с симптомами. По активным участкам пространственной структуры белка можно создать химическое соединение для избирательной блокировки этого белка. Кроме этого, можно блокировать и ген этого белка, который известен этим учёным. Тогда оперативное лечение рака может состоять из двух этапов: 1) вначале курс лечения пациента по блокировке Src-белка или этого белка и его гена; 2) после этого курса – операция на первичном очаге рака и путях лимфооттока.

Как подчёркивают учёные, «если раковые клетки будут лишены возможности инвазировать в окружающие ткани, попытка хирургического удаления рака будет иметь гораздо больше шансов на успех. Кроме того, раковые клетки не смогут образовывать метастазы в других органах и тканях».

Датские ученые из Копенгагенского университета (2004) полагают, что «блокировав работу определенного фермента, можно останавливать распространение раковых клеток в человеческом теле».

Исследователи считают, что это открытие «может привести к появлению принципиально новых антираковых препаратов и во многих случаях отказаться от химиотерапии, без которой сегодня лечение рака практически не обходится». Речь идет о ферменте – urokinase plasminogen activator, uPA, секретируемом раковой клеткой. Он осуществляет протеолиз белков внеклеточного матрикса, делая путь для инвазии раковых клеток в ткани.

Эксперименты на мышах показали, что «при инактивации одного-единственного фермента – uPA, распространение раковых клеток прекращалось

у шести из семи лабораторных мышей. При этом мыши не испытывали никаких неудобств от того, что этот фермент в их организмах не работает».

Анализ результатов позволил учёным сделать вывод: раковые клетки не могут распространяться в отсутствие иРА, но «организму деятельность этого фермента не нужна». Эта идея затем была подтверждена в ходе новых экспериментов: «мыши, которые в результате генетических манипуляций родились вообще без иРА, никак не ощущали его отсутствия».

«Это значит, что мы можем блокировать этот фермент, – говорит один из учёных, доктор М. Йонсен, – и таким образом предотвращать распространение раковых клеток без тяжёлых побочных последствий для пациента, к которым приводят другие формы терапии».

Следующий шаг в этом направлении – создание препарата, который работал бы на мышах. Только тогда можно приступить к решению вопроса о возможности испытаний этого препарата на людях.

Доктор Т. Сковсгаард, специалист по раку из копенгагенской клиники «Херлев», считает работу его коллег «очень многообещающей». «Если клинические испытания также покажут, что распространение раковых клеток может быть остановлено, – говорит он, – тогда станет ясно, что этой группе исследователей удалось найти ключ к этой проблеме».

«Это правда: терапия, которая предотвращала бы распространение раковых клеток, стала бы большим шагом на пути лечения рака», – согласна К. Ло, глава отдела клинических испытаний британского общества Cancer Research.

В заключение раздела, мы выделяем некоторые положения.

1. Утрата раковой клеткой контакта с соседними клетками и внеклеточным матриксом делает её клеткой-организмом.

Опухолевая клетка без свойства инвазии создаёт из себя незлокачественную опухоль. Удаление такой опухоли хирургическим методом обычно нетрудно, и на этом прекращается сама болезнь.

Опухолевая клетка со свойством инвазии, т.е. раковая клетка, создаёт из себя самую опасную болезнь – рак, которая пока неизлечимая.

2. Свойство инвазии раковой клетки делает её смертельной для пациента, страдающего от рака. Почему?

На этапе удаления первичного очага рака и регионарного метастазирования хирургическим методом невозможно удалить, не оставив хотя бы сколько-то раковых клеток где-то в ткани. Из них, как клеток-организмов, нередко возникает рецидив рака.

Проф. А.И. Барышников (2004) пишет так: «Как бы тщательно не удаляли рак, всегда остаются раковые клетки, из которых рак способен возродиться».

Объектом воздействия скальпеля хирурга является первичный очаг рака, региональная клетчатка и другие ткани с лимфатическими узлами и незримые в границах операционного поля раковые клетки.

В настоящее время хирург-онколог, каждый в своей анатомической области, достиг в технике операции предела, даже показывает чудеса в технике операции. Однако, для излечения рака с симптомами этого недостаточно, – далеко нередки рецидивы рака. Но главное другое.

Ведь рак в ткани до размера узелка 2 мм в диаметре – это ещё местная болезнь, а при размере больше этого, – становится системной болезнью из-за ангиогенеза и лимфангиогенеза в таком узелке, а значит, рассеивания клеток с кровью и лимфой.

Дж. Педжет (J. Paget, 1853), Н.Н. Петров (1910) и другие учёные подчёркивали ограниченность хирургического метода для излечения от рака. Причина этого – инвазия раковых клеток в ткани органов не имеет границ и без конца. Но молекулярные причины свойства к инвазии раковых клеток выяснены лишь теперь: молекула белка Src, ген инвазии и метастазирования *mts1* и его белок – *Mts 1*, ген остеопонтин и его белок и другие.

Улучшение результатов хирургического метода лечения рака можно ожидать лишь, подавляя свойство к инвазии раковых клеток, действуя лекарственными препаратами на эти молекулы, до операции и после операции. Пока это в практику врача-онколога не внедрено.

Если рак – это потомство из одной раковой клетки, то ясно, что для излечения от него, необходимо уничтожить все раковые клетки. То есть путь к излечению от рака один, и состоит в решении двух задач: 1) распознать в организме пациента каждую раковую клетку среди нормальных клеток и 2) уничтожить их все – «без остатка», не повреждая нормальные клетки.

Лучевое лечение и химиотерапия в стандартном виде неадекватны ни самой раковой клетке, – эукариот среди нормальных эукариотов, составляющих организм человека, ни следствиям свойства к инвазии раковых клеток – инвазия в окружающие здоровые ткани и метастазы по всему организму.

В ближайшие годы XXI века к хирургическому методу лечения от рака будут добавлены новые методы, позволяющие решить эти две задачи.

Из новых методов – это экстракты из эмбриональных тканей или их белки, вакцины на основе дендритных клеток и другие вакцины, а также лекарства к генам-маркерам и белкам-маркерам раковых клеток, избирательно уничтожающие эти клетки, т.е. без побочных эффектов, ведь действовать они будут только на определённые гены и белки раковых клеток.

#### **6.4. Метастазирование раковых клеток: молекулярные причины и пути предотвращения**

Другим, ещё более опасным следствием свойства инвазии раковых стволовых клеток, является образование ими метастазов в различных органах пациента.

Метастаз – это вторичный очаг рака, образующийся из-за метастазирования раковых клеток в отдаленные органы. Метастазирование (от греч. metastasis – перемещение) – процесс переноса раковых клеток по кровеносным и лимфатическим сосудам из первичного очага рака в другой орган или органы.

Ещё Ле Дран (Н. Le Dran, 1685-1770) предположил, что рак может возникнуть как локальная опухоль и лишь затем распространяется в регионарные лимфатические узлы.

В 1829 г. французский врач Ж.К. Рекамье (J. Resamier, 1774-1852) впервые доказал, что причиной метастазов являются раковые клетки. Он обнаружил инвазию вен раковыми клетками. Они переносятся в отдаленные участки тела. Из них там образуются «отдельные островки поражений», которые он назвал «метастазами». Как раковые клетки проникают в кровь и лимфу, долго оставалось не ясным.

Когда и в какой орган мигрировала первая раковая клетка, всегда не известно, как и возникновение первой раковой клетки где-то в ткани какого-либо органа. Если бы это знали, то могли бы уничтожить такую клетку, – не было бы ни рака, ни метастазов.

Причина в обоих случаях одна и та же – раковая клетка. Это объект микроскопической величины, а поэтому невидимый глазом. Лишь при концентрации в самом раке или метастазе  $10^{8-9}$  раковых клеток, они становятся видимыми глазом в органе при помощи методов – клиническое исследование, рентгенография, УЗИ и др.

Метастазы раковой клетки – главная причина смерти пациентов при раке. Причина в том, что лекарства стандартной химиотерапии неизбирательные, что не позволяет уничтожить все раковые клетки в организме пациента.

Ряд новых средств и методов от рака уже создан, но их лишь начинают внедрять в клиническую практику.

Метастазирование раковых клеток начинается с размера первичного узелка из раковых клеток размером 2 мм и даже 1 мм в диаметре, а к моменту видимых симптомов рака часть его клеток уже осела где-то в других органах «как семена вторичного рака», т.е. метастазы. Это явление в литературе обозначается термином – диссеминация.

Из этого вывод: для адекватного лечения пациента только операции всегда недостаточно и необходимо дополнительное лечение – системное с помощью лекарств.

Метастаз или метастазы образуется за счет инвазии раковых клеток сквозь стенку кровеносных и лимфатических капилляров и выходом в их про-

свет. С потоком лимфы клетки переносятся в лимфатические узлы, а с кровью – в различные отдаленные органы.

Метастазирование раковых клеток – это активный процесс и состоит из ряда этапов. Каждый этап контролируется разными генами через их продукт – белки в раковой клетке.

1-й этап. Некоторые клетки отделяются от первичного узелка из раковых клеток размером в 2 мм или 1 мм в диаметре и проникают через стенку питающих их капилляров, в их просвет. Они разносятся с кровью по организму до тех пор, пока не прикрепятся к эндотелию капилляров в каком-то органе или органах. В этом месте они вызывают сокращение клеток эндотелия и обнажают белковый матрикс – базальную мембрану (Рис. 1, а).

2-й этап. Раковые клетки прикрепляются к базальной мембране, связываясь с её белками с помощью своих рецепторов, которыми распознают компоненты базальной мембраны. Включив гены деструкции – протеиназу, они расщепляют белки матрикса и образуют в мембране отверстия (Рис. 2, б).

3-й этап. Раковые клетки вытягивают псевдоподии и проникают через отверстия, продолжая секретировать ферменты деструкции. Это позволяет им разрушать внеклеточный матрикс под базальной мембраной и затем внедряться в него (Рис. 3, с).

4-й этап. Для продвижения вперед в раковых клетках отключаются гены деструкции. Клетки утрачивают связь с матриксом на своей задней стороне, но цепляются псевдоподиями за матрикс впереди зоны лизиса, что приводит к миграции самих клеток во внеклеточный матрикс и далее вглубь здоровой ткани (Рис. 4, d).

Не все раковые клетки, проникшие в здоровую ткань, способны выжить. За счёт аутокринного стимула раковая клетка делится, образуя из своих потомков узелок в 1-2 мм в диаметре – микрометастаз. В нём еще нет сосудов – ни кровеносных и ни лимфатических, и питательные вещества в него попадают через его поверхность путем диффузии (Г.П. Георгиев, 2000).



Из-за недостатка питания часть клеток в узелке «отмирает», но взамен их путём размножения клеток узелка образуются новые клетки. Это «дремлющий» микрометастаз или микрометастазы. Они могут оставаться в тканях органа «многие годы», ни чем, не проявляя себя.

«Дремота» микрометастаза или микрометастазов «часто связана» с секретцией клетками первичного очага рака белков – ангиостатина и др., которые подавляют ангиогенез в микрометастазах (Г.П. Георгиев, 2000). В таком случае операция на первичном раке и путях лимфооттока вызывает ангиогенез в «дремлющем» микрометастазе, и он начинает быстро расти за счет деления его клеток.



Рис.1, а. Сокращение клеток эндотелия, выстилающих кровеносные сосуды, и обнажение базальной мембраны (рис. и цит. по: Л. А. Лиотта, 1992).

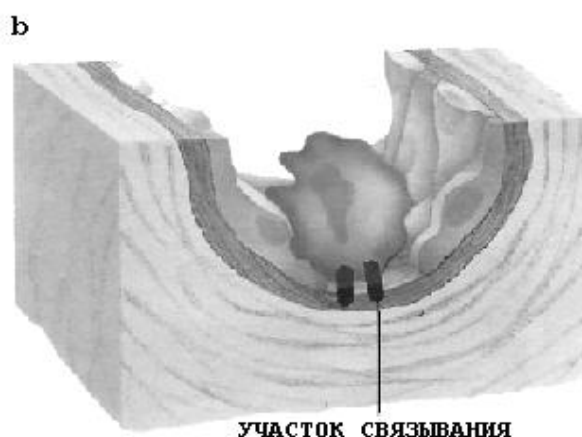


Рис. 2, б. Раковая клетка прикрепляется к базальной мембране, связываясь с определёнными белками (рис. и цит. по: Л. А. Лиотта, 1992).

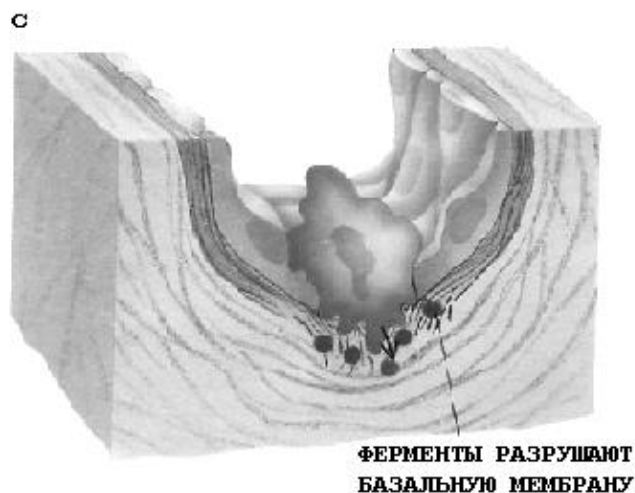


Рис. 3, с. Секретируемые раковой клеткой ферменты деструкции расщепляют белки матрикса, и в базальной мембране образуются отверстия (рис. и цит. по: Л. А. Лиотта, 1992).



Рис.4, d. Раковая клетка внедряется во внеклеточный матрикс под базальной мембраной и затем вглубь ткани (рис. и цит. по: Л. А. Лиотта, 1992).

Для индукции ангиогенеза в раковой клетке включается ген фактора роста эндотелия сосудов – VEGF, а также фактора роста фибробластов (FGFb). Они синтезируются и выделяются раковой клеткой – это белки-лиганды.

Далее белок-лиганд вступает в контакт со своим рецептором на поверхности клеток эндотелия мелких соседних венул окружающей ткани. По этому сигналу клетки эндотелия отделяются и мигрируют внутрь узелка и из них путём деления формируются кровеносные и лимфатические капилляры. Теперь при достатке питательных веществ и кислорода микрометастаз растёт и превращается в макрометастаз.

Как микрометастаз, так и макрометастаз являются новым местом, из которого раковые клетки мигрируют уже в другие органы и так без конца и границ, что ускоряет ухудшение состояния пациента.

При ангиогенез в метастазах образуются кровеносные капилляры и сосуды «мозаичного» типа, т.е. в их стенки встроены раковые клетки. Из стенок капилляров и сосудов раковые клетки ежедневно выходят в кровоток. Из этого важное следствие для практики: анализ на наличие раковых клеток в крови может позволить выявлять рак в организме пациента на самом раннем этапе – при размере узелка из раковых клеток 1-2 мм в диаметре.

Познания этапов метастазирования раковой клетки и их молекулярных причин позволит: 1) найти гены-маркеры и белки-маркеры для предсказания метастазов у пациента; 2) использовать эти маркеры в качестве мишеней для приготовления избирательно действующих лекарств, и предотвращать ими метастазы и 3) уничтожать уже существующие у пациента микрометастазы и макрометастазы.

В настоящее время учёные, в том числе нашей страны, дали уже немало знаний о молекулярных причинах метастазирования раковой клетки.

1. П.С. Стиг (P.S. Steeg, 1991) и её группа открыла ген и его продукт – белок nm23 в раковой клетке разного типа. Этот белок подавляет инвазию и метастазирование раковых клеток. По этой причине белок nm23 получил название антиметастатический (от англ. – nonmetastatic).

Ген этот отсутствует или неактивен в раковых клетках, поэтому его продукт белок nm23 в таких клетках отсутствует или дефектен. Это создаёт свойство инвазии раковой клетки и вызывает следствие этого, – образование метастазов.

Низкое содержание белка nm23 в клетках первичного рака явно связано с метастазированием, а высокий уровень коррелирует с отсутствием метастазов раковой клетки и благоприятным прогнозом. Отсюда: белок nm23 может быть использован не только для ранней диагностики, но и для лечения от рака.

Так, П.С. Стиг вводила ген, кодирующий nm23 в культивируемые метастазирующие клетки, что усиливало его экспрессию, т.е. синтез белка. Инъекции таких раковых клеток мышам приводила к тому, что эти клетки оказывались «неспособными к образованию метастазов».

П.С. Стиг и её группа считают, что метастазирование раковых клеток можно подавлять с помощью генотерапии, т.е. введением гена nm23 в раковые клетки. Теперь введение генов в клетки упрощается, если взять в качестве вектора вирус Т4.

2. Акад. Г.П. Георгиев и его группа (1999, 2000) открыли ген *mts1* и его продукт – белок Mts1 или метастазин 1. Этот ген не является онкогеном, так как учёные обнаружили, что при больших количествах белка Mts1 в нормальной клетке, она не превращается в раковую клетку.

Ген *mts1* экспрессируется во многих типах раковых клеток, а также в некоторых нормальных клетках – в активированных макрофагах. В большинстве нормальных клеток ген «молчит» и его белок Mts1 отсутствует.

Введение конструкции: ген *mts1* и регуляторный фрагмент в опухолевые клетки вызывало продукцию белка Mts1, и это резко усиливало способность клеток создавать метастазы при подкожной инъекции таких клеток мышам. Введение конструкций, подавляющих синтез белка Mts1 в раковые клетки, снижало способность клеток метастазировать.

Mts1 способен вызывать ангиогенез через «дезагрегацию клеток эндотелия и их активную пролиферацию».

Подавление гена или связывание его белка в раковых клетках будет подавлять метастатический фенотип раковых клеток.

Ген *mts1* и его белок – Mts1 необходимо использовать также для диагностики рака и контроля лечения пациента. На биочипах по титру иРНК этого гена и его белка Mts1 в образце крови от пациента удастся диагностировать метастазы рака.

Кроме этого, изменения в содержании гена и его белка в образце крови от пациента позволят следить за процессом лечения рака, а по отсутствию гена и его белка после лечения, – регистрировать излечение от метастазов рака.

3. Проф. Р. Бенезра (1999) и его группа из США открыли гены: JD-1 и JD-3. Эти гены в норме экспрессируются в клетках эмбрионов мышей и человека. Они через свой продукт – белки отвечают за рост и развитие кровеносной системы плода, но у взрослого человека они не экспрессируются.

Однако, раковые клетки вновь «включают» эти гены и используют для размножения себя. JD-гены индуцируют ангиогенез в узелке из раковых клеток, что препятствует их отмиранию.

Учёные надеются разработать лекарства против этих мишеней – генов и их продукта, – белков. «Избавиться от самого гена, вместо того чтобы бороться с продуктами его работы, означает по-настоящему сделать человечество неуязвимым для рака», – заявляют авторы открытия.

#### 4. Молекулярный «переключатель» метастазирования раковых клеток.

Учёные центра по изучению рака Техасского университета расшифровали молекулярные причины, вызывающие отделение раковых клеток от первичного очага рака и метастазирование в «различные части тела организма». Они подчеркивают, что метастазирование сильно затрудняет лечение и зачастую приводит к смерти пациентов даже в случае успешного удаления первичного рака.

Исследователи называют открытый ими механизм «молекулярным переключателем» и утверждают, что это открывает большие возможности для разработки новых методов против возникновения метастазов.

«Переключатель» представляет собой фермент GSK-3?, способный изменять функции белков и может стать ключом к разработке эффективных средств лечения рака.

Было известно, что в эпителиальных клетках содержится много белка Е-кадгерина, функция которого, – прикрепление клеток друг к другу.

Другой важный белок – фактор транскрипции, названный «снейл». Он контролирует ген, ответственный за синтез Е-кадгерина. Этот белок способен

«выключать» синтез Е-кадгерина, а это приводит к «высвобождению эпителиальных клеток».

В серии опытов был обнаружен фермент GSK-3?, который и контролирует «снейл». Под его воздействием «снейл» покидает ядро клетки, где он обычно находится, выходит в цитоплазму клетки и там разрушается.

То есть было обнаружено, что если действие «снейла» контролируется GSK-3?, то раковая клетка продолжает синтезировать Е-кадгерин и не перемещается. В случае же снижения активности GSK-3? происходит ослабление связей между клетками, и они получают способность передвигаться.

Учёные предполагают, что использование средств стимуляции фермента GSK-3? может снизить свойство раковых клеток к расселению. В настоящее время они заняты разработкой такого лечения.

Независимости размножения раковой клетки в культуре от субстрата, т.е. подложки, соответствует способность её и её потомков размножаться в организме независимо от типа ткани, в которую они проникают. Это относится к инвазии раковых клеток в окружающие здоровые ткани и к процессу образования метастазов.

Следствием первого процесса является захват раковыми клетками какой-то части организма пациента – разрушение тканей органа, гибель здесь нормальных клеток, а их место занимают раковые клетки.

В результате второго процесса, разрушаются ткани различных органов, и, если не вмешивается врач, то раковые клетки так захватят весь организм, что приводит пациента к смерти, после чего они погибают сами. «Но это они не понимают и об этом не думают». Это образно Uriel J. (1976) выразил так: «рак – это миф Фауста на клеточном уровне» – мечта клетки об омоложении и бессмертии, реализация которой кончается фатально».

В поисках средств и методов от метастазов нужно учитывать этапы процесса их образования и молекулярные причины каждого этапа.

Ж.К. Рекамье в 1829 г. описал местную инвазию и метастазы раковых клеток, но лишь в последние годы XX в. и теперь удалось, пока частично, объяснить эти явления, т.е. раскрыть их молекулярные причины.

Для уничтожения отдельных раковых клеток и их метастазов в организме пациента нужны лекарства и другие препараты, которые сами распознавали бы раковые клетки среди нормальных клеток, и уничтожали их.

Теперь ясно, что гены, превращающие нормальную клетку в раковую, – одни, а вызывающие инвазию и метастазы раковой клетки, – гены другие. Сбой в работе любого из этих генов и их продукта – белков, приведёт к тому, что раковая клетка будет не способна метастазировать.

П. Эрлих (P. Ehrlich, 1854-1915) в начале XX в. возродил идею, высказанную Д.Л. Романовским в 1891 г., основал «химиотерапию» и предложил этот термин. Лекарственные препараты начали применять против бактерий и паразитов болезней. Намного позднее химиотерапию стали применять для уничтожения раковых клеток.

П. Эрлих (1910) сформулировал тезисы, в которых подчеркнул задачи химиотерапии, и какой она должна быть. В том, архаичном стиле, они выглядели так: «Хемотерапия ставит себе задачу найти такие вещества, которые при большом влиянии на паразитов принесли бы возможно менее вреда организму». И далее: «Средство в практику не выйдет, если взаимоотношение между ядовитостью и лечебной дозировкой неблагоприятно». Отсюда возникло представление об идеальной по избирательности любого лекарственного средства – «магической пуле» П. Эрлиха.

Для каждого этапа метастазирования раковой клетки - изменения в гене или генах – это истинная причина, реализуемая через продукт гена. Ген с изменениями – это ген-маркер, а изменения в его продукте – белок-маркер. По ним осуществляется диагностика этапов метастазирования раковой клетки. Они же, т.е. гены-маркеры и белки-маркеры, являются целями или мишенями для новых лекарств.

Лекарство новой, т.е. молекулярной или генной медицины, – это молекулярная «пуля», бьющая точно в мишень или цель на том же молекулярном уровне.

«Отлить» нужную «пулю» для любой болезни, даже для тех, которые сегодня ещё неизлечимые или смертельные, например, рак, – вполне разрешимая задача. Но «только при одном условии: если четко определена мишень».

Итак, открытие генов и белков – причин инвазии раковой клетки, дают возможность:

- предсказывать потенции раковой клетки к инвазии и метастазированию по генам-маркерам свойства инвазии;
- обнаруживать микрометастазы раковой клетки в организме пациента путем выявления в крови и в других выделениях его генов-маркеров и белков-маркеров свойства инвазии;
- уничтожать уже имеющиеся метастазы раковой клетки в организме пациента, используя эти маркеры как цели или мишени для создания на их основе избирательно действующих средств и лекарств от их носителей – раковых клеток.

#### Как определить потенции к инвазии раковой клетки?

Пример 1.

Условия. В раковой клетке из ткани или из крови от пациента обнаружено, что ген белка nm23 отсутствует или неактивный. Значит, в раковой клетке отсутствует или дефектен продукт этого гена – белок nm23.

Вывод. Такая раковая клетка и ее потомки имеют высокую потенцию к инвазии, а значит, и к метастазированию.

#### Как подавить свойство инвазии этих раковых клеток?

В раковые клетки необходимо ввести: нормальный ген белка nm23, в крайнем случае иРНК этого гена с помощью, например, вируса Т4 или других векторов.

Пример 2.



Условия. В раковой клетке из ткани или из крови от пациента обнаружено, что ген фермента GSK-3? отсутствует или слабо экспрессируется. Значит, в раковой клетке и её потомках нет или мало фермента GSK-3?. В таком случае фактор транскрипции – белок «снейл» «выключит» полностью или частично синтез белка Е-кадхерина в раковой клетке.

Вывод. Такая раковая клетка и её потомки имеют выраженную потенцию к инвазии, а значит, и к метастазированию.

#### Как подавить свойство инвазии таких раковых клеток?

В раковые клетки необходимо: 1) ввести ген фермента GSK-3?; 2) к этому можно добавить введение какого-либо ингибитора к иРНК гена белка «снейл», лучшим из них является РНКи.

#### Как уничтожить уже имеющиеся метастазы раковой клетки?

Это способна сделать только новая медицина – молекулярная или генная медицина.

Для лечения рака любой локализации пациенту вначале будет сделана операция на первичном очаге с иссечением путей лимфооттока – это первый этап. Второй этап – действия генной медицины и препараты из эмбриональных тканей.

Для второго этапа несколько путей: 1) избирательные лекарства, созданные на основе генов-маркеров и белков-маркеров раковой клетки и маркеров свойства инвазии раковой клетки; 2) вакцины против раковой клетки и ее свойства к инвазии: ДНК-вакцины, вакцины на основе дендритных клеток; 3) вакцинация пациента эмбриональными стволовыми клетками, вакцины из экстрактов эмбриональных тканей и плаценты, на что особенно возлагаются большие надежды.

Инвазия раковой клетки в окружающие здоровые ткани и метастазирование без границ и без конца – ещё пример того, что раковая клетка – это одноклеточный организм или клетка-организм.

Свойство инвазии раковой клетки и её потомков создало нетипичную болезнь – рак. Найти в организме пациента каждую раковую клетку и уничтожить

ее, не затрагивая нормальные клетки, означает излечить пациента от рака. Однако достичь этого чрезвычайно трудно: вплоть до недавнего времени не было найдено абсолютных отличий раковой клетки от нормальной клетки того же типа.

Инвазия раковых клеток в окружающие нормальные ткани – разрушает эти ткани, а распространение через кровь и лимфу в различные органы – разрушает ткани этих органов. Оба эти процесса продолжаются: без конца – из-за бессмертия раковой клетки, и без границ – из-за свойства инвазии раковой клетки, пока не приведут пациента к смерти.

Итак, если бы раковая клетка, не была одноклеточным организмом и не имела бы свойства к инвазии, не было бы этой самой опасной болезни – рака, и всех проблем, создаваемых именно раковой клеткой в этой болезни.

#### **6.5. Ангиогенез и лимфангиогенез и их ингибирование для подавления пролиферации раковых клеток первичного рака и метастазов**

Из раковой стволовой клетки за счёт деления вначале в ткани, образуется скопление клеток-потомков виде узелка размером 1-2 мм.

Дж. Фолкмэн (D. Folkman, 1970) из США учёл тот факт, что когда идёт рост рака из узелка, клетки в его середине начинают отмирать, а те, что снаружи, интенсивно делятся. У него возникла идея, что для роста рака должна заново, т.е. *de novo*, создаваться сеть кровеносных капилляров, которая питает раковые клетки.

В 1993 г. он и его группа в экспериментах доказали, что кровеносные капилляры создаются в узелке из раковых клеток, который едва достигает размера 2 мм в диаметре, – из крови раковые клетки получают кислород и питательные вещества.

Они пришли к выводу, что рак никогда не достигнет размера более 2 мм, если ингибировать развитие в нем новой сети не только кровеносных, но и лимфатических капилляров.

Теперь изучены молекулярные причины ангиогенеза и лимфангиогенеза в узелке из раковых клеток. Это начинается после того, как в раковой клетке включатся гены, отвечающие за синтез белков-лигандов: белок VEGF-1 – фактор роста эндотелия сосудов и FGFb – фактор роста фибробластов. Они секретируются раковыми клетками и диффундируют к эндотелию мелких вен ткани. На поверхности клеток эндотелия они соединяются со своими молекулами-рецепторами и так передают им сигнал к делению. Клетки эндотелия отделяются и мигрируют в толщу узелка из раковых клеток. В нём они делятся и образуют сеть не только из кровеносных, но и из лимфатических капилляров.

Главным из этих белков является VEGF-1. Он был выявлен как первый избирательный ангиогенный фактор для эндотелиальных клеток. Однако, еще важнее белок VEGF-C, так как участвует в регуляции контроля деления лимфатического эндотелия, стимулирует лимфангиогенез и метастазирование раковых клеток с лимфой. В результате создаётся кровоснабжение и лимфообращение в узелке рака диаметром в 2 мм, который уже не имеет ограничения для размножения его клеток (Г.П. Георгиев, 2000).

Другие учёные из США обнаружили, что в процессе ангиогенеза в узелке образуются «мозаичные» кровеносные капилляры, т.е. в их стенки среди клеток эндотелия встроены раковые клетки.

С помощью маркеров они определили долю эндотелиальных и раковых клеток в стенках кровеносных капилляров рака толстой кишки, имплантированного мышам. Оказалось, что «примерно 15% капилляров» в опухоли являются мозаичными, а площадь сосудистой стенки, образованной раковыми клетками, достигает 4% от общей площади стенок сосудов в ней.

Из расчёта учёных, до 50% раковых клеток стенок сосудов ежедневно выходят в кровоток. То есть, формирование мозаичных сосудов может являться одним из путей метастазирования раковых клеток. Если такое явление подтвердится у больных раком, то анализ на наличие раковых клеток в крови пациента позволит выявлять самое «начало» рака, т.е. узелок из раковых клеток размером 1-2 мм в диаметре в ткани органа.

Что агрессивность раковых клеток и их метастазирование прямо зависит от образования новых капилляров, было доказано Д. Фолкмэн в ряде экспериментов на животных.

1. Фрагменты агрессивной эпителиомы подсаживали в хрусталик глаза крыс, в хрусталике нет кровеносных сосудов. В течение 30 дней фрагменты рака оставались в толще хрусталика «в подвешенном состоянии, не увеличивались при этом в размерах». После пересадки любого из этих фрагментов в область лимбуса, где много капилляров, клетки рака начинали размножаться и проявляли бурный рост рака (Folkman and Gimbrone, 1976).

2. Раковые клетки способны синтезировать и секретировать белок ангиостатин, который ингибирует пролиферацию раковых клеток. При раке Льюиса этот белок ингибировал образование капилляров *de novo* и этим задерживал рост метастазов. Эти эксперименты подтверждают важную роль ангиогенеза для роста солидного рака.

Ангиостатин подавляет рост рака у мышей. При лечении этим белком размеры рака уменьшались до микроскопических величин и оставались такими всё время, пока вводили этот препарат. Из этого следовал вывод: действие ангиостатина обратимо, в этом недостаток препарата.

Другое вещество – эндостатин, в экспериментах оказался ещё более эффективным, а при введении того и этого препарата, рак у мышей практически исчезал.

В настоящее время разрешены клинические испытания этих препаратов. Но на выходе новый препарат – васкулостатин. Он в 14 раз сильнее угнетает пролиферацию эндотелицитов кровеносных капилляров, чем ангиостатин и в 2 раза эффективнее эндостатина. Ген этого белка ещё не выделен и испытания на животных не проводились.

#### Ингибиторы и стимуляторы ангиогенеза

В процессе роста рака в организме уровень секретируемого VEGF-1 белка повышается, а уровень секреции тромбоспоидина падает за счёт утраты негативного регулятора ангиогенеза – тромбоспондина (TSP).

Тромбоспондин – гликопротеин внеклеточного матрикса. Его синтезируют эндотелиальные и другие клетки различного типа, и некоторые раковые. Он является главным ингибитором ангиогенеза, так как влияет на адгезию и пролиферацию эндотелиальных клеток.

Контроль синтеза тромбоспондина осуществляется геном wt53 через его белок – p53. При мутации этого гена в раковой клетке нарушается синтез этого белка. Содержание белка VEGF-1 значительно ниже в раковых клетках, в которых ген wt53 нормальный, и с низкой степенью ангиогенеза. Против действия этого белка и направлены разрабатываемые лекарственные препараты.

#### Роль ангиогенеза и лимфангиогенеза в метастазировании раковых клеток

Метастазы – главная причина смерти пациентов, страдающих от рака, и прямо связаны со степенью васкуляризации рака. Метастазирование раковых клеток происходит за счет свойства раковой клетки к инвазии, т.е. проникновению раковых клеток в окружающие здоровые ткани и в сосуды через их стенку.

Это активный процесс: в раковой клетке включаются гены протеиназ для разрушения внеклеточного матрикса ткани и стенки сосудов, а также гены инвазии: ген mts 1, репрессия гена белка nm23 и др.

Метастазы образуются в тканях различных органов путём переноса раковых клеток с кровью и лимфой. Теперь эти знания существенно дополнены – инвазия и метастазирование происходит по сигналу от раковой стволовой клетки с участием гемопоэтических клеток костного мозга, воспринимающими сигнал. Этот процесс миграции раковых клеток без конца и границ, что и является основной причиной смерти пациента от рака.

#### Удаление первичного рака стимулирует рост микрометастазов раковых клеток

В 1994 г. Д.Фолкмэн и его группа на основе экспериментов на животных дали два объяснения этому явлению.

1. Клетки первичного рака синтезируют и секретируют ингибитор ангиогенеза – ангиостатин. Этот белок имеет большое время полужизни и действует системно, подавляя пролиферацию эндотелицитов. Иссечение первичного рака

приводит к истощению ангиостатина в сыворотке крови, и это вызывает быстрый рост микрометастазов.

2. При наличии ингибитора ангиогенеза микрометастазы находятся в дремлющем состоянии, так как размножение раковых клеток равно скорости отмирания их за счёт апоптоза. После иссечения первичного рака, а значит и удаления ингибитора, микрометастазы быстро растут из-за уменьшения числа апоптотических клеток при той же скорости деления раковых клеток.

#### ID-гены в регуляции ангиогенеза раковых клеток

Проф. Р. Бенезра и его группа (1999) из ракового центра Нью-Йорка выделили два гена в раковой клетке, обеспечивающие ангиогенез. Это гены: ID-1 и ID-3, в норме они имеются в геноме мыши и человека.

ID-гены отвечают за развитие и рост кровеносной системы плода, а у взрослого человека они не «включены», т.е. «молчат».

Однако в раковых клетках они вновь включаются, что вызывает ангиогенез, поддерживая их жизнь и пролиферацию. Это явление учёные подтвердили многочисленными опытами на мышах. Они провели такой опыт:

- вывели мышей с ослабленными ID-генами;
- привили этим мышам клетки рака из раковой опухоли.

Результат опыта: ни у одной из мышей возникновения рака не было обнаружено. Э. Янг – участник этого опыта, впервые обнаружила и оценила результат опыта так: «мы не могли такого предвидеть».

Наоборот, проф. Р. Бенезра – руководитель этой группы учёных считает, что ничего неожиданного в этом нет: «При блокировании поступления крови к раковым клеткам, ни один из видов рака не может развиваться. Это вполне естественно».

Теперь учёные заняты тем, что «выводят мышей, у которых рак развивается так же, как и у человека». На клетках рака от человека в лабораторных исследованиях они уже подтвердили своё открытие.

По мнению авторов, необходимо ещё немало исследований в этом направлении. В случае закрепления успеха, они планируют непосредственное

воздействие на ID-гены, разработав лекарства, которые бы подавляли экспрессию этих генов у больных раком; когда питание раковых клеток прекращается, то они быстро погибают.

«В будущем, через много лет, мы сможем непосредственно воздействовать на эти «опасные» гены человека. Избавиться от самого гена, вместо того чтобы бороться с продуктами его работы, означает по-настоящему сделать человечество неуязвимым для рака», – заявляют авторы открытия.

Дерепрессия ID-генов в раковой клетке, которые «работали» в клетке в эмбриогенезе, еще один признак того, что раковая клетка – это эмбриональная стволовая клетка.

Учёным во главе проф. Р. Бенезра, кроме этого, удалось вывести породу мышей, которые стали устойчивыми к любым типам раковой клетки. Это вселяет надежду победы над раком, воздействуя на такие гены в раковой клетке у человека.

#### Оценка уровня ангиогенеза в раковой опухоли

Так как ангиогенез необходим с момента формирования узелка из раковых клеток с размера его 2 мм в диаметре, очень важно разработать маркеры для оценки его, начиная с этого уровня. Причина в том, что с началом ангиогенеза и лимфангиогенеза раковые клетки начинают распространяться по всему организму пациента, т.е. рак становится болезнью всего организма.

В настоящее время в качестве маркеров ангиогенеза рака используются: количество микрокапилляров в раковой опухоли и число пролиферирующих эндотелиальных клеток. Эти маркеры определяются на материале раковой опухоли и её метастазов. Ясно, что оценка уровня ангиогенеза по таким маркерам – это знания «post factum».

Для клинической практики необходимы такие маркеры, которыми можно было бы оценить уровень ангиогенеза не на материале уже симптомов рака от пациента, а при раке размером с 2 мм в диаметре.

Теперь это возможно на основе открытия ID-генов, вызывающих ангиогенез с узелка из раковых клеток в 1-2 мм в диаметре в ткани. Это можно сде-

лать двумя способами: 1) по степени экспрессии I-D1 и I-D3-генов по анализу образца плазмы крови от конкретного пациента и 2) по содержанию продуктов этих генов, т.е. белков в образце сыворотки крови от этого пациента.

Важно также исследовать степень активности в клетках генов VEGF-1 и FGFb и содержание их белков. Эти анализы в настоящее время можно выполнять на ДНК-чипе и белковом чипе.

Такие критерии оценки уровня ангиогенеза можно использовать для ранней диагностики раковых клеток и слежения за эффектом лечения рака с помощью ингибиторов ангиогенеза.

### Ингибиторы ангиогенеза

Такое воздействие в литературе называется антиангиогенным лечением рака (Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников, М.Р. Личиницер, 2000; Е.В. Степанова, 2002). В настоящее время для этой цели имеется ряд препаратов, которые уже проходят клинические испытания. По механизму действия их делят на две группы: 1) ингибиторы передачи сигнала к делению эндотелиальных клеток и 2) ингибиторы пролиферации эндотелиальных клеток.

Г.П. Георгиев, С.Л. Киселев, Н.В. Гнучев (2003) для лечения рака особенно перспективным считают использование сочетания антиангиогенного средства и генной вакцинотерапии. Это они объясняют тем, что такое сочетание действует на независимые мишени – на раковую клетку и на эндотелий формирующихся микрокапилляров. Кроме этого, «оба метода не зависят от того, какие гены вызвали превращение нормальной клетки в раковую клетку».

1. Блокада VEGF-C для ингибирования пролиферации раковых клеток и метастазов.

VEGF-C – это цитокин, самый главный фактор стимуляции образования новых капилляров для пролиферации клеток рака и их микрометастазов в тканях. Именно он индуцирует из узелка раковых клеток в 2 мм в диаметре рост первичного рака и микрометастазов его в организме пациента.



Отличительная черта этого цитокина: он в равной степени индуцирует в узелке из раковых клеток размером 2 мм в диаметре образование не только кровеносных, но и лимфатических капилляров.

Проф. Х. Кубо и его группа (Н. Kubo, 2004) из университета Киото создали антитела, блокирующие фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-C). Это прекращает передачу сигнала из-за отсутствия этого белка к рецептору на эндотелиицах мелких вен.

В результате: эндотелициты не делятся и не мигрируют в узелок из раковых клеток при размере, едва достигшего 2 мм, первичного рака и микрометастазов. Этим блокируется ангиогенез и лимфангиогенез в среде раковых клеток, и они в отсутствие питания через кровь, быстро погибают.

Учёные считают, что сделанное ими открытие позволит подавлять свойство раковых клеток индуцировать образование новых кровеносных и лимфатических капилляров в узелке из раковых клеток, начиная с размера его в 2 мм. Это предотвратит метастазирование раковых клеток, что «значительно увеличивает шансы на успех в лечении рака».

2. Раковую клетку можно заставить синтезировать лекарство против себя самой.

Такой метод уничтожения раковых клеток разработали учёные из Йельского университета США (2001). Метод позволяет уменьшать кровоснабжение раковых клеток за счёт уничтожения кровеносных сосудов в опухоли. Это новое и быстро развивающееся направление. В отличие от прежних методов, этот метод разрушает сосуды в раковой опухоли, а не препятствует образованию новых.

Учёные обнаружили, что на поверхности клеток, выстилающих сосуды внутри опухоли, в отличие от сосудов в нормальной ткани, имеется молекула-рецептор, названная TF. С ней плотно связывается молекула fV11, которая циркулирует в крови. Выяснено, что если к этой молекуле добавить антитело, то получившийся комплекс будет разрушать стенку сосудов.

Молекула, разрушающая кровеносные сосуды, вводится внутрь опухоли с помощью безвредного вируса. После инфицирования раковые клетки начинают производить в большом количестве вещество, оно и вызывает разрушение сосудов и гибель раковых клеток.

Метод испытан в экспериментах на лабораторных животных, которым были привиты клетки меланомы и рака простаты от человека. Животные оставались живы до конца эксперимента – почти двести дней, в то время как животные контрольной группы, не получавшие такое лечение, прожили не более 63-х дней.

Учёные заявили о готовности испытать этот метод на добровольцах, страдающих от меланомы кожи.

3. В США успешно испытана новая вакцина против рака различного типа клетки.

Новая вакцина против рака разработана группой американских учёных во главе с иммунологом Ральф Рейсфельдом. Они отмечают, что «вакцина действует против ангиогенеза, к которому приводит рак, едва достигнув 2 мм в диаметре». Раковые клетки нуждаются в «сверхпитании», которое и получают, «провоцируя создание новых кровеносных сосудов».

В опытах на мышах «вакцина блокировала приток крови к опухоли и препятствовала её росту. Кроме того, у мышей ещё на 10 месяцев появлялась защита от повторного роста опухоли».

Ральф Рейсфельд использовал вакцину, содержащую FLK-1 против белка, вызывающего рост кровеносных сосудов вокруг опухоли. Мышам с тремя различными типами рака прививалась вакцина, содержащая генетически изменённые, непатогенные бактерии, способные производить большое количество FLK-1.

Результаты: «появлялась довольно продолжительная и устойчивая иммунная реакция, способная блокировать кровеносные сосуды вокруг раковых опухолей. Эти сосуды ослаблялись и, в конечном счёте, исчезали вовсе». «Помимо этого, почти не наблюдалось побочных эффектов. Эта вакцина, привитая

человеку, будет еще более эффективной в сочетании с другими методами лечения, способствующими гибели раковых клеток, и окажется полезной для предотвращения рецидивов».

Е.В. Степанова (2002) считает, что особенность антиангиогенной терапии в том, что она оказывает «цитостатический эффект» при воздействии на раковые клетки.

Автор делит ингибиторы ангиогенеза на два класса и объясняет механизм их действия.

1. Прямые ингибиторы ангиогенеза действуют на эндотелиальные клетки, что блокирует их пролиферацию, миграцию и активацию апоптоза в этих клетках.

2. Непрямые ингибиторы ангиогенеза подавляют синтез ангиогенных белков раковыми клетками: VEGF-1, FGFb и др.

Познания молекулярных причин ангиогенеза и лимфангиогенеза на этапе рака в 1-2 мм в ткани, открытие ID-генов и других причин, вызывающих эти процессы, позволят врачам-онкологам управлять этими процессами.

Это важно для раннего обнаружения первых раковых клеток первичного рака и микрометастазов, подавления их пролиферации и уничтожения.

#### **6.6. Участие гемопоэтических клеток костного мозга в процессе метастазирования: новые мишени диагностики метастазов раковых клеток и их уничтожения**

Причины, по которым раковые клетки могут покидать первичный очаг рака и мигрировать в другие части тела, до конца не изучены. Многие жизни можно будет спасти, если удастся останавливать этот процесс.

До сих пор считалось, что место образования метастаза определяется тем, в какой орган или органы с потоком крови попадает раковая клетка или клетки из первичного очага рака. Из неё за счёт деления в ткани органа образуется микрометастаз – узелок из потомков раковой клетки размером 1-2 мм.

Размер узелка из раковых клеток до 1-2 мм в диаметре в ткани органа может быть не только микрометастазом, но также и первичным очагом рака в ткани.

Уже с размера 2 мм этого первичного очага рака или микрометастаза раковые клетки могут отделяться от них и таким же путем переноситься в другие органы и оседать в их тканях, образуя там новые очаги метастазов.

К настоящему времени открыт ряд генов и их продукты – белки в раковых клетках, которые вызывают образование метастазов в организме.

Теперь выяснилось, что образование метастазов из раковых клеток – это «вовсе не хаотический, а полностью управляемый процесс». Им управляет раковая клетка: сама подготавливает путь для метастаза и сама регулирует его образование в тканях органа или органов.

Проф. Д. Лайден (David Liden, 2005) и его группа из Университета Корнелла (США), а также другие исследователи выявили ранее неизвестные молекулярные причины процесса образования метастаза из раковой клетки и сообщили об этом в журнале «Nature» в конце 2005 г. Ниже мы излагаем некоторые данные из краткой статьи группы учёных – R.N. Kaplan, R.D.Riba, S. Zacharoulis et al. (2005) и др.

Миграция клеток в организме вызывается биохимическими сигналами, т.е. сигнальными молекулами. В культуре раковых клеток обнаружено, что эти клетки экспрессируют и секретируют ряд таких молекул: VEGF-1 – фактор роста эндотелия сосудов 1 типа, IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1, CXCR4 – рецептор фактора SDF-1 (stromal-derived factor), VLA-4 и др.

Метастаз образуется из раковой клетки за счёт её размножения. До этого она должна найти себе место в ткани и «встроиться» в неё. Но как выяснили учёные, для этого раковой клетке требуется помощь костного мозга.

Ещё до того, как раковые клетки отделятся от первичного очага рака, для них «в разных точках» организма готовятся специальные «ниши» – в них впоследствии и появляются раковые клетки. Эти ниши образуются гемопоэтическими клетками из костного мозга.

Начало образования метастаза с секреции раковой клеткой молекул сигнала – VEGF-1. Они поступают в костный мозг и вступают в контакт с гемопоэтическими клетками, так как на их мембране имеется рецептор к молекуле-сигналу – VEGFR-1.

В обычном состоянии эти клетки длительное время не делятся, т.е. «спят». Но, получив биохимический сигнал, гемопоэтические клетки покидают костный мозг и мигрируют «в разные места» организма, где оседают и размножаются, готовя преме́тастазные ниши. В эти ниши позднее придут раковые клетки из первичного очага рака (D. Lyden et al., 2001).

Для проверки гипотезы образования такой ниши, учёные провели серии опытов на мышах. Вначале с помощью облучения у мышей были убиты клетки костного мозга. Взамен этим же мышам был трансплантирован костный мозг. Клетки его были помечены зеленым флуоресцентным протеином трансфекцией гена этого протеина в клетки – GFP. Это облегчало визуализацию движения этих клеток под микроскопом.

Через 4 недели, когда новые клетки костного мозга прижились, мышам ввели внутривенно раковые клетки: одним мышам – клетки от легочного рака Льюиса, а другим мышам – клетки меланомы B16. Для клеток рака Льюиса после введения мышам характерны метастазы в лёгкие, печень, а для клеток меланомы – печень, селезёнка, почки.

Через 2 недели после введения раковых клеток Льюиса, в лёгких были обнаружены скопления меченых гемопоэтических клеток, но не метастазы.

На 9-й день после этого в лёгких были обнаружены метастазы в тех же местах, куда до этого мигрировали гемопоэтические клетки костного мозга. При этом более 95% раковых клеток метастазов в легких было связано с гемопоэтическими клетками, имеющими метку GFP.

Исходя из этого, учёные сделали вывод: гемопоэтические клетки, мигрировавшие из костного мозга, образуют в лёгких преме́тастазные ниши.

Схема этапов процесса метастазирования включает:

- секреция раковой клеткой VEGF-1, CXCR-4, PlGF, что вызывает экспрессию факторов хемотаксиса – фибронектин, SDF-1 в органе-мишени;
- миграция VEGFR-1 гемопоэтических клеток костного мозга по хемотаксическим осям в ткани органа-мишени, их адгезия к клеткам ткани с помощью молекул адгезии VLA-4, Id3 и образование премеаастазных ниш;
- миграция VEGFR-2 клеток, вызывающих ангиогенез и заканчивающих формирование ниш;
- лишь после этого миграция раковых клеток из первичного очага рака в нишу или ниши и образование из них путём размножения зрелого метастаза или метастазов. Не исключается, что при этом происходит слияние раковых клеток со стволовыми клетками костного мозга.

Оказалось, что место формирования премеаастазных ниш определяется типом раковой клетки и молекулами-сигналами, указывающими путь метастазирования: для рака Льюиса – в лёгкие и печень, а для меланомы B16 – печень, селезёнка и почки. Это было доказано в опытах на мышах.

Опыт: мышам вводили микросреду от культуры клеток меланомы B16. Это вызывало выход в кровоток гемопоэтических клеток и образование из них премеаастазных ниш в печени, селезёнке и почках. Через некоторый срок этим же мышам внутривенно вводили клетки меланомы B16.

Результат: клетки меланомы мигрировали в премеаастазные ниши и сформировали в них метастазы меланомы. Такой же результат был получен в опытах на мышах соответственно с клетками рака Льюиса.

Итак, места миграции гемопоэтических клеток совпадают с типичными или «природными» местами метастазирования у двух изучавшихся типов рака в опытах на мышах. В других органах мышей скоплений гемопоэтических клеток и метастазов не было обнаружено.

Для формирования метастаза в нише большую роль играет синтез и выделение клетками костного мозга фибронектина – вязкого вещества, закрепляющего раковые клетки на поверхности ниш органа-мишени.

SDF-1 экспрессируется стромальными клетками ниши, а к нему на раковых клетках имеется его рецептор – CXCR-4. Это вызывает хемотаксис раковых клеток в премеаастазные ниши.

Главную роль в формировании премеаастазных ниш в ткани играет VEGFR-1. Это подтверждено введением моноклональных антител к этому рецептору после имплантации раковых клеток животным – полное предотвращение метастазирования раковых клеток обоих типов.

Введение моноклональных антител к VEGFR-2 уменьшало метастазирование раковых клеток, а введение тех и других антител «блокировало образование метастазов и даже самих ниш перед началом миграции раковых клеток» (Рис. 1).

Проф. Д. Лайден подчеркивает, что «до сих пор все боролись с первичным очагом рака и относительно мало внимания обращали на процесс образования метастазов, а ведь именно они и являются главной причиной гибели больных».

Группа учёных в серии опытов на мышах смогла наблюдать весь процесс метастазирования раковых клеток – «от отправки сигнала до появления метастазов».

«Пока другие лаборатории год за годом исследовали непосредственно клетки, образующие метастазы, мы решили подойти с другой стороны и начали изучать «окружающую среду» – где именно они образуются, почему именно в этом месте, а не в другом», – объясняет секрет успеха проф. S. Rafii – один из соавторов исследований Дэвида Лайдена.

По мнению учёных, число ниш для метастазов определяется геномом пациента, а их место – «в разных местах» или «по всему организму».

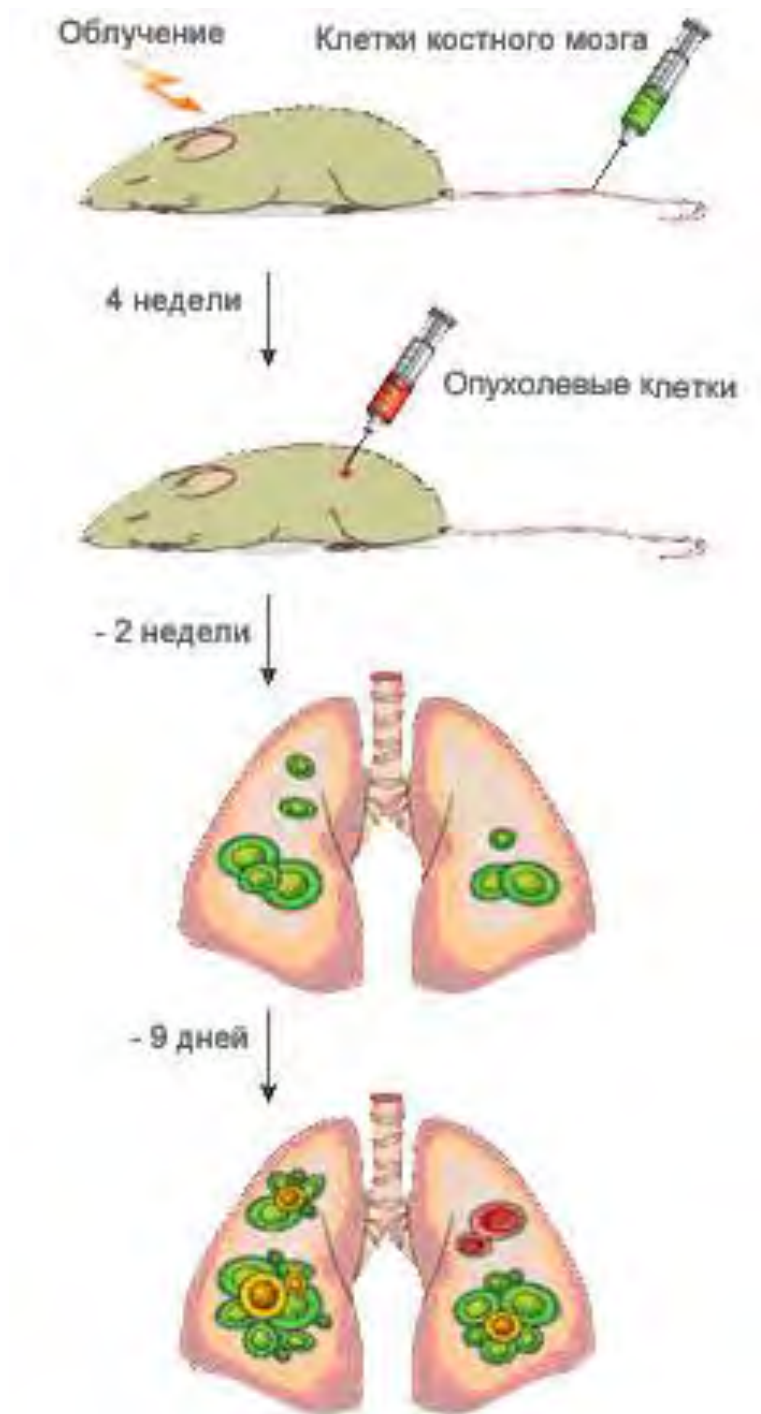


Рис. 1. Схема эксперимента Rosandra N. Kaplan et al. (2005).

Из исследований авторов не ясно:

- 1) образуются ли ниши для метастазов раковых клеток только «в разных местах» или всё же «по всему организму»;
- 2) что заставляет гемопоэтические клетки мигрировать в здоровую ткань органа для формирования ниш, если в такой ткани до этого нет раковой клетки или поврежденной клетки.



В экспериментах авторов мышам взамен убитых клеток костного мозга был трансплантирован костный мозг. Среди клеток костного мозга по гипотезе М. Kucia и его группы (2004) есть популяция тканеспецифичных стволовых клеток (ТССК). Эти клетки способны давать специализированные клетки определённой ткани и/или активно участвовать в её регенерации. Некоторые учёные мечтают селективно изолировать эти клетки из костного мозга и использовать в лечении повреждений конкретной ткани или органа.

Раковая стволовая клетка – это тоже повреждённая клетка, так как на выделяемый ею сигнал, – фактор роста, стволовые клетки костного мозга мигрируют к ней. Возможно, что гипотеза М. Kucia может дать ответ на эти два вопроса.

Может быть, получив сигнал от раковой клетки, клетки костного мозга мигрируют к раковой стволовой клетке и в те здоровые органы и их ткани, регенерацию клеток которых они обеспечивают. Тогда это и определяет место и число ниш в органе.

Выше мы отмечали, что начало образования метастазов в тканях органа-мишени происходит на клеточном уровне: из потомков клетки образуется узелок в 1-2 мм в диаметре. Однако, нет ни одного прибора, которым бы можно было выявить в ткани какого-либо органа микрометастаз или первичный очаг рака такого размера.

Но проф. Д. Лайден считает, что «в любом случае все-таки можно зафиксировать, а значит, либо предотвратить развитие рака, либо остановить процесс, который уже начался». Для этого необходимо использовать новые мишени: сигнал от раковой клетки к клеткам костного мозга, а также фибронектин.

Способы использования этих и других мишеней для предупреждения или прекращения метастазов раковой клетки:

- моноклональными антителами блокировать сигнал VEGF-1 от раковых клеток первичного очага рака, тогда стволовые гемопоэтические клетки «не покинут костный мозг и не будут строить ниши для образования метастазов»;

- моноклональными антителами блокировать рецептор VEGFR-1, что предотвратит миграцию гемопоэтических клеток костного мозга для формирования преметастазных ниш и миграцию раковых клеток в их места;

- введение моноклональных антител против VEGFR-2, что предотвратит миграцию эндотелиальных клеток стромы костного мозга в места формирования преметастазных ниш, а значит, не будет ангиогенеза в них, и остановится формирование ниш.

- предотвратить секрецию в нише гемопоэтическими клетками костного мозга вязкого фибронектина, что будет мешать раковой клетке «встраиваться» в ткань органа-мишени.

«Так в корне может измениться лечение рака – пока оно направлено на уничтожение раковых клеток в организме. Но теперь расширяются возможности определять степень риска образования метастазов у каждого пациента и проводить профилактическое лечение», – говорит проф. Д. Лайден.

Исследования были выполнены только на мышах, но учёные считают, что подобные молекулярные причины существуют у людей. Они планируют начать клинические испытания на людях в течение следующего года.

Открытие проф. Д. Лайдена и его группы, а также других учёных существенно дополняют молекулярные причины процесса метастазирования раковых клеток.

Это открыло белки-сигналы и белки-рецепторы метастазирования раковых клеток, и возможность предсказания «угрозы образования» метастазов, их ранней диагностики и избирательного уничтожения.

Однако, что заставляет раковые клетки мигрировать в окружающие ткани и метастазировать, – ответов нет. Теперь, когда мы знаем, что раковая клетка, – это стволовая клетка, можно дать и ответ: причиной инвазии и метастазирования является хоуминг раковой стволовой клетки – миграция её в «нужное место», в свою стволовую нишу.

Стволовые клетки имеют естественную способность создавать себе «дом», т.е. нишу, чтобы находиться в благоприятной среде и самообновляться.

«Нам всем нужен дом, и стволовые клетки с их сильным инстинктом к выживанию являются активными строителями жилья», – сказала проф. Руохола-Бейкер (2006) из США.

## **Глава 7. Методы для ранней диагностики раковых клеток**

### **7.1. ПЦР-ММК – метод ранней диагностики раковых клеток**

Из первой раковой клетки за счёт её деления вначале в ткани образуется узелок в 1-2 мм в диаметре. Но уже с этого размера раковые клетки индуцируют внутри узелка ангиогенез и лимфангиогенез. С началом оттока крови и лимфы из узелка раковые клетки отделяются от него и с кровью и лимфой разносятся по организму пациента – рак становится болезнью всего организма пациента.

Из этого следует, что диагностика рака, любого размера, видимого глазом и с помощью приборов – это поздняя диагностика. Пока в практике врача-онколога диагностика рака тогда, когда рак проявляет себя симптомами.

Учёные разных стран и нашей страны разными методами стремятся перейти к диагностике рака задолго до его симптомов. Именно на таком этапе болезни, можно надеяться на излечение от рака.

Нормальная клетка превращается в раковую после воздействия на неё какого-либо канцерогена. Это вызывает в ней изменения экспрессии генов, создающих её свойства. Вторая причина – изменения экспрессии генов-супрессоров в этой клетке метилированием их промотора, а также мутации. Эти изменения происходят в генах, регулирующих процесс деления клетки, в генах, ингибирующих деление клетки при нарушениях в её геноме, а также в генах, вызывающих апоптоз в таких клетках.

Каждый дефект в геноме раковой клетки является маркером такой клетки. Термин маркер (от англ. mark – метка). Диагностика первой раковой клетки и её близких потомков по генам-маркерам – это ранняя диагностика рака у пациента.

Но как найти в организме пациента раковую клетку и её потомки от первых делений среди  $5 \times 10^{13-14}$  клеток организма взрослого человека.

Как и любая клетка, раковая клетка микроскопического размера, возникнув в ткани, ничем не беспокоит пациента. За счёт свойства к инвазии её по-

томки распространяются в окружающие здоровые ткани и по всему организму, где, оседая, дают новые очаги рака – метастазы.

Задача диагностики разрозненных раковых клеток в тканях различных органов сопоставима даже не с поиском иголки в стоге сена, а с поиском конкретного пучка сена в этом стоге. Поэтому не нужно быть слишком большим пессимистом, чтобы предположить всю «тупиковость» такой ситуации в практике врача-онколога.

Но все изменил метод ПЦР, т.е. полимеразная цепная реакция, а в сочетании с ММК – методом молекулярных колоний, разработанным нашими учёными – чл.-корр. А.Б. Четвериным и Е.В. Четвериной (2002), стал для ранней диагностики весьма точным.

При любой локализации рака в кровь пациента попадают: а) сами раковые клетки – из стенок мозаичных капилляров узелка из раковых клеток в 1-2 мм в диаметре и б) гены-маркеры из погибших раковых клеток еще задолго до проявления как первичного очага рака, так и его метастазов. Это и позволяет выявлять рак у пациента с самого начала, т.е. с размера узелка в 1-2 мм в диаметре.

Ещё в 60-70-х гг. XX в. Ф. Анкер (Ph. Anker) из Швейцарии сделал первые попытки доказать возможность обнаружения дефектных генов из раковых клеток в крови от пациента.

Наш учёный, проф. А.С. Белохвостов еще в 1960 г. XX в. обнаружил дефектные гены из раковых клеток яичника и желудка в асцитной жидкости. Он же с коллегами в 1978 г. XX в. доказал выход дефектных генов из раковых клеток в кровотоки из опухолей в эксперименте на животных.

Теперь дефектные гены из раковых клеток обнаруживают с помощью ПЦР, а также ПЦР-ММК не только в крови, но и в других выделениях от пациента – слюна, слёзная жидкость, слизь, мокрота, моча и др., в зависимости от типа раковой клетки.

Раковые клетки разрушаются в тканях за счёт апоптоза как клетки с дефектами в геноме, а также при уничтожении Т-клетками. ДНК из них попадает

в межклеточную жидкость, а из неё в кровь. В кровь попадают раковые клетки из первичного очага рака и метастазов. В крови они разрушаются, в том числе Т-клетками.

Молекулы ДНК и иРНК не могут быть вне клетки, в частности, раковой клетки, а раковая клетка не может быть без ДНК и иРНК. Поэтому выявление этих молекул является эквивалентом обнаружения их носителя – раковой клетки.

Точно также по молекулам ДНК, РНК диагностируют бактерии и вирусы – возбудителей различных инфекций у пациентов.

Выявление генов-маркеров раковых клеток в их ДНК является идеальным методом для ранней диагностики раковых клеток, контроля лечения и излечения, а также предсказания и диагностики рецидива и метастаза рака у пациентов.

#### ПЦР-диагностика раковых клеток по плазме крови

Процесс, благодаря которому можно получать копии генов из ДНК в неограниченном количестве, называют полимеразной цепной реакцией – ПЦР.

ПЦР открыл в 1983 г. американский ученый К. Мюллис (Kary B. Mullis), за что он был удостоен Нобелевской премии.

Мишенями ПЦР являются – фрагмент ДНК с находящимся в нём геном и иРНК – копия гена.

Цель ПЦР – размножить фрагмент ДНК из образца плазмы крови пациента, т.е. получить его копии, а также размножить иРНК до уровня, детектируемого стандартными методами. Чтобы размножить иРНК, её сначала нужно с помощью обратной транскриптазы перевести в комплементарную ей ДНК, т.е. кДНК.

Таким методом можно обнаружить экспрессию гена или генов по уровню их мРНК, а также мутации в гене, что явилось причиной превращения нормальной клетки в раковую.

#### Принцип ПЦР

Для ПЦР-метода из клинического образца – плазмы крови выделяют смесь всех содержащихся там ДНК и РНК. Далее, чтобы понять принцип копирования этих молекул, нам не обойтись без некоторых знаний об их природе.

Молекула ДНК состоит из двух цепей, построенных из нуклеотидов, основной частью которых являются азотистые основания: аденин – А, цитозин – Ц, гуанин – Г и тимин – Т. Азотистые основания несут в себе генетическую информацию о структуре белков, а через них – строение клетки и её функции, а также её воспроизведение, т.е. деление на две дочерние клетки.

В английском языке есть слово –«complement» – дополнять, дополнение. От него в молекулярной биологии появился термин – комплементарность. Смысл его в том, что молекулы узнают друг друга участками, которые дополняют друг друга как «ключ и замок».

По этому принципу цепи нуклеотидов составляют комплементарную пару: А одной цепи всегда против Т другой цепи, а Г против Ц. Когда А и Т в двух цепях ДНК расположены друг против друга, между ними образуются две водородные связи. То же происходит с Г и Ц, но между ними возникает три водородные связи.

Из комплементарности пар оснований следует, что последовательность или порядок размещения азотистых оснований на одной цепи ДНК, определяет порядок азотистых оснований в её другой цепи. Концы цепей ДНК химически различны: у каждой цепи есть 3'-конец и 5'-конец (Рис. 1, 2, 3).

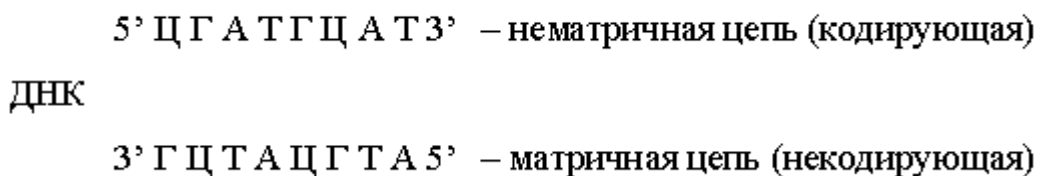


Рис 1. Фрагмент молекулы ДНК.

Цепь ДНК, которая служит матрицей для синтеза матричной РНК называется матричной цепью.

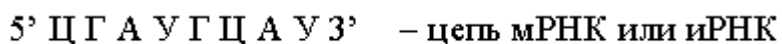


Рис. 2. Цепь мРНК – это копия матричной цепи ДНК, последовательность азотистых оснований в ней та же, что и в нематричной цепи ДНК, но с заменой Т на У.

Цепь мРНК с помощью ПЦР размножают, но сначала её с помощью обратной транскриптазы переводят в комплементарную ей матричную цепь ДНК – кДНК.

5' Ц Г А У Г Ц А У 3' – цепь мРНК или иРНК  
3' Г Ц Т А Ц Г Т А 5' – кДНК или матричная цепь

Рис. 3. кДНК синтезирована на матрице мРНК – копии гена.

Образование водородных связей между парами оснований: А-Т и Г-Ц – это спонтанный процесс, т.е. без участия фермента. Эти связи слабые и легко рвутся при нагревании – цепи ДНК отделяются друг от друга, а при охлаждении раствора – вновь спариваются в прежнее комплементарное состояние. Спонтанный процесс образования пар оснований А-Т и Г-Ц называют гибридизацией.

В основе ПЦР-анализа и лежит гибридизация пар оснований, как спонтанный процесс.

Выделенные из образца плазмы крови ДНК и иРНК являются мишенями для ПЦР. Их смешивают с реакционным буфером и другими компонентами ПЦР в специальную пробирку и помещают в прибор – ДНК-амплификатор, дающий циклические изменения температуры реакции.

Цикл ПЦР для размножения молекул-мишеней – ДНК и иРНК состоит из трёх стадий:

1) расплавление двухцепочечной ДНК путем повышения температуры реакционной среды до 90° С;

2) зная порядок оснований на концах фрагмента ДНК, взятого для размножения, т.е. амплификации, синтезируют химическим путём олигонуклеотиды, комплементарные этим участкам – это праймеры;



3) присоединение праймеров к матрицам, т.е. к одנותяжевым цепям ДНК, полученными в результате первой стадии. Температура реакционной среды – 50-60°C.

На этой стадии происходит удлинение, т.е. элонгация гибридизованных праймеров ДНК-полимеразой при температуре для работы фермента 70-75°C, что превращает каждую из цепей в двухцепочечную молекулу ДНК (Рис. 4).

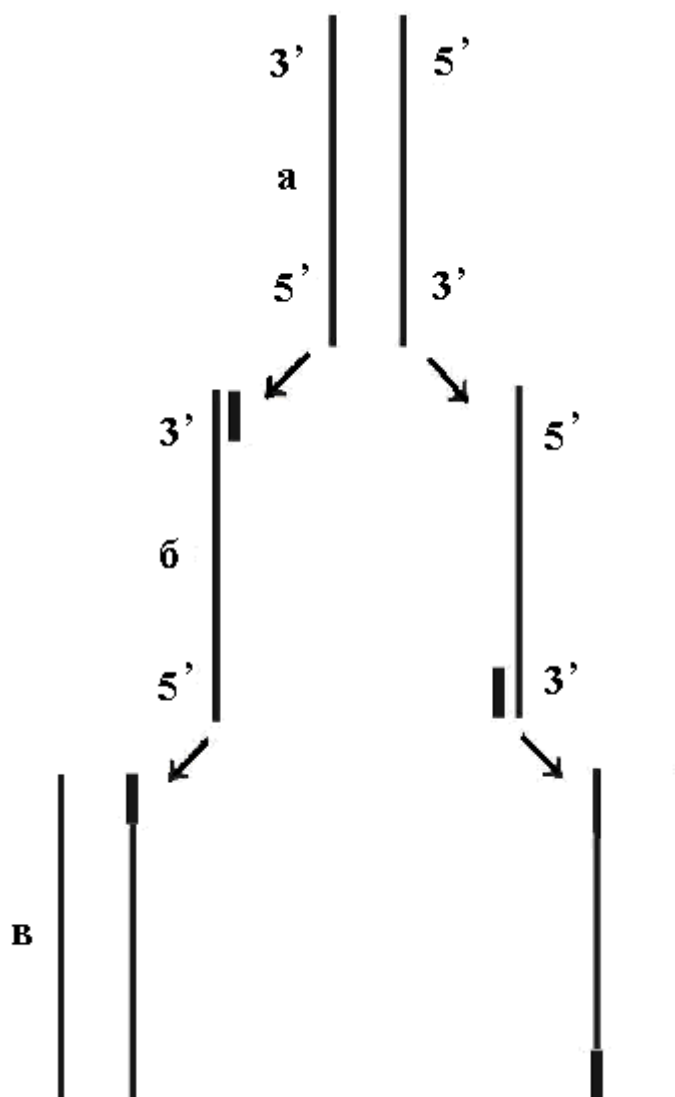


Рис. 4. Схема ПЦР [рис. и цит. по: А.С. Белохвостов (1995) с изменениями]. На схеме цикл удвоения молекулы ДНК из исследуемого образца:

- а – цепи исходной молекулы ДНК изображены двумя прямыми линиями;
- б – после разделения цепей ДНК, к их концам присоединены по одному комплементарному праймеру в виде прямоугольника;
- в – идёт синтез новых цепочек ДНК.

Примечание. Стрелками показано направление синтеза новых цепей в ПЦР.

По окончании одного первого цикла из одной молекулы двухцепочечной ДНК получены две, в следующем цикле каждая из двух молекул снова удваивается и так далее, с нарастанием числа молекул ( $N$ ) по формуле:  $N = 2^n$ , где  $n$  – число циклов. Отсюда и название реакции – цепная.

Теоретически ПЦР позволяет размножить до легко детектируемых количеств даже единственную молекулу-мишень ДНК, даже если она находится среди множества других молекул ДНК и РНК. Стандартная ПЦР постоянно совершенствуется.

Продукты ПЦР – молекулы ДНК, а значит гены и иРНК подвергаются анализу рядом методов, например электрофорезом в геле с окраской молекулы ДНК бромидом этидия и др. Определяются ген(-ы) и мутации в них: замена – пара оснований меняется на другую; вставка – в молекулу введена новая пара оснований; делеция – отсутствие пары комплементарных оснований в гене. По количеству копий иРНК гена судят о степени его экспрессии в клетке.

Различают два варианта ПЦР-диагностики: 1) качественный тест и 2) количественный тест.

Для качественного теста требуется лишь дать ответ: «да» или «нет», т.е. содержится ли в образце ДНК или иРНК. Для диагностики вирусной инфекции обычно достаточен факт обнаружения в образце вирусной ДНК или иРНК.

Для обнаружения раковой клетки в образце недостаточно, например, обнаружить иРНК, так как она может быть продуктом и нормальной, и раковой клетки.

Количественный тест определяет титр, т.е. число копий молекул-мишеней в определенном количестве образца, здесь крайне важны мишени – ДНК и иРНК.

Ведь для ранней диагностики рака крайне важно обнаружить его на самом раннем этапе – на уровне первой раковой клетки и её первых потомков, а еще лучше на уровне предраковой клетки по генетическим маркерам в молеку-

лах-мишенях – ДНК и иРНК. На уровне одной из этих клеток титр мишени будет минимальным.

Титр мишеней – ДНК и иРНК и их генетические маркеры необходимы:

- 1) для исследования молекулярных причин превращения нормальной клетки в раковую клетку в конкретном случае;
- 2) для слежения за течением скрытого ещё рака на уровне первой раковой клетки и её первых потомков, но также и для рака с симптомами;
- 3) для оценки эффективности лечения рака, коррекции лечения рака в процессе его лечения по состоянию генетических маркеров раковых клеток.

Чувствительность стандартной ПЦР разные авторы оценивают по-разному; причиной этого может быть и степень чувствительности её в специфическом обнаружении молекул-мишеней, но и характер клинического образца – плазма крови, ткань опухоли, слюна, моча и другие различные выделения.

ПЦР-ММК-метод для ранней диагностики раковой клетки или клеток по плазме крови

Стандартная ПЦР может давать сбои и ошибки, в результате чего: 1) молекулы-мишени не будут выявлены из-за потери их в процессе подготовки образца;

2) молекулы-мишени могут быть не размножены в процессе ПЦР, тем более что в обычной клинической практике молекулы-мишени представляют незначительную долю среди ненужных матриц в образце.

Чл.-корр. А.Б. Четверин и Е.В. Четверина – сотрудники Института белка РАН – открыли метод молекулярных колоний – ММК, для прямого определения титра молекулы-мишени и пространственное разделение размножения нужных молекул-мишеней от ненужных. Этот метод запатентован учёными в РФ и в США (1995, 1998).

Принцип метода в том, что молекулы-мишени – ДНК и иРНК – размножаются не в жидкости, а в геле. Это создает отдельные колонии, каждая из которых является потомством единственной молекулы, т.е. клон.

ММК может сочетаться с ПЦР для размножения молекул-мишеней. Сначала гель полимеризуют, затем вымачивают в воде, чтобы удалить все растворимые вещества, затем автоклавируют и сушат.

Перед началом ПЦР гель пропитывают реакционной смесью. Этим авторы достигают полного сохранения активности ДНК-полимеразы и уничтожения молекул ДНК из окружающей среды, которые могли бы попасть в гель при его приготовлении. Синтез кДНК на молекуле иРНК может быть осуществлён отдельно или в геле. Для детекции мишеней используется универсальная реакционная смесь с ДНК-полимеразой (Рис. 5).

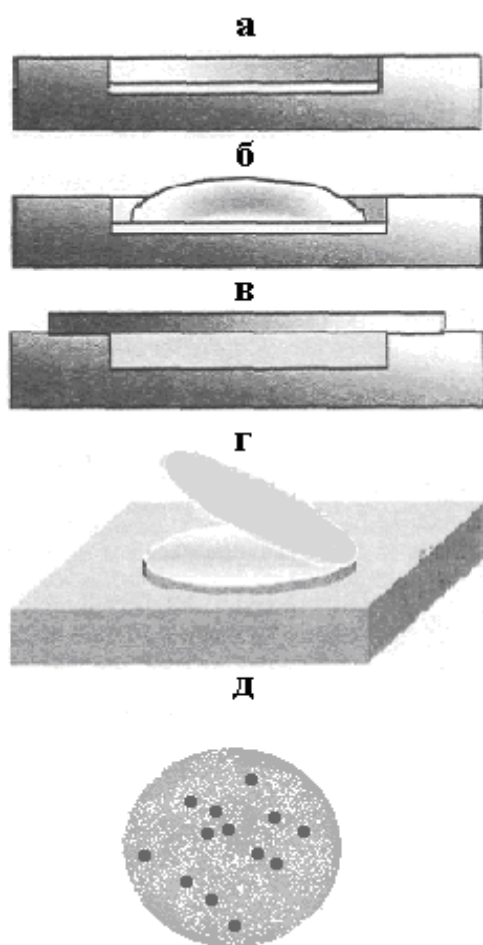


Рис. 5. Схема проведения ПЦР-ММК (рис. и цит. по: А.Б. Четверин, Е.В. Четверина, 2002).

1. а – лунка с высушенным полиакриламидным гелем;
2. б – пропитывание геля реакционным раствором, содержащим, в том числе, исследуемый образец и специфические праймеры;

3. в – инкубация геля в течение 30 мин при 55-65° С – условия обратной транскрипции, с последующими 40 циклами ПЦР;

4. г – промакивание геля нейлоновой мембраной – перенос колоний;

5. д – гибридизация мембраны с радиоактивно меченым зондом, специфичным к искомой мишени; получение радиоавтографа мембраны.

Как пишут авторы метода, «ММК позволяет преодолеть все проблемы стандартной ПЦР и впервые сделать ПЦР-диагностику действительно чувствительной, количественной и надёжной» (2003).

#### Основные отличия ПЦР-ММК от стандартной ПЦР

1) Реакционную смесь для размножения мишеней – ДНК и РНК, вносят не в жидкость в специальной пробирке, а в лунку с пленкой высушенного полиакриламидного геля. В результате чего «потомство каждой молекулы образует колонию, а не распространяется по реакционному объёму».

2) Каждая колония является клоном молекул, а число колоний прямо указывает «на число молекул ДНК или РНК, присутствующих в геле до начала реакции».

3) ПЦР-ММК фактически дешевле стандартной ПЦР: а) «многократно» сокращает число проб для проведения анализа; б) расход реактивов «почти такой же»: объём геля – 65 мкл, в стандартной ПЦР объём реакционной смеси 50 мкл.

Для выполнения ПЦР-метода, а тем более ПЦР-ММК пригодны любая ткань, биологическая жидкость и выделения человека. По генным маркерам эти методы позволяют выявлять минимальное число раковых клеток при раке крови и лимфатической системы, так и при солидном раке. Это крайне важно для ранней диагностики раковых клеток первичного очага рака или метастазов, а также для выявления остатков раковых клеток после лечения рецидива рака.

Плазма крови от пациента является универсальным источником генных маркеров из раковых клеток любого типа клетки, т.е. любой локализации рака у пациента.

Повышение содержания генов-маркеров из раковых клеток в плазме крови при раке установлено многими исследователями.

Проф. Д. Сидрански (1994) считает, что ПЦР позволила совершить «генетическую революцию в ранней диагностике рака», подчёркивая следующее:

- рак начинается из одной клетки, утратившей зависимость деления от защитных механизмов организма;

- в такой клетке возникают изменения генов, что вызывает бесконтрольное её деление с образованием из неё клона клеток – рак;

- особенность лечения человека от рака в том, что эффект лечения возможен лишь до образования его метастазов;

- рак опасен из-за того, что отдельные его клетки отрываются от клона и, продолжая делиться, проникают в окружающие здоровые ткани, а другие образуют метастазы в отдалённых органах. Это причина гибели людей от рака;

- ПЦР позволяет в биологических жидкостях от больного выявлять самые начальные изменения в структуре ДНК клеток, а в сущности предрак;

- с помощью ПЦР удаётся в жидкостях обнаружить даже одну дефектную или мутантную молекулу ДНК из раковых клеток среди многих других молекул в исследуемой жидкости; чувствительность этого метода до 100%.

- ПЦР – это универсальный метод для ранней диагностики раковых клеток любой локализации рака у пациента. Им можно выявить тех лиц, которых необходимо обследовать детально.

Проф. А.С. Белохвостов (2000) впервые в двух работах изложил основы ранней диагностики раковых клеток с помощью ПЦР-метода; мы излагаем их кратко:

- 1) бессимптомный рост рака от одной клетки до очага в 2 мм в ткани продолжается долгие годы или даже десятилетия;

- 2) такой очаг из раковых клеток до 2 мм в диаметре дремлет в тканях до тех пор, пока не произойдут изменения в генах его клеток, вызывающих ангиогенез и лимфангиогенез. С этого момента начинается рост и распространение

его клеток через кровь и лимфу по организму пациента – рак становится болезнью всего организма.

3) ещё недавно диагностировать рак размером 2 мм, особенно если он находился во внутренних органах, было почти не возможным. И только метод ПЦР позволил определять очень малое число дефектных генов, иногда даже одну молекулу дефектного гена из раковой клетки.

Раковые клетки содержат эпимутации основных свойств и мутации или эпимутации генов-супрессоров. Такие изменения являются генетической меткой, т.е. маркером раковой клетки.

Ген-супрессор белка p53. В норме он сдерживает деление «генетически дефектных клеток и заставляет их запускать апоптоз».

Мутации в этом гене обнаруживаются в половине случаев раковой клетки разного типа; эти поломки в гене «позволяют генетически дефектной клетке избежать апоптоза».

Ген-супрессор белка p16. Он в норме подавляет деление дефектной клетки «в другой точке клеточного цикла», но инактивирован из-за метилирования его промотора почти у половины раковых клеток разного типа.

Ген k-ras – мутантная форма одного из ключевых нормальных генов стимуляторов деления клетки. Есть ещё ряд генов с высокой частотой дефектов в раковой клетке. Для ранней диагностики раковой клетки важна регистрация эпимутаций и мутаций в нескольких генах.

ДНК из раковых клеток попадает «в межклеточную жидкость и далее в кровотоки» после разрушения раковых клеток в тканях.

В плазме крови у таких пациентов будут, пишет автор, находиться фрагменты ДНК из раковых клеток. Обнаружить их долго не удавалось, пока не появился ПЦР-метод.

По расчётам проф. А.С. Белохвостова и первый его опыт применения этого метода показал возможность диагностировать в любой ткани рак размером с 2-х мм в диаметре.

Автор подчёркивает, что диагностика раковых клеток в организме пациента по их генам-маркерам в плазме крови ПЦР-методом, позволяет осуществлять слежение за эффектом лечения рака. Он рекомендует сроки взятия для этого плазмы крови: до операции, после операции иссечения рака и путей лимфооттока, а также спустя не ранее, чем через 2 недели после лечения, и после химиотерапии.

Если, маркер, например ген белка p53, выявлен в клетках и в плазме до операции и/или после окончания химиотерапии, это означает, что раковых клеток «или совсем не осталось в организме или их незначительная часть находится в покоем состоянии». В любом случае, рецидив или метастазы в ближайшие месяцы маловероятны.

«Если же мутантный ген или измененный в экспрессии ген продолжает выявляться в ДНК плазмы крови или его количество нарастает, это указывает на рецидив рака или метастазы. Это требует изменения схемы лечения – добавления или замены химиопрепаратов, средств биотерапии и т.д.». Такие анализы учёный рекомендует выполнить несколько дней, а «значение ответа – ценою в жизнь».

Мы видим, что учёные сконцентрировали свое внимание на поиске в плазме и других биологических жидкостях генов-маркеров из ядер раковых клеток, а это нелегкая задача (В.П. Шелепов и соавт., 1997).

Оказалось, что мутации могут быть и в митохондриях – органеллах, расположенных в цитоплазме клетки и обнаружить их в раковых клетках достаточно просто. Это открытие сделано проф. Д. Сидрански (2000).

Гены, превращающие нормальную клетку в раковую клетку, часто находятся в ядре клетки в виде одной или многих копий. Но, оказалось, что дефекты и изменения могут возникать не только в них, но и в генах митохондрий раковой клетки.

В каждой клетке, в том числе и раковой, имеется несколько сот митохондрий. Митохондрии – это самореплицирующиеся органеллы.



В каждой из них есть своя ДНК, в ней несколько генов, обеспечивающих синтез белков митохондрий. Количество копий такой ДНК может быть от одной до десяти на митохондрию.

Гены ДНК митохондрий в раковых клетках подвергаются «усиленному воздействию токсических продуктов кислорода». Это вызывает «накопление большого числа изменений в генах митохондрий, чем в генах ядра раковой клетки».

В результате мутации ряда генов митохондрий выявляются в более чем половине случаев раковой клетки разного типа.

Другой важной особенностью в раковой клетке является «вытеснение митохондрий с нормальными генами путём преимущественного размножения митохондрий с мутантной ДНК». Это приводит к тому, что «все митохондрии в раковой клетке становятся потомками митохондрий с мутантными генами её ДНК».

Отсюда: если «в гене, находящемся в ДНК ядра клетки может быть лишь одна или две копии мутантного гена, то в митохондриях одной раковой клетки может находиться от нескольких сотен до десяти тысяч копий мутантного гена митохондриальной ДНК».

Из этого, проф. А.С. Белохвостов (2000) делает вывод: «если раковые клетки обнаруживать по мутантным генам митохондрий в плазме крови и в других биологических средах пациента, чувствительность ПЦР-теста можно увеличивать ещё в сотни раз по сравнению с применяемым сейчас методом выявления маркеров измененных генов из ДНК ядра раковой клетки».

Сейчас, пишет проф. А.С. Белохвостов, возможным пределом размера обнаруживаемого рака считается очаг в 2-3 мм в диаметре, то при применении ПЦР для поиска в плазме крови мутантных генов митохондриальной ДНК, из раковых клеток, по-видимому, можно будет определять очаг рака в ткани в 1 мм в диаметре.

В случае успеха такого подхода к оценке генов-маркеров раковых клеток ядерного геноза будут добавлены гены-маркеры из ДНК митохондрий раковых клеток.

О повышении выявляемости раковых клеток автор даёт пояснения. Он говорит, что «мутации какого-либо гена раковой клетки, взятого в качестве маркера, встречаются только у части пациентов».

Изменения в экспрессии генов свойств нормальной клетки – главная причина канцерогенеза.

Метилирование CpG-островков в промоторе гена выключает ген, а деметилирование – включает ген. При этом изменений структуры в последовательности оснований гена не происходит. Это обозначают термином – эпимутация, о чём мы уже писали в разделе канцерогенеза.

Метилирование или деметилирование промотора генов – это маркеры раковой клетки. Для анализа статуса метилирования генов раковой клетки часто используют МС-ПЦР – метилспецифическая полимеразная цепная реакция. Материалом для этого является ДНК раковых клеток в образцах плазмы крови и других биологических жидкостей, фрагменты из опухоли от пациента.

Диагностика раковых клеток по их эпигенетическим изменениям в сравнении с нормальной клеткой – это новое направление в ранней диагностике раковых клеток. Оно открывает новые пути для создания новых лекарственных средств и методов лечения от рака.

В целях изучения канцерогенеза и других проблем учёные используя методы – ПЦР-ММК, МС-ПЦР, микрочипы и др. занялись изучением профилей экспрессии «изолированных клеток и клеточных культур».

1. Фенотип стволовой клетки. Цель – знать типичный профиль экспрессии генов в эмбриональных и региональных стволовых клетках. Оказалось, что в этих клетках набор экспрессируемых генов «ограничен». Это важно для понимания явления «стволовости».

2. Сравнение экспрессии генов в эмбриональных стволовых и раковых клетках. Обнаружено, что многие раковые клетки экспрессируют белки-

маркеры эмбриональных стволовых клеток. Например, Oct-4, Nanog и hTERT, что указывает на сходство биологии эмбриональных стволовых «и, по крайней мере, части раковых клеток».

3. Сравнение профилей экспрессии региональных стволовых и раковых клеток. Профиль экспрессии некоторых типов раковой клетки сходен с профилем экспрессии региональных стволовых клеток той ткани, из которой возникает раковая клетка, это указывает на то, что «именно региональные стволовые клетки в этих тканях способны претерпевать злокачественное перерождение» (К.Н. Ярыгин, Е.Е. Егоров, И.Б. Чеглаков и соавт., 2006).

## **7.2. Биочип или микроматрица – устройство для ранней диагностики раковых клеток, слежения за лечением рака и контроля излечения**

Биочип – это организованное размещение молекул ДНК или белка на специальном носителе – «платформе».

Платформа представляет из себя пластинку площадью всего 1 см<sup>2</sup> или чуть больше. Она сделана из стекла или пластика, либо из кремния. На ней в строго определённом порядке может быть размещено множество молекул ДНК или белка. Отсюда и присутствие в термине слова – «микро».

На биочипе можно проводить анализ молекул различных веществ. Для этого на нём закрепляют «узнающие» молекулы. Каждую из таких молекул обозначают термином – «молекула-зонд», а каждую из исследуемых молекул – «молекула-проба».

Молекула-зонд на биочипе определяется самим исследователем, т.е. он планирует, какую молекулу нужно искать среди молекул в исследуемом материале – в жидкости и т.д. Если на микрочипе исследуется ДНК – это ДНК-чип, если молекула белка – белковый чип.

### Как фиксируются молекулы-зонды на биочипе?

Во многих странах молекулы-зонды прикрепляют прямо к стеклянной пластинке, т.е. к подложке при помощи лазеров. В нашей стране молекулы-

зонды размещаются в ячейки из геля, диаметром менее 100 микрон каждая, ячейки фиксированы к пластинке в процессе изготовления микрочипа. Количество ячеек на чипе достигает уже несколько тысяч.

В ячейках молекулы-зонды химически привязаны и находятся в функционально активном состоянии.

Так как ячейки заполнены гелем трехмерной структуры, то они удерживают большее количество молекул-зондов, нежели чипы, в которых молекулы-зонды просто прикреплены к пластинке. Важно и то, что химическая реакция между молекулой-зондом и вносимой в ячейку из геля молекулы-пробы, протекает как и в жидкостях, а значит, как и в живом организме.

Изучение генома и протеома каждого типа клетки в норме и при любой болезни позволит выяснить – какой ген или гены вызывают ту или иную болезнь.

На ДНК-чипе выясняется причина возникновения болезни: дефекты в структуре гена или генов, или изменения активности гена при нормальной его структуре.

На белковом чипе определяются последствия «поломок» в гене по изменениям его продукта – белков в клетке. Изменения в гене клетки или белке – это их метка или маркер (от англ. mark – знак, метка).

Отсюда: ген с меткой – это ген-маркер, а белок с меткой – это белок-маркер. Эти маркеры позволяют обнаруживать у пациента дефектную или больную клетку, характерную для конкретной болезни, в том числе и раковую стволовую клетку. При диагностике болезни ген-маркер и белок-маркер для контроля сравнивают с нормальным геном клетки и его продуктом – белками.

Ясно, что на ДНК-чипе молекулой-зондом является ген-маркер, а для контроля в отдельной ячейке – нормальный ген, в белковом микрочипе в качестве молекулы-зонда может быть или антитело, или антиген.

#### Способы изготовления биочипов

1. Молекулы ДНК или белка предварительно синтезируют, а затем размещают на матрице. Недостаток этого метода: невысокая плотность молекул-зонда на матрице – до 1000 молекул и трудоёмкий процесс их синтеза.

Копии гена-маркера можно получить ПЦР-ММК методом, такого метода для копий белка-маркера нет. Его копии можно создавать встраиванием иРНК гена белка-маркера в бактерию: *E. coli* или в клетки дрожжей.

2. Для ДНК-чипов синтез олигонуклеотидов производят непосредственно на матрице. Такие чипы обладают гораздо большей плотностью молекул-зондов.

3. Нанесение олигонуклеотидов в строго определённое место матрицы струйным принтером.

В нашей стране биочипы – ДНК-чип и белковый чип готовят по первому способу.

Биочип – новейшее устройство для медицины XXI века. По молекулам-маркерам он позволяет:

- 1) диагностировать любую болезнь: до её начала или в самом её начале;
- 2) находить в организме тот или иной вирус, бактерии и раковые клетки;
- 3) белковым чипом можно находить лекарства среди низкомолекулярных соединений в целом ряде анализируемых материалов;
- 4) решение этих задач на биочипах можно сделать за считанные часы, а не дни и т.д.

#### Принцип действия биочипов и этапы анализа

##### 1. ДНК-чип.

Мы знаем, что молекула ДНК состоит из двух комплементарных цепей. Основа каждой цепи – это последовательность из четырёх азотистых оснований: аденин (А), гуанин (Г), тимин (Т) и цитозин (Ц).

При этом последовательность оснований одной цепи определяет последовательность оснований в другой: А-Т и Г-Ц. Когда между этими комплементарными основаниями спонтанно образуются водородные связи, две цепи соединяются, т.е. гибридизуются в двойную спираль и удерживают цепи

вместе. Именно на способности комплементарных оснований связываться друг с другом: А с Т, а Г с Ц основан принцип действия ДНК-чипа.

#### Этапы анализа с помощью ДНК-чипа

1. В ячейках чипа фиксированы копии известного гена-маркера в виде одной цепи этого гена, т.е. его «половинки» – кДНК.

2. Из плазмы крови от пациента выделяется копия гена-маркера, т.е. иРНК.

3. На молекуле иРНК с помощью фермента обратной транскриптазы синтезируют другую цепь гена-маркера, т.е. вторую его «половинку» – кДНК. ПЦР-ММК размножают эту кДНК – это молекулы-пробы, и их метят флуоресцентным красителем.

4. Роботом помещают молекулы-пробы в определённые ячейки на чипе с копией генов-маркеров раковой стволовой клетки.

Если кДНК генов из образца плазмы комплементарна с кДНК в соответствующих ячейках, то между ними произойдёт гибридизация, и такие ячейки начнут светиться. Чип сканируют лазером, следя за интенсивностью сигнала флуоресценции в каждой ячейке. То есть гены-маркеры в плазме есть, а значит, в организме пациента есть раковые стволовые клетки.

Если нет гибридизации между этими молекулами, значит, нет гена-маркера раковой стволовой клетки в этом образце плазмы.

Когда имеется ген с мутацией, тогда будет гибридизация его кДНК на чипе с кДНК молекулы-зонда, имеющей эту мутацию. Если это ген-супрессор wt 53, то это также может указывать на наличие в организме пациента раковой стволовой клетки или клеток.

Раковая клетка возникает из стволовой клетки ткани из-за включения в ней генов фетальных белков. Поэтому в молекулах-пробах плазмы пациента будут кДНК этих генов и отсутствие их в контроле.

Чем меньше в образце плазмы от пациента титр эпимутантных и мутантных генов-маркеров, тем меньше раковых клеток в его организме.

Выявление раковых клеток в образце плазмы крови или других биологических жидкостей от пациента – моча, слюна, слёзная жидкость и др. по генам-маркерам, даёт возможность поставить диагноз рака, а по генам-маркерам свойства инвазии раковой клетки – микрометастазы рака. И это задолго до обнаружения их стандартными методами – УЗИ, рентгенография, компьютерная томография и др.

Биочипом по генам-маркерам можно выявлять угрозу болезни. Так, если обнаружены гены-маркеры, но ещё нет их продуктов – белков в клетке, то это выявление предболезни. По отношению к раку – это предраковые клетки. Так как в этом случае биочип позволяет выявить только вероятность болезни, то такой чип пока не подвергается сертификации.

Плазма крови пациента – это главный резервуар, куда проникают гены-маркеры из погибающих дефектных или больных клеток при конкретной болезни из различных органов, в том числе из раковых клеток. Такие клетки в организме могут погибать за счет некроза и апоптоза, а их гены через межклеточную жидкость затем проникают в кровь.

Низкий титр генов-маркеров в плазме крови пациента по анализу на ДНК-чипе и отсутствии их продукта – белков, может означать предболезнь, а при наличии их – болезнь. В таком же смысле это касается и рака. Это могло бы означать раннюю диагностику рака – II её уровень.

## 2. Белковый чип.

Строение чипа для анализа белков то же, что и у ДНК-чипов. Лишь те чипы, на которых проходит ферментативная реакция, имеют более редкое расположение ячеек, а те, на которых идёт ДНК-реакция, – более частое.

Белки-маркеры – это продукт «поломок» гена или генов, они превращают нормальную клетку в дефектную или больную клетку при конкретной болезни. Эти белки появляются на поверхности клеток и являются белками-антигенами и для каждой болезни они свои.

На раковой стволовой клетке появляются фетальные белки и белки-рецепторы, которых нет на нормальной стволовой клетке. Являются ли они белками-антигенами – вопрос не решён.

В белковом чипе в качестве молекулы-зонда, т.е. белка-маркера дефектной или больной клетки может быть белок-антиген, тогда в сыворотке от пациента определяют антитела к нему. Если молекулой-зондом берется антитело, то в сыворотке крови от пациента ищут белок-антиген.

В связи с расшифровкой генома человека требуется анализ функций огромного количества белков в клетках разного типа, в том числе ранее неизвестных. Тысячи белков могут быть фиксированы в разных ячейках микрочипа и одновременно анализированы на способность: связывать известный лиганд, катализировать ту или иную ферментативную реакцию, взаимодействовать с антителами, низкомолекулярными соединениями и др.

В раковой клетке важно изучать кроме белков-маркеров, белков-рецепторов и антител к ним, белки свойства инвазии, фактор роста эндотелия сосудов-1 и белок-рецептор к нему на поверхности гемопоэтической клетки и др.

#### Принцип действия белкового чипа

Он также основан на комплементарности участвующих молекул, но белковых.

1. Антиген со своим антителом. Антиген – это любое вещество, в состав которого обычно входит какой-то белок, способный вызывать иммунную реакцию.

Антитело – это молекула белка, секретируемая одной из клеток иммунной системы. Форма этой молекулы и распределение электрического заряда по её поверхности делают её способной связывать антиген, комплементарный ей по форме и распределению заряда.

Впервые ещё в 1942 г. нобелевский лауреат Л. Полинг и его коллеги выдвинули верный постулат, что трехмерная структура антигена и его антитела



комплементарны и, таким образом, «несут ответственность» за образование комплекса – антиген–антитело.

2. Субстрат со своим ферментом. На основе гипотезы топохимического соответствия специфичность действия фермента связана с узнаванием той части субстрата, которая не изменяется при катализе. Между этой частью субстрата и субстратным центром фермента возникают точечные контакты и водородные связи.

3. Белок с низкомолекулярным соединением. Для ингибирования белка необходима связь между ними – комплементарной поверхности соединения с активными участками молекулы белка,

4. Фермент с низкомолекулярным соединением. Ферменты и другие белки создают все свойства раковой клетки, поэтому они являются основными мишенями для лекарств. Для блокады фермента низкомолекулярным соединением также необходима между ними комплементарность: поверхность молекулы соединения при этом должна быть копией поверхности участка субстрата, которая не изменяется при катализе.

#### Этапы анализа с помощью белкового чипа

1. В ячейках чипа фиксирован известный белок-антитело к белку, который создает дефектную или больную клетку конкретной болезни. Искомый белок – это белок-маркер.

2. Из сыворотки крови от пациента берётся образец сыворотки для анализа. В образец добавляют флуоресцентный краситель – каждая молекула белка-маркера получает это вещество.

3. С помощью робота капли сыворотки из образца помещают в определённые ячейки чипа. Молекулы-зонды ищут комплементарные им молекулы среди молекул-проб. Если есть такая молекула, то она связывается с молекулой-зондом в ячейке чипа; между ними происходит химическая реакция, и она начинает светиться.

4. Ячейки, в которых появилось яркое свечение, укажут на присутствие искомого белка белка-маркера. Так как этот белок-маркер из дефектной или

больной клетки при конкретной болезни, это укажет на начало у пациента этой болезни. Точно также выявляют присутствие в организме пациента раковой клетки(-ок) по их белкам-маркерам.

Если в ячейках чипа фиксирован белок-антиген, тогда в сыворотке крови пациента ищут антитела к белку-маркеру. Если в сыворотке окажутся антитела к белку-маркеру, это будет указывать на наличие в организме пациента раковых клеток, т.е. пациент болен. А по белкам-маркерам свойства инвазии раковой клетки, например, по наличию белка Mts1 и других, можно регистрировать где-то в организме у пациента микрометастазы раковых клеток.

Мы уже знаем, что белки, которые образуются в раковых клетках, но отсутствуют в нормальных, это белки-маркеры или антигены. Наличие таких белков – признак того, что ген, вызывающий перерождение нормальной клетки в раковую, начал свою разрушительную работу. Выявление раковой клетки(-ок) по белкам-маркерам позволяет поставить диагноз рака или его микрометастазов задолго до выявления его симптомов у пациента. Титр белка-маркера в сыворотке крови пациента определяет количество раковых клеток в его организме. Низкий титр белков-маркеров из раковых клеток в сыворотке крови, а также в других жидкостях пациента – признак малого количества раковых клеток в организме пациента. Это могло бы стать ранней диагностикой рака – II её уровень.

Итак, в XXI веке по мере выявления генов-маркеров и белков-маркеров, вызывающих конкретную болезнь, диагностика её, в том числе и рака, станет ранней, т.е. на двух уровнях: 1) «до начала» – по генам-маркерам и 2) «в самом начале» – по белкам-маркерам.

Гены-маркеры и белки-маркеры в дефектной или больной клетке – это цели или мишени для новых лекарств. На их основе будут создаваться лекарства и другие средства, в том числе – вакцины. За счёт комплементарности к молекулам-мишеням, лекарства будут действовать избирательно, не повреждая нормальные клетки.

Врач, действуя на гены-маркеры болезни, сможет её предотвратить, а воздействиями на белки-маркеры клеток её можно будет излечить в самом «зародыше».

Этими двумя путями врач получит, так сказать, полную власть над любой болезнью на клеточном уровне.

Поиск генов-маркеров и белков-маркеров в различных средах организма пациента быстро и точно можно выполнять на биочипах, а гены-маркеры, кроме этого, можно выявлять с помощью точнейших методов: ПЦР-ММК и МС-ПЦР. Это будет означать революцию в медицине.

Учёные выявят гены-маркеры и белки-маркеры, вызывающие конкретную болезнь, в том числе и возникновение раковой клетки. Тогда станет возможным разработать для ранней диагностики любой болезни минимум наборов: генов-маркеров и белков-маркеров. Они будут дополняться и уточняться по мере получения новых знаний. Это будет генный и белковый «профили» болезни, и которые будут перенесены на биочипы.

Тестирование человека на маркеры определенной болезни с помощью ДНК-чипа и белкового чипа имеет несколько преимуществ.

Отрицательный результат – принесёт человеку радость и может избавить его от обследования стандартными методами: ультразвуковое исследование, рентгенография и др.

Положительный результат – даст человеку возможность, а также время на то, чтобы принять меры для снижения риска возникновения болезни, или при её начале – начать соответствующее лечение.

Особое значение имеет ранняя диагностика рака. Это связано с тем, что, во-первых, причина рака – раковая клетка, а она из клетки своего организма-хозяина и, во-вторых, вплоть до недавнего времени не было известно абсолютных отличий раковой клетки от нормальной клетки.

До сих пор считается, что для каждого типа раковой клетки характерны «свои» гены и белки. Но геном в клетке каждого типа – один и тот же. Если

принять, что из каждого типа клетки раковая клетка – «своя», тогда почему свойства раковой клетки любого типа – одинаковые?

Тип клетки создается репрессией одних генов – из-за метилирования и экспрессией других генов – за счет деметилирования их промотора.

Теперь также доказано, что клетка любого типа становится раковой за счет дерепрессии в ней генов фетальных белков. То есть формирование типа клетки и возникновение раковой клетки из нормальной клетки – это независимые друг от друга процессы. Из этих двух фактов можно допустить, что общие гены-маркеры и их продукт – белки для любого типа раковой стволовой клетки должны быть.

Общими генами и их продуктами – белками могут стать: ген и его фермент – теломераза, ген и белок под кодовым обозначением «5T4», ген oct-4 и белок Oct-4, ген Nanog и белок, ген mts 1 и белок Mts 1, ген остеопонтин и белок и др.

Если это подтвердится, то это станет настоящим прорывом в решении многих, если не всех, проблем рака:

- ранняя и точная диагностика раковой стволовой клетки любого типа на основе общего гена-маркера и его продукта – белка-маркера;
- универсальные лекарства и средства, в том числе вакцина, против раковой стволовой клетки и её метастазов.

### **7.3. ДНК-чип для диагностики раковых клеток первичной опухоли и микрометастазов по плазме крови от пациента**

Так как диссеминация раковых клеток начинается с узелка из этих клеток в 1-2 мм в диаметре, то излечение рака возможно лишь на пути его ранней диагностики.

В XXI в. станут известными основные гены-маркеры и белки-маркеры, превращающие нормальную клетку в раковую. По ним будет проводиться ранняя диагностика раковых клеток.

Ранняя диагностика рака – это диагностика его начала. Ещё важнее диагностика рака до его начала.

«До начала» – это клетка, в которой уже эпимутации генов свойств клетки и мутации или эпимутации генов-супрессоров и генов репарации ДНК. Это предраковая клетка. Она морфологическими методами исследования не отличается от нормальной.

«Начало» – это первая раковая клетка, из которой затем образуется её потомство, т.е. рак.

Изменения в генах и эпимутации – это метки или маркеры раковых клеток. По ним отличают раковые клетки от нормальных.

В тканях организма часть раковых клеток погибает от апоптоза или некроза, а их мутантные и эпимутантные гены через лимфу попадают в кровь. За счёт мозаичности капилляров опухоли, начиная с узелка раковых клеток в 1-2 мм в диаметре, часть раковых клеток из стенки сосуда легко попадает в кровь. Какие-то из клеток остаются живыми в крови, а другие погибают, но оставляют свой след – фрагменты генов с мутациями и эпимутациями.

Так как ДНК вне клеток в нормальных условиях нет, то обнаружение в плазме крови или других жидкостях от пациента – моча, слюна, слёзная жидкость и др. генов-маркеров, равнозначно обнаружению их носителя, т.е. раковых клеток.

Кровь пациента – главный резервуар, куда попадает ДНК из раковых клеток разных тканей организма.

В XXI в. ДНК-чип по генам-маркерам позволит обнаруживать дефектные клетки конкретной болезни, в том числе и рака. За короткое время – часы, а не дни, это устройство позволит найти любые и все изменения в генах раковой клетки или клеток задолго до симптомов рака.

В предыдущем разделе мы обсуждали биочипы, здесь мы выделим цели ДНК-чипа.

Ген – это фрагмент молекулы ДНК из двух цепей нуклеотидов; основной частью нуклеотида является какое-то одно из четырех оснований: А, Т, Г, Ц.

Цепи нуклеотидов гена удерживаются вместе за счёт комплементарности пар оснований: А с Т, Г с Ц. Их связывает друг с другом спонтанный процесс образования водородных связей между ними. Это явление – образования пар оснований, называется гибридизацией. На этом явлении основан принцип действия ДНК-чипа.

Для этого молекулы-пробы выделяют из раковой клетки или из образца плазмы крови от пациента. Их метят флуоресцентным красителем и с помощью робота вносят в ячейки чипа.

Молекулы-зонды на чипе способны вылавливать из молекул-проб только комплементарную себе молекулу, т.е. вторую цепь нуклеотидов определённого гена.

Если среди молекул-проб такая молекула окажется, то она гибридизуется с молекулой-зондом. Это можно наблюдать: ячейка начинает светиться – тем сильнее, чем больше будет гибридизованных молекул. В этом суть принципа «работы» этого чипа.

Но для обнаружения присутствия в организме раковой клетки или клеток в молекулах-зондах на чипе должны содержаться все возможные эпимутации и мутации определённого гена в дополнение к нормальной копии этого гена на чипе.

Впервые в практике явление гибридизации пар оснований применил Эд. Саузерн в 1975 г. Он использовал меченую молекулу-пробу для определения комплементарной цепи нуклеотидов гена среди молекул-зондов, фиксированных на чипе. Это был прототип ДНК-чипа. В конце 1980-х гг. наш учёный – акад. А.Д. Мирзабеков идею гибридизации молекул реализовал в нашей стране в создании ДНК-чипа.

#### Для каких основных целей можно использовать ДНК-чип?

1. Для определения, какие гены в нормальной клетке каждого типа активны, а какие «молчат».

2. Для сравнения активности генов в нормальной клетке данного типа с активностью генов в раковой клетке этого типа. Это даст возможность выявить гены-причины раковой клетки.

3. Выяснить, зависят ли изменения генов раковой клетки – дефекты их или изменения их экспрессии, от типа клетка.

4. Определить, изменения каких генов и в чём встречаются в раковой клетке чаще других.

5. Контроль лечения рака и его излечения по исчезновению в плазме крови от пациента генов-маркеров раковой клетки.

### Виды мутаций

1. Замена – это замена одной пары оснований в молекуле гена на другую.  
Пример: А-Т на Г-Ц.

2. Вставка – это дополнительная пара оснований или даже несколько их в ген. Пример: новая пара оснований А-Т в ген.

3. Делеция – выпадение одной или нескольких пар оснований в гене.  
Пример: Г-Ц в последовательности оснований где-то отсутствует.

Мутация в гене выразится в его продукте, т.е. в его белках – изменена последовательность аминокислот в белке. Если этот ген в норме регулирует деление клетки, то в случае мутации в этом гене такая клетка может стать раковой.

Раковая клетка может возникать из нормальной клетки не только от эпимутаций и мутаций в ряде генов, но и в результате чрезмерной активности гена. Это приводит к избытку в клетке числа копий этого гена, т.е. иРНК, а значит, нормального по строению, но избытка этого белка.

Пример: ген с-тус во многих типах клетки активирует РНК-полимеразу III типа в 12-15 раз по сравнению с обычной, и этим ведёт к превращению нормальной клетки в раковую.

В каждом случае рака у пациента необходимо определять «молекулярные причины» свойств его раковых клеток: изменения экспрессии в них генов, в том числе генов инвазии, мутации и эпимутации в генах-супрессорах и репарации ДНК.

### Как найти мутацию гена с помощью ДНК-чипа?

Для выявления в гене какого-либо вида мутации, в молекулы-зонды надо внести все виды мутаций этого гена во время синтеза молекул. После этого их размещают в ячейках ДНК-чипа.

Из клеток или здесь образца плазмы крови пациента готовится смесь ДНК-пробы. Каждую из них молекулу метят флуоресцентным красителем и роботом вносят в ячейки известного гена.

Если в ячейке произойдёт гибридизация молекулы-зонда с молекулой-пробой, то лунка начнёт светиться. Из этого будет вывод: в гене из образца плазмы есть эпимутация или мутация. А это означает, что в организме пациента есть раковая клетка или клетки.

Зная, какой ген в этой ячейке и какая в нём мутация или эпимутация, а также сравнив его с нормальной копией гена в контрольной ячейке на чипе, мы узнаем какой измененный ген в плазме крови пациента.

Измерение степени свечения в гелевой лунке укажет нам на титр мутантного или с эпимутацией гена в образце плазмы крови: чем меньше титр, тем меньше раковых клеток в организме пациента.

### Как определить экспрессию гена с помощью ДНК-чипа?

Геном человека расшифрован и главная задача учёных – как можно скорее выяснить функции каждого гена в клетке каждого типа и для организма в целом.

Для определения активности гена в клетке, в лунках чипа фиксируются одноцепочные молекулы ДНК, т.е. «половинки» генов. На чипе размером 1 см<sup>2</sup> можно расположить до 10 тысяч генов.

Как работает чип, мы уже знаем. При гибридизации со второй цепью данного гена, т.е. со второй его «половинкой», образуется двухцепочная ДНК.

Она отличается от одноцепочных участков тем, что способна «цеплять» половинки молекулы гена с флуоресцентным красителем, светящимся в специфичной для него области спектра. Так происходит высвечивание активных генов в клетке.



Откуда берётся вторая цепь гена? Её можно получить из исследуемой клетки, которая в разные промежутки своей жизни и функций включает и разные «наборы» генов в своём геноме. Для нашей цели её получают из плазмы крови от пациента, куда попадают фрагменты генов из погибших раковых клеток.

Известно, что активные гены синтезируют на своей матрице молекулы информационной РНК, т.е. иРНК. Затем эти молекулы используют для синтеза белков.

С помощью фермента «обратной транскриптазы» из вирусов рака, с иРНК получают копию в виде одноцепочной ДНК, т.е. вторую «половинку» гена – кДНК.

Роботом в ячейки чипа переносят молекулы-пробы, т.е. кДНК. Если молекула-зонд комплементарна кДНК, то между ними происходит гибридизация с образованием двухцепочного гена. Такая ячейка или ячейки на чипе начнут светиться. Чем больше степень свечения в гелевой ячейке, тем больше титр этого гена в плазме от пациента, а значит, больше раковых клеток.

Обнаружение раковой клетки или клеток в образце плазмы крови от пациента по маркерам: эпимутации и мутации генов или амплификация генов, даёт возможность выявлять рак у пациента в самом его начале и даже до его начала, т.е. задолго до появления его симптомов. Низкий титр генов-маркеров в плазме крови пациента при анализе на ДНК-чипе должен означать минимальное количество предраковых и/или раковых клеток в его организме.

ДНК-чипы позволяют получить «профили» экспрессии генов в каждом типе нормальной или дефектной клетках. С их помощью уже удалось выяснить, что для нормальных и раковых клеток эти профили различны.

Превращение нормальной клетки любого типа в раковую после действия на неё какого-либо канцерогена. Но когда, и на какую клетку и где в организме человека подействовал канцероген или продукты окисления кислорода, что, может быть, чаще всего, нам всегда неизвестно.

Но при этом раковые клетки обладают одинаковыми зловещими свойствами вне зависимости от типа клетки и от класса канцерогена, вызвавшего её образование. Это и заставляет думать, что раковая клетка любого типа может возникать от одних и тех же изменений в генах.

Если это подтвердится, тогда легче создать минимальный набор генов-маркеров, вызывающих превращение нормальной клетки любого типа в раковую клетку. Гены-маркеры разместят в качестве молекул-зондов в ячейках ДНК-чипа и фиксируют в них. В будущем каждый человек может носить на руке такой чип того же крохотного размера. Чип будет дополнен микросхемой для анализа его информации.

Постоянные, но не редкие в течение года анализы плазмы его крови и других биологических жидкостей на эпимутации и другие изменения генов этого набора, позволили бы выявлять самое «преддверие» рака, т.е. его «начало», а ещё надежнее – «до начала» его.

При выявлении такого «преддверия» рака, на наш взгляд, следовало бы начать профилактическое лечение такого пациента для уничтожения этих первых предраковых и/или раковых клеток в организме пациента. Ряд методов для этой цели уже разработан, но в клиническую практику они лишь начинают «входить».

Выбор препаратов и средств должен определяться молекулярными причинами образования раковой клетки у конкретного пациента. Эти причины будут мишенями для лекарств и средств. Среди них, могли бы быть: моноклональные антитела, нормальные копии генов-супрессоров и генов апоптоза с помощью модифицированного вируса, в будущем – мТКР с лекарственным веществом, малые интерферирующие РНК для разрушения иРНК генов-причин и другие. Это важно, так как место образования таких клеток в организме пациента на этапах – «начало» и тем более – «до начала», нельзя найти никакими методами, кроме методов на основе генов-маркеров и белков-маркеров раковых клеток.

#### **7.4. Белковый чип для диагностики раковых клеток первичной опухоли и микрометастазов по сыворотке крови пациента**

Второй путь ранней диагностики раковых клеток по белкам на поверхности раковых клеток.

Раковая клетка отличается от нормальной клетки того же типа по составу синтезируемых ею белков. Эти белки – продукт «поломок» в генетическом материале нормальной клетки, превратившие её в раковую. Наличие их – признак того, что ген или гены, вызывающий перерождение нормальной клетки, начал свою разрушительную работу. Так как эти белки из раковых клеток, то это белки-маркеры. По наличию их в сыворотке крови от пациента обнаруживают у него рак.

На поверхности нормальной клетки любого типа имеются белки: 1) белки-рецепторы и 2) белки-маркеры. Наши знания о них очень скудные, так как протеомика лишь делает начало.

Нам важно знать какие это белки, чем отличаются в каждом типе нормальной клетки, какова пространственная структура молекул этих белков. Это же надо знать и в раковой клетке разного типа и в чём разница между нормальной клеткой и раковой того же типа.

В многоклеточном организме нормальные клетки идентифицируют друг друга и передают сообщения с помощью белков-рецепторов. Эти рецепторы действуют как химические «флаги» для связи с другими клетками или как химические «ворота», контролирующие поступление в клетку молекул извне.

Внутренняя часть молекулы-рецептора часто представлена ферментом – тирозинкиназой. От неё сигнал извне через белки цитоплазмы в конечном счёте достигает ядра клетки и она даёт ответ – деление, секреция белка и т.д. Другой путь передачи сигнала от белка-рецептора в ядро клетки – через универсальный G-белок.

Дефекты в белке-рецепторе или в G-белке из-за мутаций в их генах ведут к многочисленным болезням, в том числе, к превращению нормальной клетки в раковую. Поэтому важно знать пространственную структуру белков-

рецепторов или G-белков в нормальной клетке каждого типа, а также при любой болезни.

На клетке каждого типа – свои белки-маркеры. Они, как и белки-рецепторы, – продукт генов этой клетки.

Для каждой болезни на поверхности её клеток – характерные этой болезни, белки-маркеры.

В настоящее время каждый вновь открытый ген и белок проверяется на способность быть маркером. Критерий оценки общий, и его дал акад. Г.И. Абелев (2003): «Если в нормальной клетке нового гена или белка нет, а в дефектной, в частности, раковой присутствует, то он уже явный претендент, чтобы стать маркером».

При любой болезни гены-маркеры и белки-маркеры – всегда строго специфичны. Отсюда: диагноз болезни по обнаружению у пациента таких маркеров – точный.

В отношении рака ситуация трудная: здесь гены-маркеры – строго специфичны, а известные белки-маркеры, т.е. антигены на раковых клетках не всегда строго специфичны.

Специфичным белком-маркером раковой клетки может быть лишь тот белок, который синтезируется в раковой клетке, но не синтезируется в нормальной клетке того же типа.

Дело в том, что раковая клетка – это как бы возврат по степени её дифференцировки к эмбриональному периоду. Поэтому раковая клетка снова начинает секретировать эмбриональные антигены; их в нормальной клетке нет, или их содержание меньше.

Пока специфичные антигены в раковых клетках учёным выделить не удалось, и таких антигенов скорее всего нет. А в этом кроются все проблемы создания вакцины от рака: лечебной и, тем более, профилактической.

На вопрос корреспондента акад. Г.И. Абелев ответил: «Нет, такого маркера пока не существует. Думаю, что он вряд ли и появится». Он далее сказал о

другом направлении поиска маркеров раковых клеток – по анализу состава информационной РНК, т.е. копий генов в этих клетках.

«Нет врага» в чистом виде», – так кто-то сказал об известных уже, но неспецифичных белках-маркерах раковой клетки. Всего таких маркеров около 10 – для рака простаты, молочной железы, печени и др.

Их используют на основе того, что синтез такого белка-маркера в нормальной клетке гораздо меньше, чем в раковой клетке этой ткани, из-за слабой экспрессии гена этого белка.

Такие маркеры важны для: 1) установления предварительного диагноза рака по повышению количества данного вещества в крови пациента в несколько десятков раз по сравнению с нормой; в таком случае необходима прицельная проверка того или иного органа несколькими разными анализами, и выяснить, сколько из них изменено, включая при необходимости биопсию из ткани; 2) для выявления раннего рецидива рака и степени адекватности методов лечения рака у конкретного пациента.

Но теперь для такой диагностики раковых клеток у пациента учёные выявили целый ряд новых белков-маркеров в раковых клетках любого типа. Открытие таких маркеров в мире совершается очень быстрыми темпами. Такие белки-маркеры очень ценны, так как они практически в «чистом» виде.

Вся ценность их, в отличие от названных, в том, что гены этих белков-маркеров «включаются» во взрослом организме, но только в раковых клетках, а в нормальных клетках эти гены – «молчат». То есть, в нормальных клетках этот белок не синтезируется. Причина «включения» генов – деметилирование CpG-островков в промоторах этих генов ферментом – деметилазой.

#### 1. Фермент ДНК-метилтрансфераза 1.

Этот фермент химически модифицирует гены – присоединяет метильные группы к цитозину (C), за которым расположен гуанин (G) в промоторе гена. Это подавляет экспрессию гена. Если это будет ген-супрессор, то это способствует превращению нормальной клетки в раковую.

Резкое повышение экспрессии этого фермента в клетке – признак предраковой и раковой клетки. Такое повышение содержания фермента в сыворотке крови от пациента в сравнении с нормой, можно использовать для диагностики с помощью белкового чипа раковых клеток.

Блокада ДНК-метилтрансферазы 1 в клетке предупреждает или снимает репрессию генов-супрессоров, что препятствует превращению нормальной клетки в раковую.

## 2. Метил-ДНК-связывающие белки.

После присоединения метильных групп к CpG-островкам промотора генов вступают в действие метил-ДНК-связывающие белки. Они связываются с участком метилирования промотора гена и подавляют экспрессию гена.

А.В. Прохорчук (2005) и американские коллеги заняты исследованием одного из таких белков – белок Каизо. Учёные измерили уровень экспрессии гена белка Каизо в клетках рака разного типа от человека. Он оказался «в десятки раз выше», чем в нормальных клетках того же типа. По мнению учёных, это можно использовать для ранней диагностики раковых клеток, а ген белка может стать «геном-маркером и указать на характеристики рака».

Для уничтожения раковых клеток ученые планируют создать химерный Каизо белок, который бы не подавлял, а усиливал экспрессию генов-супрессоров раковой клетки. А.В. Прохорчук – руководитель проекта – отмечает, что на этом пути «кроятся подводные камни. Нужно заставить химерный Каизо работать только во благо, т.е. активировать только гены-супрессоры раковой клетки, но не остальные метилированные гены. Над этим мы сейчас и работаем».

Конечная цель исследований этих ученых – «изучить возможность использования белка Каизо как мишени для направленной противораковой терапии».

## 3. Белок Mts 1 – продукт гена mts 1.

Он открыт акад. Г.П. Георгиевым и его группой (1999). Он создаёт свойство инвазии раковой клетки разного типа. Белок синтезируется в раковых

клетках, а в большинстве нормальных клеток синтеза его нет, так как его ген *mts 1* «молчит» из-за метилирования его промотора. Обнаружение повышенной экспрессии этого белка в сыворотке крови указывает на наличие метастазов раковых клеток в организме пациента.

Связывание этого белка в раковых клетках подавляет метастатический фенотип раковых клеток.

#### 4. Белки JD-1 и JD-3 и их гены.

Они открыты проф. Р. Бенезра (1999) и его группой. Эти белки вызывают ангиогенез и лимфангиогенез в узелке из раковых клеток с размера его в 1-2 мм в диаметре в ткани различных органов, что препятствует отмиранию раковых клеток. В нормальных клетках взрослого организма гены этих белков – «молчат», так как также их промоторы метилированы. Блокада белков этих генов подавляет микрометастазы в тканях.

5. Фермент теломераза. Он делает раковую клетку бессмертной путём восстановления длины теломер раковой клетки перед каждым её делением. В нормальной клетке у взрослого человека ген этого белка «молчит», – нет и теломеразы.

Ген этого фермента «включён» деметилированием его промотора в раковой клетке. В норме он экспрессируется также в половых клетках. По резкому повышению количества фермента в сыворотке крови в сравнении с нормой, его можно использовать для самой ранней диагностики раковой клетки любого типа в организме пациента.

Теперь учёные из США на основе этого фермента создали вакцину от рака любого типа клетки.

#### 6. Белок под кодовым названием «5T4».

Он открыт проф. П. Стерн с коллегами в Британии. Оказалось, что именно этот белок «маскирует» белки-антигены на поверхности раковой клетки любого типа от Т-клеток иммунной системы организма человека.

Этот белок синтезируется в стволовых клетках эмбриона человека и необходим для его развития.

Очень ценно то, что во взрослом организме этот белок синтезируется только в раковых клетках любого типа клетки и имеется на их поверхности. Ген этого белка в нормальных клетках также «молчит». Этот белок позволяет раковым клеткам «ускользнуть» от воздействия иммунной системы пациента и распространяться этим клеткам по всему организму без конца и границ.

На основе белка «5T4» учёные разработали вакцину – «Волшебная Пуля», и уже ведутся её испытания на добровольцах, страдающих от рака.

#### 7. Циклин и циклин-зависимая киназа.

В раковой клетке любого типа избыточная экспрессия этих молекул-белков-регуляторов клеточного цикла. По анализу содержания этих белков в сыворотке крови от пациента можно обнаружить эти белки, а, значит, и их носителей – раковые клетки.

Протеомика – наука о белках, способна за ряд лет открыть протеом нормальной клетки каждого типа, а также раковых клеток у человека. Будут известны белки-рецепторы и белки-маркеры раковых клеток разного типа.

Тогда с помощью белкового чипа или микроматрицы будет возможно проводить раннюю диагностику раковых клеток по этим белкам в сыворотке крови от пациента.

Будут диагностироваться: 1) раковая клетка и её близкие потомки первичного очага рака; 2) микрометастазы раковых клеток по белкам свойства инвазии этих клеток.

Мы уже знаем, что структура белкового микрочипа принципиально не отличается от ДНК-чипа: пластинка площадью в 1 см<sup>2</sup> или чуть больше из стекла или пластика. На ней в строгом порядке фиксированы трехмерные ячейки из геля, каждая ячейка – диаметром не более 100 микрон.

В каждую ячейку помещается известная исследователю молекула-зонд. В качестве молекул-проб будет исследуемая жидкость – сыворотка крови от пациента. Молекула-зонд способна избирательно связываться с молекулой-пробой, содержащейся в исследуемой сыворотке, если она комплементарна по структуре молекуле-зонду.



В зависимости от вида молекулы-зонда может быть несколько вариантов белкового чипа для диагностики раковых клеток по образцу сыворотки крови от пациента:

1. Моноклональное антитело (мКА) на чипе – поиск белка-маркера раковой клетки в сыворотке крови.

2. Моноклональный Т-клеточный рецептор (мТКР) на чипе – поиск белка-маркера раковой клетки в сыворотке крови.

4. мКА на чипе – поиск белка-рецептора раковой клетки в сыворотке крови.

5. мТКР на чипе – поиск фермента раковой клетки в сыворотке крови.

6. Белок-рецептор раковой клетки на чипе – поиск антител к нему в сыворотке крови.

7. Белок-маркер раковой клетки на чипе – поиск антител к нему в сыворотке крови.

Мы привели схему поиска раковых клеток в организме пациента по белкам, изложенным в пунктах 1-7 этого раздела, с помощью белкового чипа. Каждый из этих белков является маркером для ранней диагностики раковых клеток по сыворотке крови от пациента, а также мишенью для лекарств и средств с целью уничтожения раковых клеток.

## **Глава 8. Методы уничтожения раковых клеток**

### **8.1. «Малые интерферирующие РНК» – «выключатели» гена и средство для ингибирования пролиферации раковых клеток**

В клетке каждого типа организма одинаковый набор генов. Но только часть из них работает. Причем в одном типе – одни, а в другом типе клетки – другие гены. Мы ещё не знаем, какие гены в клетке разного типа включены, а какие нет.

Включение или экспрессия гена – это синтез копии его кодирующей цепочки – иРНК, а по ней как на матрице синтез белка в рибосоме клетки.

Этот процесс происходит в клетке так:

- две цепи ДНК в нужном месте разделяются, открывая ген, т.е. участок кодирующей цепи;
- к нуклеотидам его по принципу комплементарности оснований присоединяются нуклеотиды, образуя одноцепочечную информационную РНК (иРНК). В ней, в отличие от ДНК, основание Т (тимин) заменяется основанием – У (урацил).

Этот процесс переноса информации с гена на РНК с образованием иРНК называется транскрипцией гена. По такому принципу на разных генах в клетке образуется также транспортная (тРНК) и рибосомная РНК (риб-РНК).

иРНК несет в себе всю информацию гена, кроме той, что в интронах гена, – она удаляется при созревании иРНК. иРНК передает информацию на риб-РНК в рибосоме клетки. тРНК доставляет к рибосоме части для белков – аминокислоты в соответствии с той инструкцией, что в иРНК. Так на рибосоме строится полипептидная цепь, но обычно цепи, образующие молекулы белков.

Понимание молекулярных причин «включения» и «выключения» генов позволит управлять этим процессом и держать его под контролем, чтобы, например, предупредить возникновение из нормальной клетки раковой клетки.

В клетке гены, кодирующие белки, составляют 2%, а вне-генная, т.е. не кодирующая белки остальная часть ДНК, составляет 98% генома клетки. По-

этому ее называли – «junk» ДНК, что означает «хлам, утиль». Но «не кодирует» – не значит, что «не используется».

Оказалось, что во «вне-генной» части имеется множество генов, которые «разбросаны» внутри обычных генов и между генами. Но их продуктом является не белок, а «малые» РНК. В класс «малых» молекул РНК включают молекулы, содержащие короткой длины цепочки нуклеотидов.

Отличия «малых» РНК от трёх клеточных РНК:

- они из двух цепей нуклеотидов, которые спариваются друг с другом по принципу комплементарности, что и в ДНК хромосом;
- по 3 концам каждой из цепочек всегда остаётся два неспаренных нуклеотида.

В клетке «малые» РНК заняты другим делом: регулируют работу обычных генов. Они включают их экспрессию или выключают их из экспрессии, когда это нужно в клетке.

История «малых РНК» клетки началась в начале 90-х годов XX в. с экспериментов учёных на цветке «петуний», а затем на черве *C.elegans*. На обоих живых существах учёные пытались усилить выражение определённого признака. Для этого они вводили в их клетки копии гена, т.е. иРНК этого признака. Но вместо усиления выражения, т.е. экспрессии гена, происходило его «замолкание». В биологии это обозначают термином – «сайленсинг» от англ. «silencing» – молчание, немота. Причиной этого явления оказалась малая интерферирующая РНК (siRNA), которую открыли в 1998 г. ученые из США Эндрю Файр (Andrew Z. Fire) и Крэйг Меллоу (Craig C. Mello). Эти РНК обладают способностью «выключать» гены путем разрушения их иРНК. Эффект «гашения» экспрессии гена «малыми РНК» назван РНК-интерференцией, а короткие молекулы, вызывающие его, называли siРНК (short interfering RNAs, малые интерферирующие РНК). Это самые короткие молекулы, состоящие у млекопитающих всего из 21-23 нуклеотида.

Вначале было непонятно, как siРНК появляется в клетке после введения в неё копии гена. Авторы открытия выяснили, что в клетке есть молекулярный

механизм для синтеза этой молекулы и накопления её. Механизм РНК-интерференции в клетке запускается двухцепочечной РНК (дцРНК) и осуществляется в несколько этапов.

1-й этап. Белок Дайсер нарезает дцРНК на фрагменты, содержащие короткие в 21 нуклеотид фрагменты РНК. Это уже siРНК.

2-й этап. Такие фрагменты захватывается комплексом белков – RISC (RNA induced silencing complex).

3-й этап. В комплексе дуплекс коротких РНК расплетается, и только одна цепь siРНК остаётся в нём. Это фрагмент антисмысловой цепочки гена.

4-й этап. Комплекс RISC с помощью антисмысловой цепи siРНК сканирует молекулы РНК клетки. siРНК-наводчик находит комплементарную ей последовательность нуклеотидов в соответствующей смысловой иРНК, т.е. копии гена и разрезает её. Теперь в клетке уже нет иРНК, а, значит, нет и синтеза белка гена.

Ни один из блокаторов гена, известных до сих пор, не обладает такой специфичностью к своему гену-мишени. Основная функция siРНК – защита генома клетки. Эти молекулы предохраняют геном от мутаций, генов извне – от вирусов, а также от транспозонов.

Итак, учёные доказали, что siРНК в клетке блокирует тот ген, матричная цепь которого комплементарна антисмысловой цепи внутри siРНК. Мишенью для молекулы является не сам ген, а его иРНК. То есть ген «выключается» путём разрушения его копии – иРНК, после выхода её из ядра в цитоплазму клетки. Каждая siРНК распознает и разрушает только свою специфическую иРНК и не вызывает никаких побочных эффектов. Замена даже одного нуклеотида внутри siРНК резко снижает эффект интерференции.

Открытие siРНК в 2002 г. признано важнейшим открытием года в списке десяти открытий. Введение в клетку siРНК – это новый метод «выключения» гена (Рис. 1).

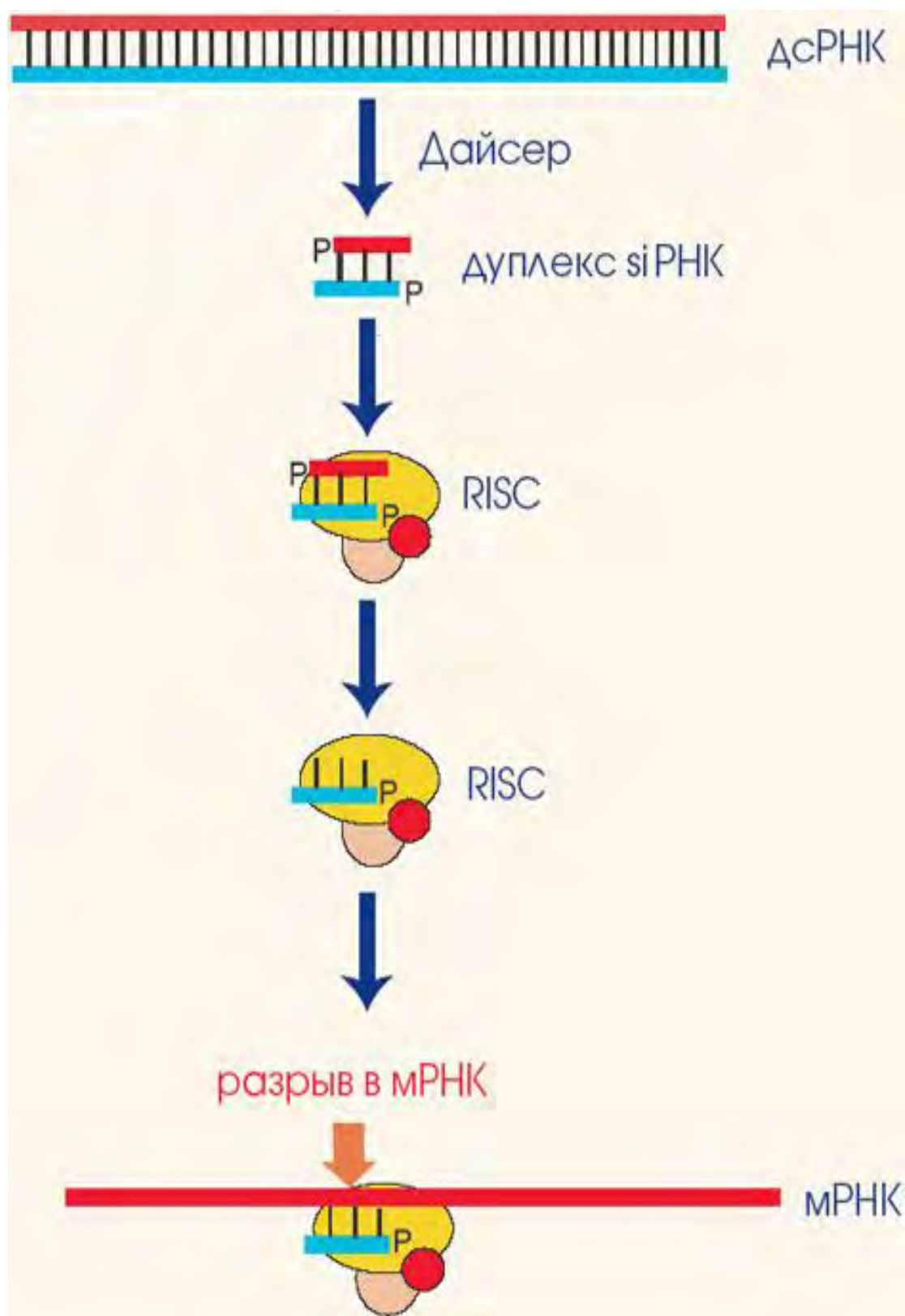


Рис.1. Этапы «РНК-интерференции» в клетке (рис. и цит. по: Т. Бархатова, 2005).

В отличие от антисмысловых РНК, siРНК – «инструмент многоразового использования». Они связываются всё с новыми и новыми молекулами специфической иРНК, выводя каждый раз их из строя.

Раскрытие генома человека в 2000 г. – это открытие нуклеотидной карты ДНК человека. Однако, эта карта описывает только последовательность нуклеотидов в каждом гене, но не функции гена. Чл.-корр. Л. Киселёв (2006) считает, что теперь стало возможным перейти к созданию карты функций генов. Эта работа, по мнению Л. Киселева, может быть закончена уже через один-два года.

Метод «выключения» гена очень необходим не только для выяснения функций каждого гена в клетке, но и для «выключения» гена-причины, вызывающего ту или иную болезнь, в том числе возникновение раковой клетки из нормальной клетки ткани. Выяснив гены-причины раковой клетки, можно «заглушить» гены, – значит, предупредить и возникновение рака.

Для выявления функций гена необходимо иметь клетки в культуре, и, используя метод Файера и Меллоу, можно по очереди выключать ген за геном и смотреть, какие функции клетки при этом пропадают или появляются. Так люди будут впервые знать, какую функцию или функции выполняет каждый ген в клетке (Л. Киселёв, 2006).

За открытие «РНК-интерференции» – подавления генов двухцепочечной РНК, американским учёным Эндрю Файер и Крейг Меллоу присуждена Нобелевская премия в области медицины и физиологии за 2006 г.

Успех применения препарата siРНК зависит от доставки его в клетки-мишени и защиты его от воздействия ферментов клетки. siРНК должны находиться в клетке достаточно долго, чтобы выполнить свою роль – найти специфические иРНК и связаться с ними. Препарат представляет собой синтезированные *in vitro* двухцепочечные РНК длиной в 21 нуклеотидную пару. Чтобы молекула-препарат легче проникала в клетку и не разрушалась, к молекуле присоединяют липофильную группу (Г. Стикс, 2005). Предполагается, что со временем короткие двухцепочечные РНК можно будет вводить в кровоток пациента и лечить системные болезни. Рак с размера узелка 2 мм в диаметре тоже становится системной болезнью.

Джон Марганоре (J.M. Marfganore, 2006) из США пишет, что у животного единичная доза siРНК сохраняет активность в организме в течение 22 суток. «Если то, что проделано с клетками млекопитающих в культуре, удастся повторить на уровне целого организма, мы получим уникальный метод создания лекарственных препаратов. Осуществится заветная мечта, можно будет прицельно выводить из строя нужные гены».

С открытием «РНК-интерференции» появилась возможность подавлять избыточный или недостаточный синтез определённых белков в нормальной клетке, что может превратить её в раковую клетку. Учёные предполагают, что этот метод должен быть лишен побочных эффектов, которыми сопровождаются другие методы лечения рака. Однако надо прежде провести соответствующие исследования на животных, а затем и на пациентах.

## **8.2. Апоптоз и пути его применения для уничтожения раковых клеток**

Это необычное явление впервые заметил древний врач К. Гален (131-203 гг. н.э.). Он наблюдал листопад с деревьев осенью: листья опадают с живой ветки, а если её сломать, то листопад прекратится.

Из этого К. Гален сделал выводы: 1) листопад – это преднамеренное самоубийство; 2) листья убивают сами себя, так как при наличии их зимой, снег ломает ветки. Это явление он обозначил термином апоптоз.

Термин «апоптоз» происходит от греч. apo – отделение, ptosis – опадание. Для К. Галена осталось неясным, – что это за причина в листьях, ведущая их к самоубийству.

Оказалось, что способность к самоубийству присуща любой клетке, как у растений, так и у животных. То есть в каждой клетке имеется программа на апоптоз. В нормальной клетке эта программа выключена.

Для поддержания жизни многоклеточного организма требуется, как замена клеток новыми путём деления, так и присутствие смерти уже ненужных клеток – апоптоз их.

Отмирание клеток в многоклеточном организме первыми обнаружили биологи. Так, у эмбриона человека между пальцами рук и ног имеются перепонки, есть жабры и хвост. Но они к рождению человека исчезают через апоптоз их клеток.

После открытия апоптоза в течение десятилетий учёные были заняты описанием морфологии апоптоза клеток и стадиями или этапами этого процесса. Позднее была изучена морфология другого типа смерти клетки – некроза.

В. Флемминг (W. Flemming, 1843-1905) в 1895 г. дал подробное морфологическое описание апоптоза клетки. В такой клетке в первую очередь ядро распадается на отдельные фрагменты, которые затем как бы «рассасываются». Параллельно сама клетка распадается на частицы, в последствии названные «апоптозными тельцами».

Дж. Керр (J.R. Kerr, 1972) и соавторы отметили, что апоптоз имеет не меньшее значение, чем митоз. Любая живая клетка снабжена программой апоптоза, регулируемой рядом генов.

До 1960-х гг. XX века причина апоптоза оставалась невыясненной. Предполагалось, что такая ликвидация клетки происходит посредством фагоцитоза или каким-то другим, ещё неизвестным способом.

В 1963 г. двое британцев – С. Бреннер (S. Brenner) и Дж. Салстон (J. Sulston) и американец Р. Горвиц (R. Horvitz) занялись изучением развития многоклеточного организма от одной клетки до взрослого организма.

Для этого С. Бреннер впервые предложил удачный объект – червь нематоду (*C. elegans*). Длина его тела меньше 1 мм, а тело прозрачно, что делает удобным изучение размножения клеток просто под микроскопом. При изучении развития этого простого многоклеточного организма Дж. Салстон открыл апоптоз.



Он заметил, что в процессе развития тканей и органов червя клетки не только делились, но и умирали. Удивляло то, что смерть их не была вызвана какими-либо внешними повреждениями. Ему стало ясно, что смерть клеток – чётко отрегулированный процесс при развитии червя.

Дж. Салстон мог точно отметить те клетки, которым суждено погибнуть, – это и есть регулируемый процесс смерти клетки – апоптоз. Учёный обнаружил, что апоптоз регулируется генами – выявил мутацию одного из генов – *puc-1*, продукт его оказался необходимым для деградации ДНК погибающей клетки.

В 1970-е гг. Р. Горвиц поставил задачу – обнаружить эти «внутренние причины» гибели клетки, т.е. апоптоза. Он открыл несколько генов, мутации в которых приводят к нарушению апоптоза в эмбриогенезе червя.

В 1986 г. он сделал сообщение о первых двух генах, вызывающих апоптоз: «гены смерти» – *ced-3* и *ced-4* (название – *ced* – от англ. cell death – смерть клетки). Показал, что наличие этих двух генов необходимо, чтобы произошла смерть клетки.

Позднее Р. Горвиц доказал, что другой ген – *ced-9*, взаимодействуя с генами *ced-3* и *ced-4*, предотвращает гибель клетки. То есть ген *ced-9* – это «ген жизни». Он обнаружил множество генов, направляющих элиминацию погибшей клетки. Он показал, что в геноме человека присутствует ген, подобный гену *ced-3* нематоды: ген *ced-3* кодирует фермент каспазу; ген *ced-4* – аналог гена у человека для фактора – *Apaf-1*; аналог гена *ced-9*, предупреждающего апоптоз, у человека – ген *bcl-2*.

В 2002 г. этим трём учёным – «за открытие регуляции развития органов и программированной клеточной смерти генами» присуждена Нобелевская премия.

#### Апоптоз и некроз клетки – разные типы смерти клеток

Показатель	Апоптоз	Некроз
Характер процесса	Физиологический или патологический	Только патологический

Регуляция	Генами через их белки	Нерегулируемый
Причина	Сигнальная молекула для мембранного рецептора, или отсутствие сигнальной молекулы	Токсичные и мембранотропные агенты, не адекватные внешние условия
Скорость развития	1-12 ч.	В пределах 1 ч.
Локализация первичного повреждения	В ядре	В клеточной мембране
Плазматическая мембрана	Интактна до последней стадии	Разрушается в начальной стадии
Распространённость	Отдельные клетки	Много клеток
Причина гибели клетки.	Деградация ДНК, нарушение работы генов	Нарушение целостности клеточной мембраны
Размер клетки	Уменьшение (сморщивание)	Увеличение (набухание)
Изменения ядра	Конгломераты хроматина, фрагментация	Набухание
Изменение клеточной мембраны	Образование апоптотных телец, фагоцитоз их	Нарушение целостности, разрушение и дезинтеграция клетки
Состояние ДНК	Разрывы с образованием крупных, затем мелких фрагментов	Неупорядоченная деградация
Исход для ткани	Без воспаления и рубца	С воспалением и рубцом
Методы выявления: - морфологические - электрофоретические	Сморщивание клетки Формирование «лесен-	Набухание клетки Размазанное пятно при

ки» при электрофорезе ДНК	электрофорезе ДНК
------------------------------	-------------------

Апоптоз клеток сопровождает человека на протяжении всей его жизни, начиная с оплодотворенной яйцеклетки. Из неё берут начало все типы клеток, их более 200 типов, а организм взрослого человека состоит из  $5 \cdot 10^{13-14}$  клеток. Взаимодействия между разными типами клеток объединяет функции организма в единое целое. Клетка каждого типа является частью той или иной ткани и организма в целом. В организме человека каждый день рождается за счёт деления более тысячи миллиардов клеток и столько же отмирает через апоптоз, и мы не ощущаем этого.

### Причины апоптоза клеток

В физиологических условиях для:

- сохранения генетически заданной численности клеток в каждой ткани, стабилизации границ ткани;
- ликвидации клеток, случайно оказавшихся вне своей ткани: каждая клетка на поверхности имеет рецепторы, с которыми связывается антиапоптозный белок, специфический для каждой ткани. Эти белки непрерывно посылают клетке сигнал: «живи дальше» (В.П. Скулачёв, 2001). При выходе же клетки из своей ткани, клетка лишается этого белка, сигнал исчезает, и клетка кончает с собой;
- ликвидации клеток, к которым не поступает сигнал к делению от соседних клеток, например, при отсутствии молекулы фактора роста;
- уничтожения нормальных клеток после  $50 \pm 10$  делений – лимит Хейфлика; из-за предельного укорочения теломер на концах ДНК геном такой клетки включает апоптоз;

В патологических условиях для:

- уничтожения клетки с повреждениями ДНК – эпимутации в генах свойств клетки, чтобы она не превратилась в раковую клетку;
- уничтожения клетки с повреждениями ДНК – раковая клетка, чтобы не дала потомства с такими дефектами ДНК, т.е. рак;

- ликвидации клетки с нерегулируемой стимуляцией пролиферации за счёт повышенной экспрессии гена c-myc и/или транскрипционного фактора E2F;

- ликвидации клетки с нарушениями клеточного цикла;

- отмирания клетки, инфицированной вирусом, в том числе опухолеродным вирусом; в первом случае для предупреждения распространения инфекции на соседние клетки, а во втором – для предупреждения образования из нее раковой клетки.

Клетка, подвергающаяся апоптозу, в литературе обозначается определённым термином:

- «ненужная» – это клетка как часть своей ткани и организма в целом, отмирает после выполнения своих функций;

- «теряющая свой дом» – это опухолевая клетка, которая утратила контакты с соседними клетками своей ткани и с межклеточным матриксом в результате генетических нарушений в ней;

- «чужая» или «несвоя» – это клетка с нарушениями в генах, т.е. предраковая, а также раковая клетка. На поверхности таких клеток из-за генетических в них перестроек появляются новые белки. А то, что не закодировано в геноме клетки в норме в процессе эволюции, для иммунной системы является «чужим» или «несвоим», другими словами, – «чужеродным». В организме человека ежедневно образуется множество таких клеток, но иммунная система их распознаёт и уничтожает.

#### Как включается программа апоптоза в клетке?

Апоптоз вызывают как внутриклеточные сигналы, так и внешние. Внешние сигналы действуют через молекулу-рецептор, пронизывающую насквозь мембрану клетки-мишени. В молекуле-рецепторе три части – наружная, т.е. вне клетки, внутренняя – в толще цитоплазматической мембраны и внутренняя, выступающая в цитоплазму клетки. Сигнальная молекула находится либо во внеклеточной жидкости, либо на поверхности других клеток или в межклеточном матриксе.

## Стадии апоптоза

В апоптозе выделяют три стадии, но пока они ещё мало охарактеризованы: 1 стадия – инициации, т.е. восприятие сигнала. 2 стадия – передача сигнала и 3 стадия – эффекторная стадия (Рис. 1).

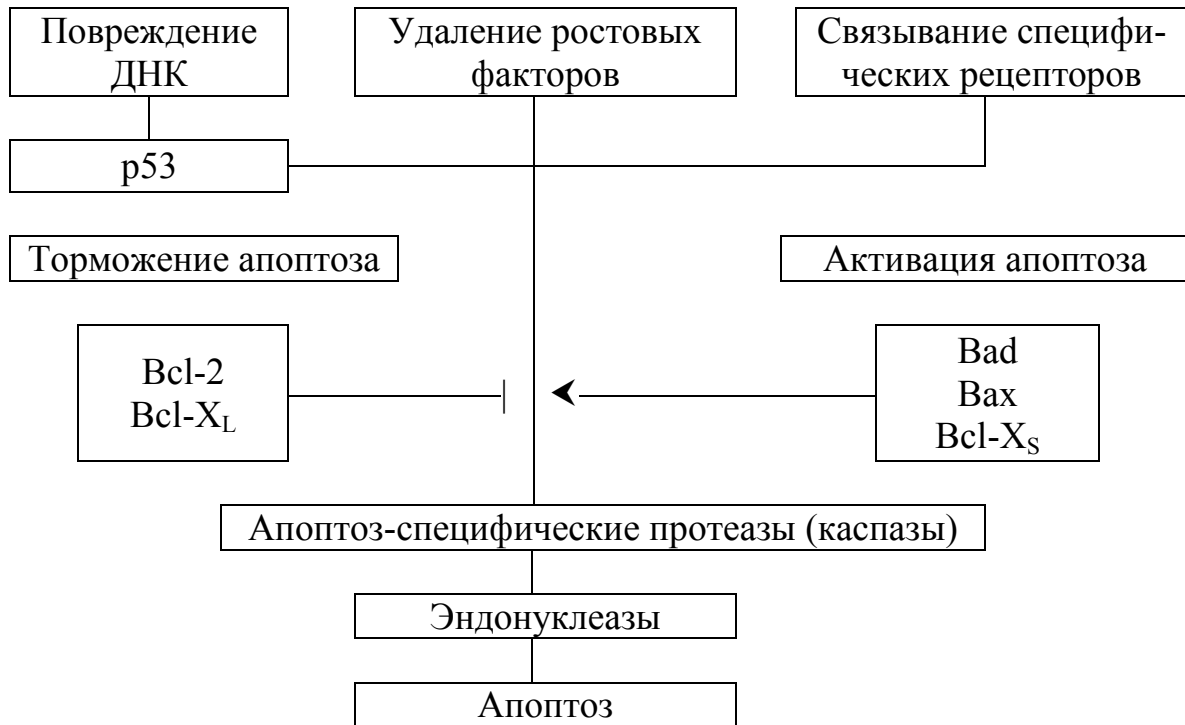


Рис. 1. Общая схема стадий апоптоза (рис. и цит. по: М.А. Пальцев и соавт., 1998).

1. Стадия инициации. Сигнал к клетке-мишени о смерти изнутри клетки поступает от повреждений ДНК, от дефицита или отсутствия фактора роста. Сигнал к клетке-мишени извне вылавливает молекула-рецептор.

2. Стадия передачи сигнала. После связывания рецептора сигнальной молекулы в молекуле-рецепторе из-за изменения положения атомов наступают изменения её конформации. Внутренняя часть молекулы-рецептора обычно является ферментом киназой. Она активирует цепочку белков, последний из которых находится в ядре клетки-мишени. Здесь происходит активация генов, включающих апоптоз в клетке, т.е. «гены смерти» и/или репрессии генов, препятствующих апоптозу клетки, т.е. «генов жизни». Через иРНК генов на рибосомах происходит синтез их белков, в том числе прокаспазы и другие белки-ферменты, участвующие в апоптозе.

3. Эффекторная стадия. Она осуществляется белками – продуктом «генов смерти» во взаимодействии с белками – продуктом «генов жизни». Обе группы генов принадлежат к одному семейству генов – bcl-2.

К «генам смерти» относятся: bax – его белок Bax, bak – Bak, bad – Bad, bid – Bid, bik – Bik.

К «генам жизни» относятся: bcl-2 – его белок Bcl-2, bcl-X<sub>L</sub> и его белок – Bcl-X<sub>L</sub>.

Судьба клетки-мишени при поступлении сигнала к апоптозу – войдет ли она в апоптоз или сохранит жизнь себе, зависит от количества белка.

Так, если преобладает белок Bax над белком Bcl-2, клетка-мишень вступит в апоптоз. Если образуется комплекс из двух молекул Bax, т.е. Bax/Bax, то и в этом случае начнётся апоптоз. При наличии достаточного количества молекул белка Bcl-2 происходит образование комплекса Bax/Bcl-2, в этом комплексе Bax теряет свою апоптотическую активность.

#### Митоптоз в реализации апоптоза

Доказано, что многие виды апоптоза реализуются через образование в мембране митохондрий пор белками «генов смерти». Это приводит к митоптозу, т.е. смерти митохондрии клетки-мишени, а неминуемое следствие этого – смерть клетки (В.П. Скулачёв, 1996).

У провинившихся японских самураев тоже был один способ уйти из жизни – при отсутствии палачей: «делали себе харакири». В.П. Скулачёв (1996) считает, что в биологии действует «самурайский закон», – «лучше умереть, чем ошибиться», начиная с уровня митохондрии и кончая человеком. Так как апоптоз реализуется одним механизмом, – через митоптоз, учёный применяет иногда термин «харакири» вместо слова «апоптоз».

Bcl-2 – главный ингибитор апоптоза и локализуется на наружной мембране митохондрий (Рис. 2). Белок Bax до получения сигнала к апоптозу находится в цитоплазме, а после сигнала мигрирует в мембраны митохондрий.

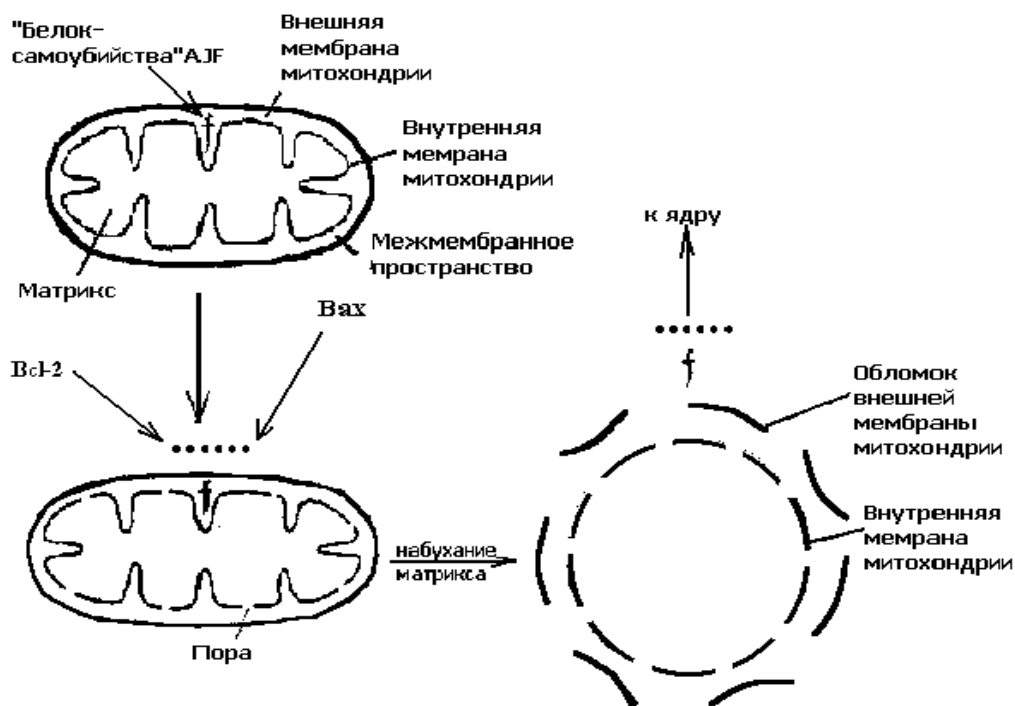


Рис. 2. Митоптоз в реализации апоптоза: f – «белок самоубийства» – AIF, вызывающий апоптотические изменения в ядре клетки [цит. и рис. по: В.П. Скулачев (1996) с изменениями].

Этот белок связывается с внутренней мембраной митохондрии и открывает в ней поры, вызывая набухание матрикса митохондрии и разрыв её внешней мембраны. В результате из межмембранного пространства митохондрий выходит в цитозоль ряд белков: цитохром с, фактор, индуцирующий апоптоз или белок самоубийства – второй фактор, активирующий апоптоз, и прокаспаса 9. Именно эти белки осуществляют эффекторную стадию апоптоза – деградацию ДНК, изменения мембран и фрагментацию клетки в апоптотические тельца.

Белок AIF в своей структуре имеет адресную метку в ядро клетки-мишени. Он сразу из цитоплазмы проникает в ядро клетки, активирует нуклеазы, которые расщепляют ДНК, это приводит клетку-мишень к апоптозу.

Цитохром с вызывает апоптоз иначе. В цитоплазме этот белок связывается с белком Araf-1 и молекулами прокаспасы 9 – это фермент протеаза; путём расщепления образуется каспаза 9. Она расщепляет прокаспазу 3 и образуется каспаза 3 – активный фермент, разрушает в клетке-мишени белки, ДНК, и клетка гибнет.

Оба пути апоптоза – через белок Араф-1 и цитохром с схематично выглядят так: сигнал самоубийства → митоптоз → апоптоз (В.П. Скулачёв, 2001).

В отличие от любой клетки многоклеточного организма раковая клетка – не часть ткани, а одноклеточный организм-паразит. Для клеток иммунной системы она «своя», так как её протеом кодируется геномом организма-хозяина. Так как раковая клетка – организм, к ней должен применяться термин – фенотоз, а не апоптоз.

В инициации программы апоптоза важная роль принадлежит гену-супрессору wt53.

Белок этого гена – p53 локализован в ядре клетки и является регулятором транскрипции других генов – ген белка p21 и других, которые могут задерживать клетку в G-фазе клеточного цикла.

В норме ген wt53 в клетке молчит. При повреждениях ДНК происходит активация этого гена – много белка его. Он блокирует клеточный цикл в фазах G1 и G2 до репликации ДНК и митоза, делая возможной репарацию ДНК, и этим предотвращает появление клеток с эпимутациями и мутациями. Если репарация не произошла, то индуцируется апоптоз для защиты организма от присутствия дефектных по геному, т.е. предраковых клеток, способных превращаться в раковые клетки.

В половине случаев раковых клеток разного типа ген-супрессор wt53 имеет мутации. Это ведёт к превращению предраковой клетки в раковую клетку и возникновению из неё рака. То есть раковая клетка в отличие от любой другой клетки не подвергается апоптозу, если в ней дефекты в её генах-супрессорах.

Знания о «генах смерти» и «генах жизни» и их белках позволит управлять фенотозом раковых клеток.

Генетические изменения в раковых клетках, ведущие к подавлению обоих путей индукции апоптоза

В них закономерно обнаруживаются:



- потеря экспрессии на поверхности раковой клетки рецептора смерти Fas; при наличии бы рецептора Fas взаимодействие его с FAS-L или с моноклональными антителами приводило бы раковую клетку к фенотозу;

- нарушения проведения апоптогенного сигнала к митохондриям. Например, при мутации в «страже» генома гене wt53 и мутации или эпимутации в гене-супрессоре PTEN;

- ингибирование пор во внутренней мембране митохондрии для цитохрома c и AIF, вследствие экспрессии «генов жизни» через их белки – Bcl-2. Эти белки не дают открыть поры во внутренней мембране митохондрии;

- блокирование активации эффекторных каспаз. Например, при потере экспрессии белка Araf-1 в результате метилирования его гена и др.

#### Пути использования индукции апоптоза в раковой клетке

Главная задача сегодня – как можно быстрее найти способы воздействия на молекулярные причины апоптоза, чтобы вызвать апоптоз раковых клеток. Над этим сейчас работают учёные во многих странах мира, в том числе и учёные нашей страны.

- индукция апоптоза раковых клеток путём введения в составе генетической конструкции свободных копий «гена смерти» bax; средством доставки является ретровирус, способный проникать именно в раковые клетки; перед этим вирус должен быть лишён способности к размножению. Это открыло значительные перспективы в генной терапии раковых клеток разного типа;

- замена мутированного «стража» генома – гена wt53 на нормальный с целью восстановления способности раковых клеток к фенотозу; средство доставки гена wt53 – ретровирус или лентовидный вирус;

- малые интерферирующие РНК, для выключения «гена жизни» – bcl-2 в раковой клетке; мишенью их служит его иРНК, которую они разрушают;

- доставка в раковую клетку «гена смерти», например, ген bax, что вызовет в ней фенотоз;

- подавление в раковой клетке генов с эпимутациями, создающими ее свойства, и замена генов-супрессоров с мутациями нормальными генами.

Очень многие патологические процессы в организме заканчиваются апоптозом.

Ключевым фактором в изучении апоптоза клетки оказался правильный выбор объекта для экспериментов учёных. На одноклеточных организмах – бактерии и др. апоптоз изучать невозможно. Млекопитающие очень сложны для исследования, так как состоят из большого числа клеток. Идеальное решение предложил в начале 60-х гг. С. Бреннер: выбор пал на нематоду.

В процессе апоптоза клетки разрушаются её структуры, например, митохондрии, но при этом мембрана клетки остаётся целой.

Так клетка разрушает сама себя изнутри без каких-либо негативных последствий для организма. Клетка заканчивает свою жизнь самоубийством, когда получает сигнал на уничтожение. А отдают его специфические ферменты и белки, которые вырабатываются в клетке в нужном количестве и в нужный момент.

Эта программа строго контролируется многими генами, которые были открыты учёными. Одни охраняют полноценные клетки, другие дают сигнал на уничтожение исчерпавших свой срок или подвергшихся эпимутациям и мутациям. И лишь одни клетки не подвергаются апоптозу, очень часто – раковые. Причина: изменения в генах, регулирующих апоптоз в клетке.

Акад. В.П. Скулачёв (2001) задаёт вопросы и отвечает на них сам так: «Почему же должны умирать клетки человеческого организма? Да в том-то и дело, что они, как правило, не умирают от старости. Они кончают самоубийством. Как ни парадоксально это звучит, но есть все основания полагать, что смерть клетки запрограммирована. Так же, как запрограммировано отмирание органов: у растений это осенний листопад, у головастика – исчезновение хвоста, у эмбриона человека – рассасывание хвоста и жабер».

«В организме действуют программы не только на жизнь, но и на смерть, и клетка умирает не потому, что состарилась, а потому, что сама кончает счёты с жизнью, если возникает подозрение, что она может стать потенциально опасной или просто ненужной для окружающих тканей». «Клетка живёт, пока полу-

чает информацию, что в ней все нормально, но когда возникает угроза серьезных неполадок, то срабатывает приказ «уйти из жизни»».

Изучение апоптоза клетки и его регуляции генами помогают понять молекулярные причины не только образования раковой клетки, но и других болезней. Это позволяет клиницистам управлять этим процессом у пациентов. Уже с момента открытия «генов жизни» и «генов смерти» в дефектной клетке учёные начали создавать лекарства, которые бы могли вызывать апоптоз в раковых клетках.

1. В.Н. Пак и его группа (2000) разработали препарат, индуцирующий апоптоз в раковых клетках, и применили его для лечения пациентов, страдающих от рака. Они заставили раковые клетки покончить жизнь самоубийством. Ясно, что для запуска апоптоза надо вскрыть мембраны митохондрий в раковых клетках.

Ими создан препарат – «Редуцин», содержащий вещества, вскрывающие мембраны митохондрий. Средством доставки препарата в раковые клетки служит белок альфа-фетопротеин от человека, связывающийся только с раковыми клетками, так как на их поверхности имеется к нему эмбриональный белок-рецептор. Нормальные клетки таких рецепторов не имеют. Белок-транспортёр доставляет это лекарство точно по адресу – прямо в раковые клетки. С помощью эндоцитоза белок проникает в раковую клетку с веществом, и она приступает к самоубийству через митоптоз.

Препарат «Редуцин» учёные уже применили для лечения нескольких пациентов, страдающих от рака и относящихся к IV клинической группе, по их просьбе и с их информационного согласия. Результаты лечения врачи оценили как «очень хорошие».

2. Активация прокаспазы 3 в раковых клетках химическим соединением и включение апоптоза.

Выше была подчеркнута роль прокаспазы 3, которая превращается в активный фермент – каспазу 3. Она разрушает в клетке-мишени белки, ДНК, и клетка гибнет.

П. Хергенротен (Paul Hergenrother, 2006) в составе международной группы учёных из университета штата Иллинойс задались целью – создать «синтетическое соединение», которое бы активировало прокаспазу 3 для включения апоптоза в раковых клетках. Оказалось, что в раковой клетке разного типа имеется избыток прокаспазы 3, но апоптоз не вызывается.

Из многих тысяч соединений на способность активировать прокаспазу 3 найдено было лишь одно. Оно было названо РАС-1 – соединение, активирующее прокаспазу 3, и «запускало апоптоз» в раковых клетках.

Учёные оценили эффект РАС-1 на клетках рака прямой кишки, взятые у 23 пациентов. Содержание прокаспазы 3 в них было в восемь раз выше нормы, что усиливало действие препарата.

В других экспериментах на мышах, которым прививали клетки рака почек и лёгких человека, показана эффективность препарата РАС-1 и нарастание ее с ростом количества прокаспазы 3 в раковых клетках (цит. по: Д. Биелло, 2006).

«Потенциальная эффективность РАС-1 может быть оценена заранее в соответствии с содержанием прокаспазы 3 в раковых клетках и в соответствии с этим может быть назначено лечение», – заключает учёный.

### **8.3. Вирусы – естественное средство для уничтожения раковых клеток любого типа**

Для излечения от рака необходимо уничтожить все раковые клетки, где бы они ни оказались в организме пациента. Для этого нужен такой способ лечения, который позволяет решить две задачи: 1) разыскать раковые клетки среди нормальных клеток организма и 2) уничтожить каждую раковую клетку, и при этом не повредить здоровые, т.е. нормальные клетки.

Оказалось, что есть вирусы – «онколитические». Они способны распознавать и размножаться в раковых клетках, вызывая их гибель, а в нормальных – нет.

Что такое вирус, или вирусная частица – вирион? Самый простой вирус состоит из молекулы ДНК или РНК, окруженной оболочкой из белка. Оболочка, окружающая нуклеиновую кислоту, называется капсидом, а нуклеиновая кислота, покрытая этой оболочкой, – нуклеокапсидом.

Таким образом, вирус – это комплекс молекул и вне клетки абсолютно инертный, так как в нём не происходит никаких химических реакций. То есть это не живое существо. Это полный паразит клеток. У него есть только генетическая программа производства своих копий, т.е. дочерних вирусов, и он использует ресурсы «клетки-жертвы» для этого.

Вирусы делят на несколько групп в зависимости от вида нуклеиновой кислоты – РНК или ДНК; характера цепочки нуклеотидов – линейная, кольцевая, одинарная или двойная; строения капсида и др.

Гены вируса управляют синтезом своих ферментов для репликации вируса, а также белков – для сборки новых, т.е. дочерних вирусных частиц.

Жизненный цикл вируса – его размножение, начинается после проникновения вируса в живую клетку, т.е. после инфицирования её. Попав в клетку, вирус подчиняет её аппарат своим нуждам, «подменяя» ДНК клетки своей ДНК или РНК и этим заставляет клетку синтезировать вместо нужных ей веществ, свои части – нуклеиновую кислоту и белок. Затем эти части объединяются, образуя множество новых, т.е. дочерних вирусных частиц, которые, разрушив клетку, покидают её. По выходе из клетки они проникают в соседние клетки, и так вызывают различные инфекции.

На поверхности каждого типа клетки есть белки, присутствующие на любой клетке, а есть уникальные, характерные только для этого типа. Это белки-рецепторы.

На поверхности вируса определенного семейства имеется уникальный для него покровный белок. В «клетку-жертву» может проникать лишь тот вирус, который имеет покровный белок, комплементарный белку-рецептору этой клетки. В таком случае вирус своим покровным белком соединяется с рецептором. Происходит процесс эндоцитоза, и образуется везикула, окруженная мем-

браной клетки с вирусом внутри. Везикула втягивается в цитоплазму клетки, там разрушается и вирусная частица направляется к ядру клетки. Через пору ядра вирусная частица впрыскивает в него свою ДНК. Аппарат клетки переключается на синтез копий генома вируса и его белков; из этих частей происходит сборка новых, т.е. дочерних вирусов. Под напором множества новых вирусов клетка разрушается, вирусы высвобождаются в окружающую среду и заражают другие клетки, процесс повторяется.

На свойствах вируса – проникать в живую клетку и, размножаясь в ней, убивать её, основано уничтожение раковых клеток. Для проникновения вируса в раковые клетки учёным удалось генетически модифицировать его так, чтобы он разыскивал только раковые клетки, проникал в них, но не повреждал здоровые клетки.

Первое доказательство, что вирус может стать ценным инструментом для уничтожения раковых клеток, появились в 1912 г. Тогда один итальянский гинеколог сделал сообщение о регрессии рака шейки матки у женщины от вакцины из ослабленной формы вируса бешенства.

Позднее для уничтожения раковых клеток применили вирус, вызывающий у домашних птиц болезнь Ньюкасла.

Было замечено, что вирус более охотно инфицирует раковые клетки, чем нормальные.

Ещё позднее в литературе стали появляться сообщения о связи между вирусной инфекцией и наступлением ремиссии у больных раком.

В 1970-80-х гг. в нашей стране проф. М.К. Ворошилова пыталась разрушать раковые клетки с помощью вируса. Для этого она использовала препарат ЖЭВ – живой энтеровирусной вакцины в виде микстуры для перорального применения. Но результаты почему-то оказались «неопределёнными и метод в практике не закрепился».

В деталях способы использования вирусов для уничтожения раковых клеток начали разрабатываться в конце 1990-х гг. учёными из США – Ф. Маккормик (F. McCormik) и независимо от него Д. Хендерсон (D.R. Henderson).

Они использовали штамм аденовируса, который вызывает у человека острую респираторную инфекцию. Этот аденовирус имеет линейную двунитчатую ДНК. В отличие от ретровируса он не интегрирует свою ДНК в геном инфицированной клетки, а значит, не может трансформировать эту клетку в раковую. Его гены работают в клетке лишь ограниченное время.

Чтобы проникнуть в живую клетку – нормальную или раковую и успешно там размножиться, аденовирус должен преодолеть защиту – белок p53 гена wt53. Этот белок обнаруживает любые изменения в ДНК клетки, вызванные мутацией или проникновением вируса в клетку. Заметив изменение ДНК или вирус, белок p53 прекращает деление клетки или даже вызывает ее апоптоз, чтобы мутация или опасный вирус не распространились в ее потомках.

Аденовирус имеет гены, кодирующие белки E1B и E1A, обезвреживающие p53. Инфицировав клетку, вирус продуцирует эти белки, например, белок E1B, который «прилипает» к белку p53, инактивируя его. Этим он выключает ген wt53, поэтому апоптоз зараженной клетки не происходит, и вирус размножается.

Учёные разработали два способа уничтожения раковых клеток аденовирусами.

Первый способ. Аденовирус модифицируют так, чтобы он избирательно инфицировал и разрушал раковые клетки, не повреждая нормальные клетки.

У аденовируса на белковой оболочке имеется 12 выростов. Они обеспечивают связывание вируса с белком-рецептором на поверхности раковой клетки.

Штаммы аденовируса легче связываются с рецепторами нормальных клеток, чем раковых клеток. Поэтому целью учёных было создание аденовируса, который бы связывался только с раковыми клетками.

Для этого авторы используют адапторные молекулы, которые присоединяются к выростам на аденовирусе как «вилка к штепсельной розетке». Адапторной молекулой могут быть: моноклональное антитело, молекула фактора роста или соединения, которые избирательно связываются со специфическими

белками-рецепторами на поверхности раковых клеток. Такие аденовирусы инфицируют только раковые клетки, не затрагивая здоровые клетки.

Когда такой аденовирус распознает раковую клетку, он прикрепляется к ней и проникает в неё с помощью эндоцитоза. В ней он многократно реплицируется, что создает множество новых, т.е. дочерних вирусов. Клетка не выдерживает напора вирусов и разрушается, а вирусы выходят наружу и инфицируют другие раковые клетки (Рис.1).

Второй способ. В нем предусматривается создание аденовируса, который может проникать и в нормальные клетки, но его ДНК реплицируется только в раковой клетке. Для этого в геном аденовируса рядом с геном репликации вируса встраивают опухолеспецифический промотор. Промотор – это регуляторный участок гена, отвечающий за частоту включения гена. Для включения промотора в раковой клетке есть белки, а в нормальной клетке – нет.

Поэтому ген репликации вируса включается только в раковой клетке.

В результате в раковой клетке при размножении вируса образуется также множество дочерних вирусов. От этого раковая клетка разрушается на части, а вирусы попадают в окружающую среду. Теперь эти вирусы инфицируют другие раковые клетки, и таким же путём разрушают их. Нормальные клетки тоже инфицируются, но вирус в них не размножается «и не причиняет им вреда» (Рис.2).

#### Примеры использования вирусов для уничтожения раковых клеток

1. В половине клеток рака разного типа ген wt53 белка p53 имеет мутации или инактивирован. В такой клетке нет белка p53 или его функции нарушены, поэтому в ней подавлен апоптоз. В такой раковой клетке аденовирус будет размножаться, а значит разрушать её.

Учёным с помощью мутаций удалось создать штамм аденовируса Ade12, несущего делецию фрагмента гена белка E1B. Такой вирус не может реплицироваться в нормальных клетках, но активно реплицируется в p53-дефектных раковых клетках. Это выяснено в культуре нормальных и p53-дефектных раковых клетках пациента, воздействуя на них таким вирусом.



Аденовирус Ade12 является перспективным для проведения дальнейших исследований его онколитических свойств. Планируется изучение его свойств при введении в раковую опухоль на бестимусных мышах, которым привиты такие клетки от пациента.

2. Более подробно об использовании штамма аденовируса, лишённого гена белка E1B, для этой цели дано в работе акад. Г.П. Георгиева с соавторами (2003) при анализе ими данных Zahng J.Y.

В p53-дефектных раковых клетках аденовирус может размножаться, не синтезируя белок E1B, – блокатор апоптоза. Для проверки этого учёные создали штамм аденовируса, у которого был удалён ген белка E1B. Такой вирус не мог размножаться в нормальной клетке, но размножался в клетках, в которых мутирован или инактивирован ген p53. В опытах на мышах с привитыми клетками рака введение такого аденовируса привело к уничтожению раковых клеток. В настоящее время начаты испытания этого метода на пациентах, первые результаты «обнадёживающие».

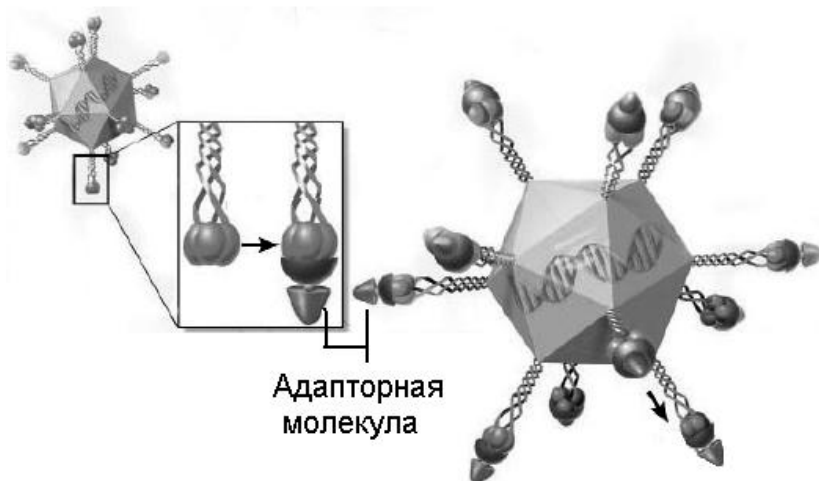


Рис. 1. К выросту на белковой оболочке аденовируса присоединяется адапторная молекула (рис. и цит. по: Д. Неттелбек и Д. Карел, 2004).

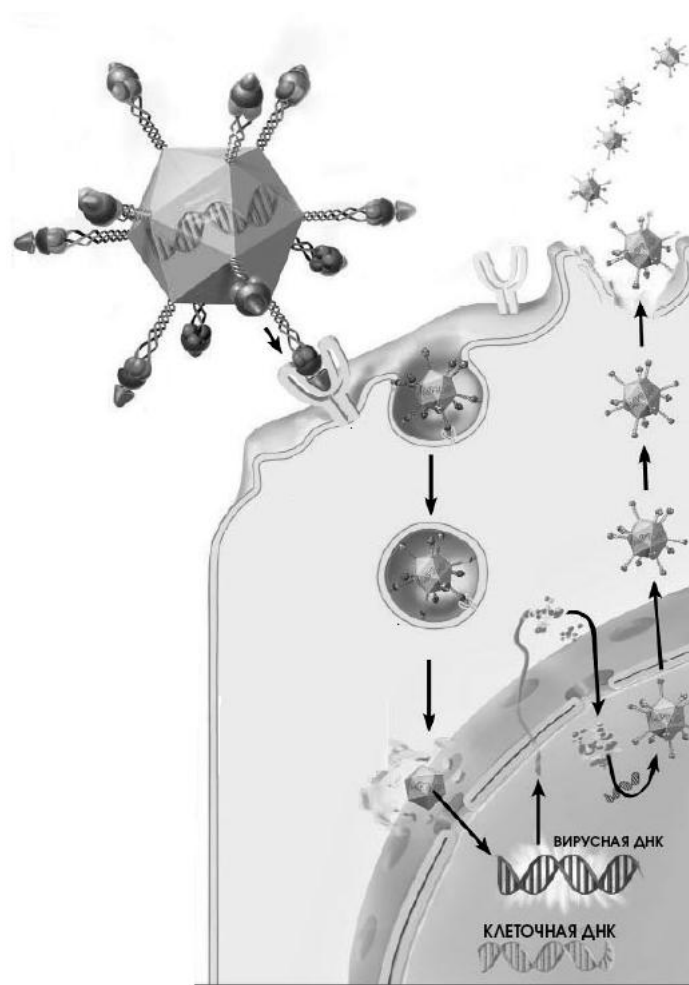


Рис. 2. С помощью адапторной молекулы аденовирус связывается с рецептором на поверхности раковой клетки (рис. и цит. по: Д. Неттелбек и Д. Карел, 2004).

3. Ф. Маккормик (F. McCormik) и его группа (США) получили штамм аденовируса – «ONYX-015» без генов белков E1B и E1A. Такие дефектные вирусы могут проникать только в раковые p53-дефектные клетки. Они способны проникать в раковые клетки и «взрывать» их изнутри, как это обычно делают вирусы.

Этот вирус уже испытан на пациентах. Из 19 пациентов, страдающих от рака в области головы и шеи, получивших небольшие дозы этого аденовируса, у 6 – опухоли уменьшились вдвое и даже больше, у 5 – перестали расти. Аденовирус пациентам вводился в опухоль, а также через кровь.

Д-р Д. Сце применил этот вирус для лечения пациентов при других локализациях рака. Он также отметил явное уменьшение опухолей в размерах. Но главное, считает учёный, заключается в другом. Анализы крови показали либо

значительное уменьшение количества белков-маркеров, выделяемых раковыми клетками, либо их полное отсутствие. «Это показывает, – сказал доктор Д. Сце, – что хотя опухоли и видны на экране компьютерного томографа, их клетки либо умирают, либо уже мертвы».

4. В США для уничтожения раковых клеток используется также вирус ONYX-411. Его действие также основано на особенностях раковой клетки: у многих типов раковой клетки пациентов подавлен синтез белка pRb, ответственного за апоптоз. Вирус ONYX-411 «атакует раковые клетки, не воздействуя на здоровые клетки», т.е. не причиняя вреда.

Учёные убедились в условиях *in vitro* в разрушительном действии вируса на раковые клетки. Как полагают, он «очень эффективен при лечении рака молочной железы, простаты, головного мозга и шеи». Исследователи в дальнейшем будут проводить дополнительные тесты. «Если все подтвердится, и ONYX-411 действительно окажется безопасным для человека, то, вероятнее всего, в недалеком будущем стоит ожидать внедрения нового терапевтического метода. Это будет фактически революция, поскольку можно будет отказаться от лучевой и химиотерапии, которые наносят вред организму, в пользу более безопасного способа». (Источник: Утро.ру, 2000.)

5. Американские учёные решили уничтожать раковые клетки генетически-измененным вирусом СПИДа.

И. Чен (I. Chen) и его коллеги из университета Калифорнии в Лос-Анджелесе (2005) сумели генетически изменить вирус иммунодефицита человека и «научили» его уничтожать раковые клетки. За счёт отсутствия частей, вызывающих заболевание, вирус стал безопасным для организма.

Чтобы сделать вирус безвредным, учёные лишили его внешней оболочки, а сердцевину ВИЧ они поместили в «конверт» или «одежку» от другого вируса, называемого sindbis. Если настоящий ВИЧ ищет в организме клетки иммунной системы, то видоизмененный распознает раковые клетки.

Исследователи запрограммировали вирусный пакет так, чтобы он «напал» на определенный белок на поверхности раковой клетки – на p-

гликопротеин, который мешает обычным лекарствам, используемым в противораковой терапии, взаимодействовать с клеткой: выбрасывает лекарство из клетки наружу в процессе лечения.

Учёные смогли настроить свою систему так, чтобы она нацелилась на любой заданный белок, расположенный на поверхности клетки. И. Чен и его коллеги продемонстрировали успешную «наводку» приблизительно на дюжину различных молекул.

«Люди могли бы спросить, не страшно ли использовать ВИЧ как терапию, – рассказывает мистер И. Чен. – Но в действительности мы полностью удалили 80% вируса. Так что теперь он – только курьер».

Учёные рассматривают возможность использовать его для лечения от рака. Для этого необходимо ввести в вирус ген, который заставит его убивать раковые клетки. При этом вирус будет служить носителем для нужного гена – именно отсутствие такого носителя тормозит в настоящее время генотерапию рака. В вирус можно ввести, например, «ген смерти» – bax. Учёные также вставили флуоресцентный белок светлячка в свой сконструированный вирус, чтобы отследить его продвижение и убедиться, что он взаимодействует именно с раковыми клетками.

Как показали опыты с мышами, больными меланомой, – рак кожи, клетки которого дали метастазы в легкие, модифицированный ВИЧ передвигался по кровеносным сосудам в лёгкие, где внедрялся в клетки рака. По словам д-ра Дж. Вокса (Dj. Vassaux) из Британского института исследования рака, впервые найден потенциальный носитель для гена, который доставил бы его прямо к цели – раковым клеткам.

И. Чен намерен провести «ещё много проверок нового метода генотерапии, прежде чем перейти к испытаниями на людях». (По материалам: Membrana.ru.)

Как видно, для уничтожения раковых клеток учёные разных стран используют различные вирусы, генетически модифицируя их. Это понятно, так как распространение раковых клеток в окружающие здоровые ткани, так и в

различные органы очень сходно с распространением бактерий при бактериальных инфекциях, а так же вирусов путем включения в них определенных генов. Отсюда и вытекает антимикробный принцип уничтожения раковых клеток у любого пациента. Одним из таких методов является вирусотерапия.

Использование генетически модифицированных вирусов для уничтожения раковых клеток любого типа – это новое средство лечения рака. Такие вирусы, в отличие, от лекарств стандартной химиотерапии сами отыскивают каждую раковую клетку в организме пациента, и избирательно уничтожают все раковые клетки, не повреждая здоровых клеток.

Внедрившись в одну раковую клетку, вирус превращает её в «фабрику» по производству таких же вирусов. Затем, как пишет Д. Кирн (D. Kirn, 2002), «дети» этих вирусов атакуют новые раковые клетки, и в итоге все раковые клетки уничтожаются.

Мишенью для вируса является сама раковая клетка и не имеет значения, какие генетические причины вызвали её образование из нормальной клетки. Такой метод уничтожения раковых клеток с помощью вируса может стать панацеей для излечения от рака любого типа раковой клетки.

Но безопасны ли «вирусы-лекарства» для уничтожения раковых клеток?

Часто в качестве «лекарств» для уничтожения раковых клеток используют модифицированные аденовирусы. У многих пациентов – участников испытаний, вирусная инфекция не вызывала никаких побочных эффектов. Но организм пациента может быть инфицированным природным аденовирусом. В таком случае в организме пациента могут быть антитела к аденовирусу, например.

Учёные продолжают поиск безопасных форм аденовирусов. В странах, где уже используются модифицированные вирусы для лечения рака, проводится тщательное тестирование всех пациентов до и после инфузии вируса. Это необходимо, чтобы вовремя выявить патологическую реакцию. Так что опасения такого рода есть, несмотря на все преимущества уничтожения раковых клеток вирусами.

Разработка новых естественных средств уничтожения клеток рака на основе генетически модифицированных вирусов будет продолжаться (Д. Неттелбек, Д. Карел, 2004).

6. Новый метод уничтожения раковых клеток объединяет вирусы с клетками иммунной системы (S.H. Thorne et al., 2006).

Авторы пишут, что «проблема излечения от рака стара как мир, но до сих пор неразрешена». Причина в том, что «раковые клетки мало, чем отличаются от нормальных клеток того же типа».

Из этого и недостаток современных методов лечения рака – отсутствие их селективности. Лучевое и лекарственное лечение убивает не только раковые, но и нормальные клетки тканей и органов, что приводит к серьёзным побочным эффектам. «Наши шансы на успех в лечении рака могут быть повышены, если мы будем селективно убивать клетки рака».

Одним из методов может быть – «обучение» клеток иммунной системы распознавать «специфические антигены на поверхности раковых клеток». Однако, только некоторые типы раковых клеток «способны синтезировать подобные антигены и в очень небольших количествах». Это значительно усложняет их распознавание клетками иммунной системы.

В таких случаях можно использовать вирусы с повышенной специфичностью к раковым клеткам – онколитические вирусы. Они способны распознавать и разрушать раковые клетки (лизис – от греч. lysis «разложение, распад») и могут быть выделены из природных источников. Их умение распознавать конкретную мишень можно повысить методами генной инженерии.

Наша иммунная система не способна отличить полезный вирус от вредного и препятствует использованию таких вирусных векторов в качестве средств лечения.

Вирусный вектор – это вирус, модифицированный генно-инженерным методом так, что он либо синтезирует или не синтезирует определённый белок.

После внутривенного введения вирусов в организм только малая часть их достигает раковых клеток-мишеней, а большинство вирусов блокируется клетками иммунной системы и антителами.

Многие вирусы будут прикреплены к клеткам крови и эндотелию сосудов, часть удалена из крови или нейтрализована иммунной системой, только малая часть вирусов достигнет клеток-мишеней, но «не сможет прикрепиться и заразить раковые клетки» (Рис. 3).

Эффект внутривенного введения онколитического вируса можно значительно усилить, если вирусы «спрятать внутри клеток иммунной системы (СИК)». Такие клетки не будут заблокированы иммунной системой или удалены из крови. При этом лимфоциты, несущие вирус, «способны узнавать, специфически прикрепляться и лизировать клетки ракового эндотелия, этим облегчая проникновение онколитического вируса внутрь опухоли» (Рис.4).

Проф. Стиве Торн (S.H. Thorne, 2006) и соавторы пишут, что защитные противовирусные барьеры иммунной системы ими были преодолены, используя собственные Т-лимфоциты для доставки вируса к раковым клеткам. Предварительно они заражали эти лимфоциты вирусом вакцинии. Этот вирус из группы поксивирусов и обладает онколитическими свойствами.

Т-лимфоциты способны уничтожать раковые клетки, узнавая на их поверхности специфические молекулы – лиганды стресса. Лиганды стресса – это молекулы, которые располагаются на поверхности клеток, подвергшихся стрессу – повышенная температура или воспаление, но их также обнаруживают на поверхности раковых клеток разного типа. Лиганды стресса на раковых клетках обнаруживаются чаще, чем «раковые антигены».

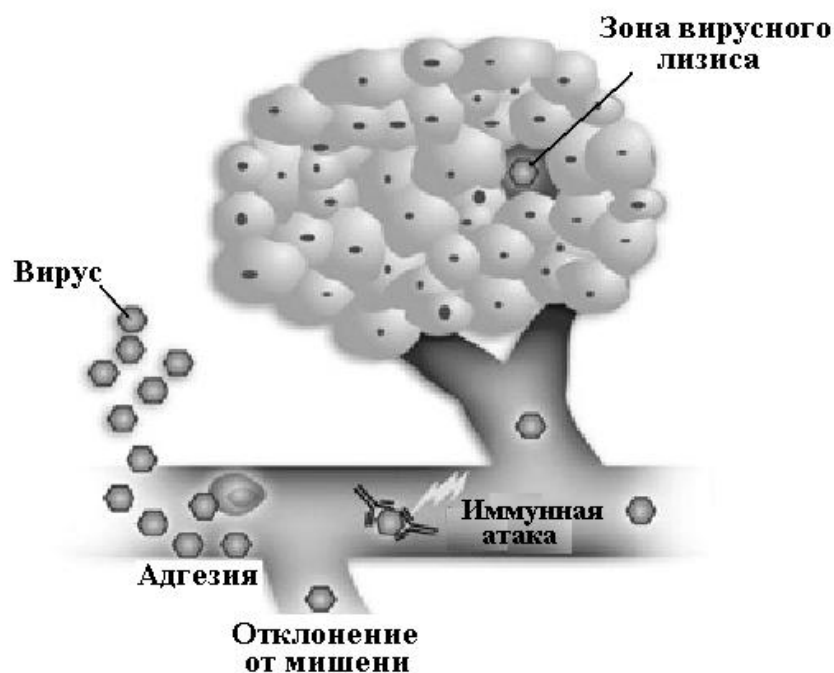


Рис. 3. Барьеры для онколитического вируса после введения его в организм внутривенно (рис. и цит. по: S.H. Thorne et al., 2006).

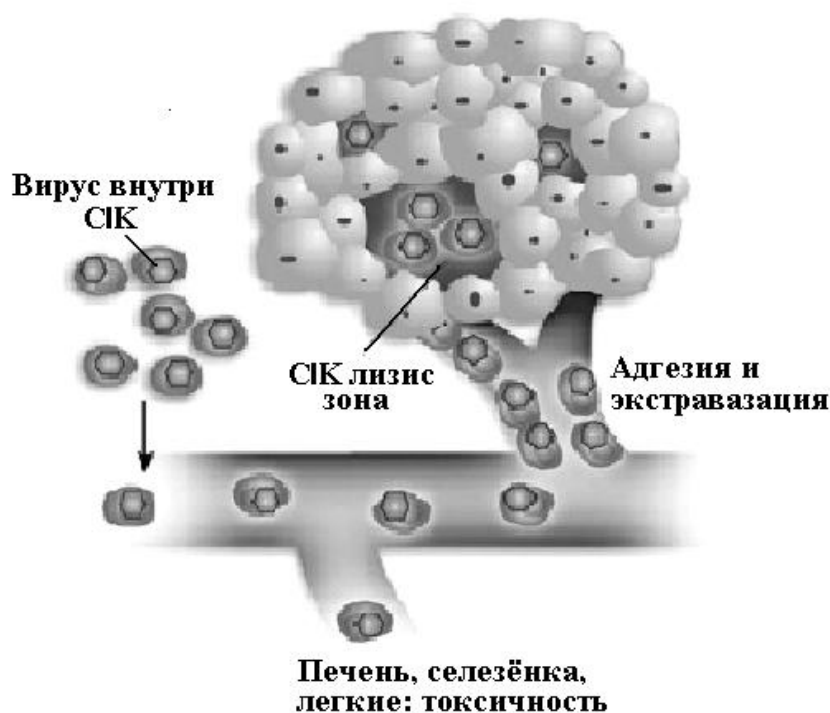


Рис. 4. Преодоление барьеров, если вирусы спрятаны внутри клеток иммунной системы (рис. и цит. по: S.H. Thorne et al., 2006).

Использование Т-лимфоцитов связано ещё с тем, что их можно легко размножать в питательной среде с добавлением специальных антител и факторов роста – цитокинов и «загружать» вирусом вакцинии.



В экспериментах на мышах, больных раком, авторы продемонстрировали:

- 1) в течение 48 часов после внутривенного введения лимфоцитов с вирусом, большинство вирусов локализуется «в районе раковой опухоли»;
- 2) у 75% подопытных животных единственной внутривенной инъекции было «достаточно для полного регресса раковых опухолей»;
- 3) введение только вируса или только лимфоцитов увеличивало срок жизни контрольных мышей, но не вылечивало их от рака.

Применение этого метода в клинической практике потребует множество инъекций. Не ясно, «как иммунная система человека будет реагировать на многократные введения лимфоцитов и вируса, и каковы возможные побочные эффекты». Это вопросы, на которые учёным ещё необходимо ответить.

#### **8.4. Стволовые клетки – естественное средство поиска и уничтожения раковых клеток**

При раке его клетки способны проникать в окружающие здоровые ткани и распространяться по различным органам, где создают новые очаги рака – метастазы.

Если рак возникает из одной раковой стволовой клетки, то излечение его немислимо без уничтожения всех его раковых стволовых клеток- потомков в организме пациента.

Для уничтожения каждой раковой клетки прежде требуется её найти среди множества нормальных клеток тканей, да ещё разного типа клеток. Ясно, что это сделать чрезвычайно трудно, так как организм взрослого человека состоит из  $5 \cdot 10^{13-14}$  клеток.

Но оставление даже одной раковой стволовой клетки где-то в организме пациента после лечения любыми методами приведёт к раку в этом месте.

Лечением рака медики занимаются уже все века, так как рак, как болезнь, возникла с появлением человека.

Только теперь выяснено, что раковая клетка – это эпигенетически изменённая стволовая клетка ткани или нормальная клетка ткани, ставшая прежде стволовой. А это открыло новые возможности для поиска и уничтожения раковых клеток у пациента.

Любая травма или болезнь – не что иное, как повреждение клетки или клеток вплоть до их гибели. Для того чтобы ткань выполняла свои функции в организме, её погибшие или дефектные клетки должны быть заменены новыми клетками. Но это под силу только стволовым клеткам. Не зря эволюция создала «вкрапления» стволовых клеток в тканях органов и склад «запчастей» в виде стволовых клеток в костном мозге, – гемопоэтические и стромальные или мезенхимальные клетки. Основная функция стволовых клеток – замещать погибшие клетки в тканях организма на молодые клетки.

Стволовые клетки в тканях взрослого организма называются региональными клетками. Они используются для замены погибших клеток только в данном месте и для данного типа ткани. Стромальные же клетки костного мозга предназначены для замещения погибших клеток ткани в любом месте организма.

Общее свойство к миграции раковых и стволовых клеток давно вызывало интерес у многих учёных.

Известно, что пока в ткани нет повреждения, стволовые клетки находятся в состоянии покоя. Но как только в какой-то ткани возникает повреждение, им поступает химический сигнал, и они мигрируют в место повреждения. Они способны найти любое повреждение и на месте его дифференцируются в клетки того типа, что погибли, и замещают их.

Способность клеток к миграции в «нужное» место – в свою стволовую «нишу» или место повреждения обозначается термином «хоуминг» (от англ. home – дом). Он обусловлен химическими сигналами, исходящими из «нужного» места, воспринимаемыми клетками, имеющими рецепторы к ним и способностью клеток к хемотаксису.

Р. Ланца и Н. Розенталь (2004) в опытах на мышах обнаружили, что от повреждённой клетки поступает химический сигнал стволовой клетке, направляющий её к месту повреждения. Сигналом оказался белок – инсулиноподобный фактор роста (IGF-1). Это молекула-лиганд, к ней на поверхности стволовой клетки имеется рецептор. Стволовая клетка по такому сигналу способна мигрировать и находить повреждённую клетку в тканях.

Оказалось, что в раковой клетке также включается ген белка IGF-1, его воспринимают стволовые клетки, что заставляет их мигрировать и находить раковые клетки в тканях различных органов.

В настоящее время открыт ещё фактор SDF-1 – stromal-derived factor, и изучается его роль в хоуминге гемопоэтических стволовых клеток. Он продуцируется стромальными клетками костного мозга и «удерживает» эти клетки в своей стволовой нише. В последнее время SDF-1 активно изучается как фактор хоуминга и миграции раковых клеток в процессе метастазирования.

Фактор IGF-1 и SDF-1 действуют как маяки, вызывающие стволовые клетки для замены в ткани погибших или умирающих клеток. Если раковая клетка вызывает на себя миграцию стволовой клетки, значит для неё она дефектная клетка.

Но раковая клетка – это клетка-организм из стволовой клетки. Изменения в её геноме делают её более жизнеспособной, чем любая нормальная клетка ткани.

Открытие факторов хоуминга стволовых клеток к раковой клетке впервые открывает естественный, а поэтому может быть идеальный, путь для преодоления сразу двух основных проблем в онкологии: поиск каждой раковой клетки в организме пациента и уничтожение всех раковых клеток. Именно без решения этих проблем рак до сих пор остается смертельной болезнью, за исключением редких случаев.

Каждая из двух проблем может быть решена с помощью самих стволовых клеток:

- первая проблема: поиск в организме разрозненных раковых стволовых клеток; их способны находить сами стволовые клетки на основе молекулярного механизма – IGF-1 на раковой клетке, а рецептор к нему на стволовой клетке; то же касается и CDF-1, рецептор его – CXCL4 имеется на раковой клетке;

- вторая проблема: уничтожение всех раковых стволовых клеток в организме пациента стволовыми клетками; для этого требуется ввести в генотип стволовой клетки специальный ген – ген белка «Tag7» или гены других цитокинов – IL12, фактора некроза опухоли. Продукты этих генов, т.е. белки, будут передаваться стволовыми клетками раковым клеткам, вызывать иммунный ответ организма и уничтожать их.

К настоящему времени учёными разработан ряд методов поиска и уничтожения раковых клеток в опытах на лабораторных животных.

1. И. Снайдер и его группа (2000) из Бостона (США) произвели опыты на мышах, которым были привиты раковые клетки глиомы от человека в ткань мозга. Для лечения они взяли стволовые нервные клетки, инъецировали их в разные места мозга, «затронутые или незатронутые» раковыми клетками. Было обнаружено, что стволовые нервные клетки мигрировали в область глиомы.

У учёных возник вопрос, не притягиваются ли они к местам, поражённым раковыми клетками. Опыты показали, что «именно так дело и обстоит». Через несколько дней стволовые клетки мигрировали сквозь здоровые ткани, и даже те стволовые нервные клетки, которые вводились в хвост.

В случае, когда стволовые клетки инъецировали в центр глиомы, «то они наоборот начинали перемещаться к краю опухоли, где обычно останавливались и закреплялись». Более того, они преследовали также раковые клетки, отделившиеся от первичной глиомы. Учёные сделали вывод, что свойство стволовых клеток можно использовать для прицельной доставки в раковые клетки лекарств или специальных генов, которые могли бы уничтожать раковые клетки.

Для этой цели можно вводить в стволовую клетку ген смерти, например, ген *bax* или ген какого-либо токсичного белка.

И. Снайдер и его группа признаются, что «результаты опытов превзошли все наши ожидания, – стволовые нервные клетки буквально оседлали раковые клетки и гнались за ними с другого полушария мозга»

2. Джон Ю (John Yu, 2003) и его группа из медицинского центра в Лос-Анджелесе провела лечение рака мозга – глиомы в опытах на мышах.

Стандартное лечение глиом включает в себя – хирургическое удаление опухоли с последующей лучевой терапией или химиотерапией. Но как при любом раке, группы клеток и отдельные раковые клетки «практически всегда распространяются по незаражённой области мозга, создавая очаги новых опухолей». По статистике, в среднем, после установления диагноза и лечения стандартными методами, пациенту остаётся жить не больше года.

Клетки глиомы подавляют местную иммунную активность. Поэтому учёные забирали стволовые нервные клетки у эмбрионов мышей и модифицировали их, – в них вводили ген интерлейкина-12. Такие клетки начинают синтезировать и секретировать стимулирующее иммунную систему вещество, способствующее уничтожению раковых клеток. При этом клетки глиомы становятся более доступными для воздействия CD4 В-лимфоцитов и CD8 Т-лимфоцитов, которые уничтожают все чужеродное в организме.

Мышам заранее в область головного мозга привили клетки глиомы, из них возникла опухоль мозга. Лечение проводилось путём впрыскивания стволовых нервных клеток прямо в опухоль. Мыши с опухолью, которым вводили препарат, прожили гораздо дольше, чем мыши контрольной группы. У одной трети опытных мышей даже развился длительный иммунитет к глиоме.

Из работ по применению стволовых нервных клеток учёные знали, что такие клетки способны распознавать мигрирующие раковые клетки. Однако, было не ясно, как они это делают.

Группа Дж. Ю обнаружила инъецированные стволовые клетки, как в самой опухоли, так и в мелких очагах, рассеянных по всему мозгу подопытных мышей. Для объяснения этого, учёные ввели стволовые клетки в противоположное от опухоли место мозга и обнаружили, что они мигрировали в область

глиомы. Этим учёные доказали, что раковые клетки подают сигнал стволовым клеткам и привлекают их на себя.

Через 3 мес. после первого опыта, выжившим мышам учёные пересадили дополнительно свежие раковые клетки. Спустя 120 дней все мыши, перенёсшие первую операцию для инъекции модифицированных нервных стволовых клеток, остались живы. Это указывает на развившийся у них длительный иммунитет. Контрольная же группа мышей вся погибла через 30 дней.

По мнению авторов, результаты лечения глиомы мозга у животных «оправдывают надежды на успешное лечение таким методом пациентов, страдающих от этой опухоли».

В заключение учёные отметили, что результаты опытов «расширяют границы возможностей применения такого рода лечения для доставки разнообразных протеинов в клетки опухоли», и «они счастливы, что их работы с мышами способны возглавить новое лечение для людей с глиомами».

3. Проф. М. Андреефф и его группа (2004) из Центра рака Техасского университета в Хьюстоне заявили, что стволовые клетки, кроме того, что являются средством для регенерации повреждённых клеток, могут также уничтожать раковые клетки. Опыты на мышах показали, что стволовые клетки могут нести протеины, смертельные для раковых клеток, – они уничтожают их, оставляя при этом здоровые клетки нетронутыми.

Он и его группа впервые применили мезенхимальные стволовые клетки в качестве носителя иммунного белка – альфа-интерферона. Опытным мышам были привиты раковые клетки разного типа от опухолей человека. В мезенхимальные стволовые клетки в культуре, они ввели ген белка альфа-интерферона, помогающего иммунной системе уничтожать раковые клетки. Эти клетки ввели в кровеносное русло мышей с опухолями.

Инъекции этого препарата сильно замедляли рост опухолей: нескольких видов лейкозов, меланомы кожи и их метастазы в тканях лёгких, эффективно воздействовали на рак лёгких и рак молочной железы; процент излечения от рака яичников составил 70%.

По словам проф. М. Андрееффа, самое важное открытие состоит в том, что генетически изменённые мезенхимальные стволовые клетки могут мигрировать к раковым опухолям и продуцировать там противоопухолевые агенты, в частности, альфа-интерферон.

Оказалось, что раковые клетки, как и повреждённые клетки, посылают сигнал, привлекающий стволовые клетки. Только на повреждённые клетки они воздействуют, замещая поврежденные клетки нормальными клетками, а опухоль только укрепляют соединительной тканью.

Теперь, считают учёные, способность мезенхимальных стволовых клеток «можно использовать с пользой». Разработки специфических средств доставки лекарственных препаратов в «очаг болезни», в частности рак, ведутся давно.

Выбор мезенхимальных стволовых клеток в качестве средства доставки лечебного компонента – «идеальный, как для лечения первичного рака, так и метастазов из его клеток». Эффект наблюдается тогда, когда стволовые клетки интегрируются в микросреду раковой опухоли. Важность открытия в том, что мезенхимальные клетки оказались способными целенаправленно перемещаться из костного мозга или крови в опухоль и производить противораковые агенты «только локально там, где находятся опухоли или клетки метастазов», – заявил проф. М. Андреефф.

Учёный А. Кривонос, отметил, что «до него не была описана способность стволовых клеток находить раковые клетки, перемещаться к ним и встраиваться в саму опухоль или в её микроокружение. Именно эту способность стволовых клеток и использовал проф. М. Андреефф».

С помощью генной инженерии мезенхимальные стволовые клетки были превращены в «самонаводящиеся боеголовки», синтезирующие «боевое отравляющее вещество» для раковых клеток.

Учёные считают, что в случае подтверждения результатов исследования в дополнительных опытах, такой подход может стать основой перспективного метода лечения не только рака, но и других болезней.

Обнаруженное свойство стволовых клеток – интенсивная их миграция к раковым клеткам и их распознавание, можно использовать для прицельной доставки к ним лекарственных препаратов, а также специальных генов, которые могут через свой продукт – белки, уничтожать раковые клетки.

«В перспективе развитие технологии с использованием стволовых клеток позволит коренным образом пересмотреть привычные сегодня методы лечения рака», – считают учёные.

Принцип излечения от рака: «найди и уничтожь» все раковые стволовые клетки в организме, – необходимое условие для излечения от рака, идеальным средством для этого могут стать стволовые клетки.



## **Глава 9. Иммунная система защищает внутреннюю среду организма от экзогенных и эндогенных антигенов**

### **9.1. Как Т-лимфоциты узнают антигены на раковых клетках и уничтожают их носителей**

Организм человека постоянно уничтожает различные агенты: извне – бактерии и вирусы, а внутри организма – возникающие раковые клетки.

Главной защитой от этих агентов является иммунная система. Она незримо и неощутимо для нас осуществляет этот процесс. Но иммунная система в эволюции организма создана не для уничтожения самих по себе этих агентов, а для защиты внутренней среды организма от антигенов этих агентов.

Но так как эти антигены несут на себе бактерии и вирус, а также раковая клетка, то, уничтожая антигены, иммунная система уничтожает и их носителей. Именно она способна делать это избирательно: в норме она действует только на поражённые клетки, в том числе раковые, не затрагивая здоровые клетки.

Антиген – это чужеродное вещество или любая макромолекула, способная вызывать в организме иммунный ответ. Среди макромолекул антигеном обычно является белок (В. Эллиот, Д. Эллиот, 2000).

Часто пишут, что иммунная система защищает организм от всего «чужого» или «чужеродного». Это подчёркнуто и в определении антигена. Но что все же считать «чужим», то есть тогда и «не своим», в работах многих авторов, ответа нет.

В клетке любой белок и другие вещества – это продукты экспрессии нормальных генов. Новый белок или изменившееся вещество в клетке из-за мутаций в их гене или генах должно считаться «чужим» или «чужеродным», так как эти вещества не закодированы в геноме нормальной клетки.

Нормальная клетка ткани превращается в раковую клетку за счёт дерепрессии эмбриональных генов и одновременно мутаций и/или эпимутаций в ней генов-супрессоров.

В первом случае клетка превращается в раковую за счёт синтеза в ней эмбриональных белков, но нормальной структуры. Во втором случае – отсутствие

белка или изменения его структуры генов-супрессоров не останавливает канцерогенез.

Какой бы белок в раковой клетке учёные не обнаружили, он обычно эмбриональный. Это приводит к появлению эмбриональных рецепторов на мембране клетки, а в сыворотке крови от пациента – эмбриональных белков, в норме присутствующих только в тканях эмбрионов.

Любой эмбриональный белок на раковой клетке – это её белок-маркер, так как в нормальной соматической клетке во взрослом организме его синтеза нет.

Причины отсутствия иммунного ответа на раковую клетку до конца не изучены. Главными из них могут быть:

- раковая клетка образуется из клетки своего организма и потому не обладает достаточной степенью «чужеродности», в отличие от пришельцев извне, например, микробов и вирусов;

- раковая клетка не содержит белков, которые бы были не закодированы в геноме организма-хозяина.

Из этого важное следствие: для вызова ответа иммунной системы пациента на раковые клетки эти клетки прежде нужно сделать для неё «чужими». Для этого в раковые клетки необходимо трансфецировать ген «чужеродного» для неё белка.

Основными защитниками иммунной системы являются лимфоциты. Эти клетки способны узнавать белки-антигены, т.е. чужеродные вещества. За узнаванием антигена следует иммунный ответ.

В узнавании специфичных антигенов участвуют два класса лимфоцитов: Т-клетки и В-клетки. И те, и другие происходят из стволовых клеток костного мозга. В-лимфоциты созревали и созревают в нём у взрослого организма, а Т-лимфоциты созревали в тимусе.

Иммунный ответ приводится в действие реакцией связывания антигена с рецепторной молекулой на мембране В-клетки или Т-клетки, запрограммиро-

ванной отвечать на данный антиген; так носитель антигена распознается как чужеродный агент.

В результате связывания антигена с рецептором клеток эти клетки размножаются, образуя клоны, и выполняют свои функции:

- В-лимфоциты созревают и секретируют антитела;
- цитотоксические Т-лимфоциты разрушают клетки-носители антигена;
- Т-лимфоциты хелперы производят вещества, мобилизующие другие клетки.

После связывания Т-лимфоцитами антигена, они секретируют фактор роста – интерлейкин-2, а на их поверхности образуются его рецепторы. Связывание интерлейкина-2 с рецептором служит сигналом к делению клетки. В результате возникают дочерние Т-лимфоциты, реагирующие на тот же антиген.

Для понимания действия интерлейкина-2, вызывающего пролиферацию Т-лимфоцитов, важно было знать структуру интерлейкина-2 и его рецептора. В 1983 г. Т. Танигути с соавторами выделили ген интерлейкина-2, затем был открыт ген белка-рецептора интерлейкина-2. Это позволило определить роль механизма интерлейкина-2 – рецептор в иммунном ответе.

Было показано, что после активации антигеном для регуляции пролиферации Т-лимфоцитов важны: концентрация интерлейкина-2, количество рецепторов на поверхности Т-лимфоцита и продолжительность взаимодействия между интерлейкином-2 и рецептором.

В организме человека множество различных антигенов и Т-лимфоцитов с различными рецепторами (TCR – от англ. T cell receptor), каждый из которых специфичен своему антигену. С момента связывания антигена его носитель, т.е. раковая клетка, распознается как чужеродный агент.

Распознать антиген на раковой клетке Т-лимфоцит в одиночку не способен: он как бы слеп. В распознавании антигена Т-лимфоцитом участвуют другие клетки – презентрующие или представляющие клетки. Т-лимфоцит отвечает на антиген, только когда он ему этой клеткой и на её поверхности представлен (K. Kafiq et al., 2002).

Далее мы приводим определения терминов для понимания процесса распознавания и молекулярные причины уничтожения раковых клеток.

1. Антигенпрезентирующая или антигенпредставляющая клетка (АПК) с помощью рецептора захватывает антиген, расщепляет его до пептидных фрагментов, которые внутри клетки встраиваются в молекулы МНС<sup>1</sup> I или II класса и выставляются на поверхность этой клетки. Самой активной АПК для лимфоцитов является дендритная клетка, значительно слабее другие клетки – В-лимфоциты, макрофаги.

Антигены по происхождению могут быть экзогенные, а другие эндогенные, что определяет два разных пути процессинга антигена. Для экзогенного антигена, находящегося во внеклеточной среде, например, антиген бактерий или паразитов, АПК является макрофаг или В-лимфоцит. Белки-антигены эндогенного генеза заражённой вирусом клетки или раковой клетки, синтезированные внутри их самих, не нуждаются в специализированной АПК. Они подвергаются процессингу внутри самих этих клеток и появляются на их поверхности в сочетании с белками МНС класса I. Их распознают цитотоксические Т-лимфоциты.

2. Процессинг антигена. Для распознавания Т-клеткой антиген подвергается расщеплению, т.е. процессингу. Антиген-белок расщепляется в АПК на короткие фрагменты – пептиды, длиной не более 10-20 аминокислот. В результате детерминантная часть молекулы антигена, т.е. эпитоп, представляет небольшой фрагмент. Именно он определяет специфичность антигена и располагается на поверхности молекулы и представляется Т-клетке. Оба пути процессинга антигенов – экзогенных и эндогенных, ведут к Т-клеточному ответу. Белок-антиген раковой клетки процессируется в ней самой, это приведет к уничтожению этой клетки цитотоксическими Т-киллерами. Белок-антиген бактериальной клетки подвергается процессингу в В-клетке или в макрофаге. Это по-

---

<sup>1</sup> МНС является гликопротеинами главного комплекса гистосовместимости – англ. maior histocompatibility complex, у человека это HLA

требует помощь от хелперных Т-лимфоцитов, которые помогают в синтезе антител против инфекции.

3. МНС – молекула белка – продукт гена иммунного ответа IR (от англ. *immune response* – иммунный ответ). Процессированный антиген появляется на поверхности вместе с белками МНС самой клетки. Белки МНС по роли в стимуляции Т-клеток разделяют на два класса.

Белки класса I имеются почти на всех клетках, имеющих ядро, в том числе на раковой клетке любого типа клетки. Они участвуют в представлении антиген-пептида цитотоксическим Т-лимфоцитам. Белки класса II присутствуют в основном на дендритной клетке, меньше их на макрофаге и В-лимфоците. Они участвуют в представлении антиген-пептида хелперным Т-лимфоцитам. Истинная роль белков МНС – в направлении атаки Т-клеток на антиген. Т-клетки узнают одновременно антиген в комплексе с белком МНС на поверхности одной клетки с помощью одной молекулы-рецептора. В молекуле антигена имеется два участка: агретоп – для распознавания молекулами МНС, и эпитоп – для распознавания Т-клеточными рецепторами (TCR). Необходимость двойного распознавания называется МНС-рестрикцией, т.е. ограничением. Цитотоксические Т-клетки реагируют на антиген вместе с белками МНС класса I, а Т-хелперам нужны белки МНС класса II.

Что даёт для организма МНС-ограничение? В результате этого явления активность Т-клеток направляется на клетки своего собственного организма, где они и должны действовать на раковые клетки, а не, например, на бактерии или свободные антигены.

Потеря способности к экспрессии молекул МНС на поверхности клетки может быть одной из причин возникновения раковой клетки.

4. Презентация или представление белка-пептида. В 1974 г. Р. Цинкернагель и П. Догерти сделали открытие: для возникновения ответа на антиген Т-клетки должны узнать два элемента: антиген и «свой» белок МНС, характерный для собственных клеток данного организма. Другими словами, «чужое» узнаёт-

ся в связи со «своим», т.е. белок-пептид в комплексе с молекулами МНС I или II класса своего организма (Рис. 1).

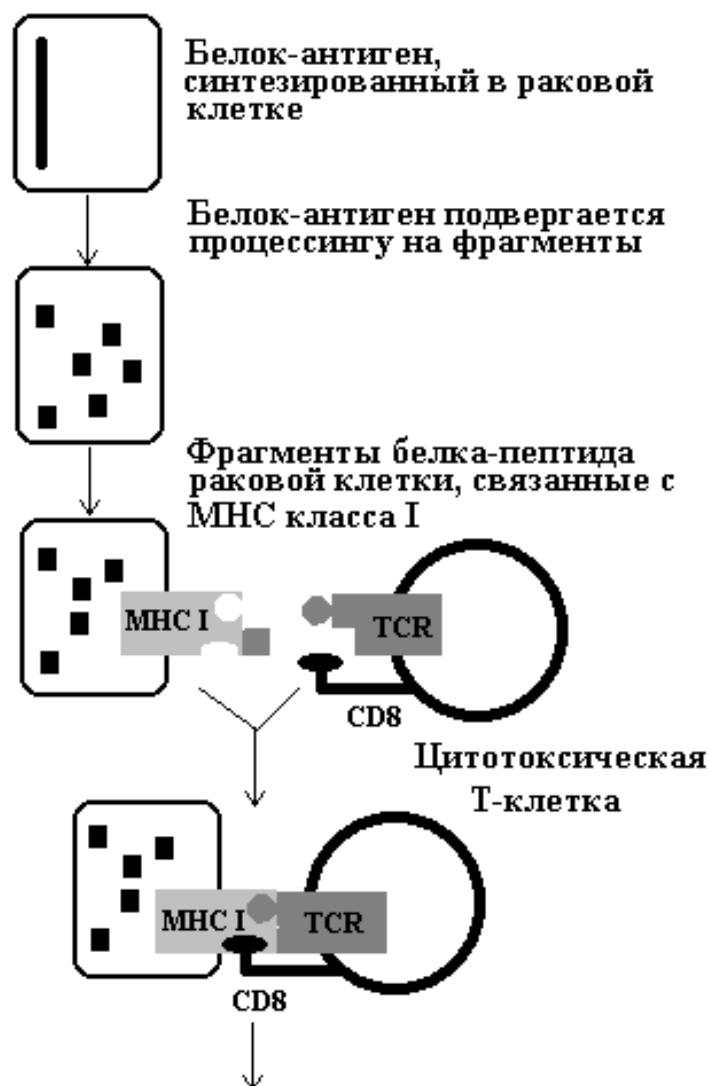


Рис. 1. Этапы иммунного ответа на раковую клетку при образовании в ней белка-антигена. Раковая клетка может быть убита путем перфорации её мембраны или за счёт апоптоза (рис. и цит. по: В. Эллиот, Д. Эллиот, 2000, с изменениями).

В 80-х годах был открыт белок-рецептор у клетки-киллера – TCR и его гены. Было показано, что двойное распознавание антигена-пептида и молекулы МНС связано с TCR.

Однако, связывания TCR с пептидом и молекулой МНС класса I недостаточно для превращения пре-киллера в цитотоксическую Т-клетку. Для полной активации необходимо связывание ещё одной молекулы – CD8 корецептора.

Эта молекула тоже связывается с молекулой МНС класса II, но в другой части молекулы рецептора TCR. То есть TCR и CD8-коррецептор Т-киллеров связываются с молекулами МНС класса I и пептидами из белков-антигенов, синтезирующихся в самой клетке.

TCR и коррецептор CD4 имеются у Т-хелперов, связываются с комплексом МНС класса II и пептидом из белков извне. Их активация вызывает иммунный ответ. Такой механизм реализуется при вакцинации вакциной на основе белков-антигенов раковой клетки и ДНК-вакциной. В этом случае в роли антигенпрезентирующей клетки может быть дендритная клетка, макрофаг или В-клетка. Если В-клетка, то она с помощью встроенного в ее мембрану белка-рецептора захватывает белок-антиген раковой клетки. Путём эндоцитоза осуществляет процессинг нативного антигена до мелких пептидов. В клетке синтезируются молекулы белка МНС класса II, которые связываются с молекулами пептидов. Комплекс белка-пептида с молекулой МНС II перемещается на поверхность В-клетки. Клетка Т-хелпер своим TCR и с помощью белка CD4 узнаёт этот комплекс на поверхности В-клетки и связывается с ним. Она секретирует цитокины, стимулирующие созревание В-клетки в плазматическую клетку, которая секретирует антитела. Антитела через кровь и лимфу распознают антиген на раковой клетке, связываются с ним и тем самым нейтрализуют его носителя (Рис. 2, 3).

Как видно, иммунная система организма необходима для его выживания от любой болезни, в том числе от рака. Элементы этой системы – клетки и молекулы постоянно бдительно охраняют организм от возникновения раковых клеток, если на них белки окажутся достаточно антигенными. Они способны узнавать эти чужеродные клетки, отличать их от нормальных клеток собственного организма.

## Антигенпредставляющая В-клетка

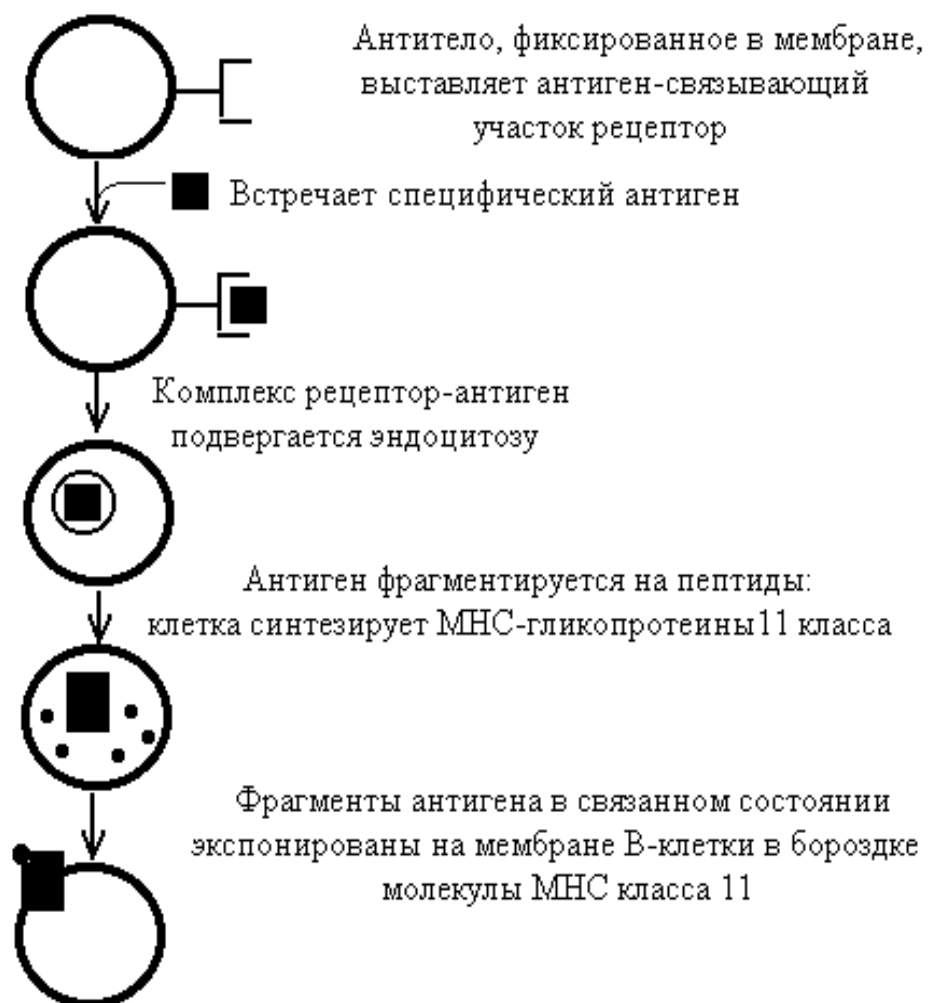


Рис. 2. Этапы представления пептида-антигена в комплексе с молекулой МНС класса II на мембране В-клетки (рис. и цит. по: В. Эллиот, Д. Эллиот, 2000).



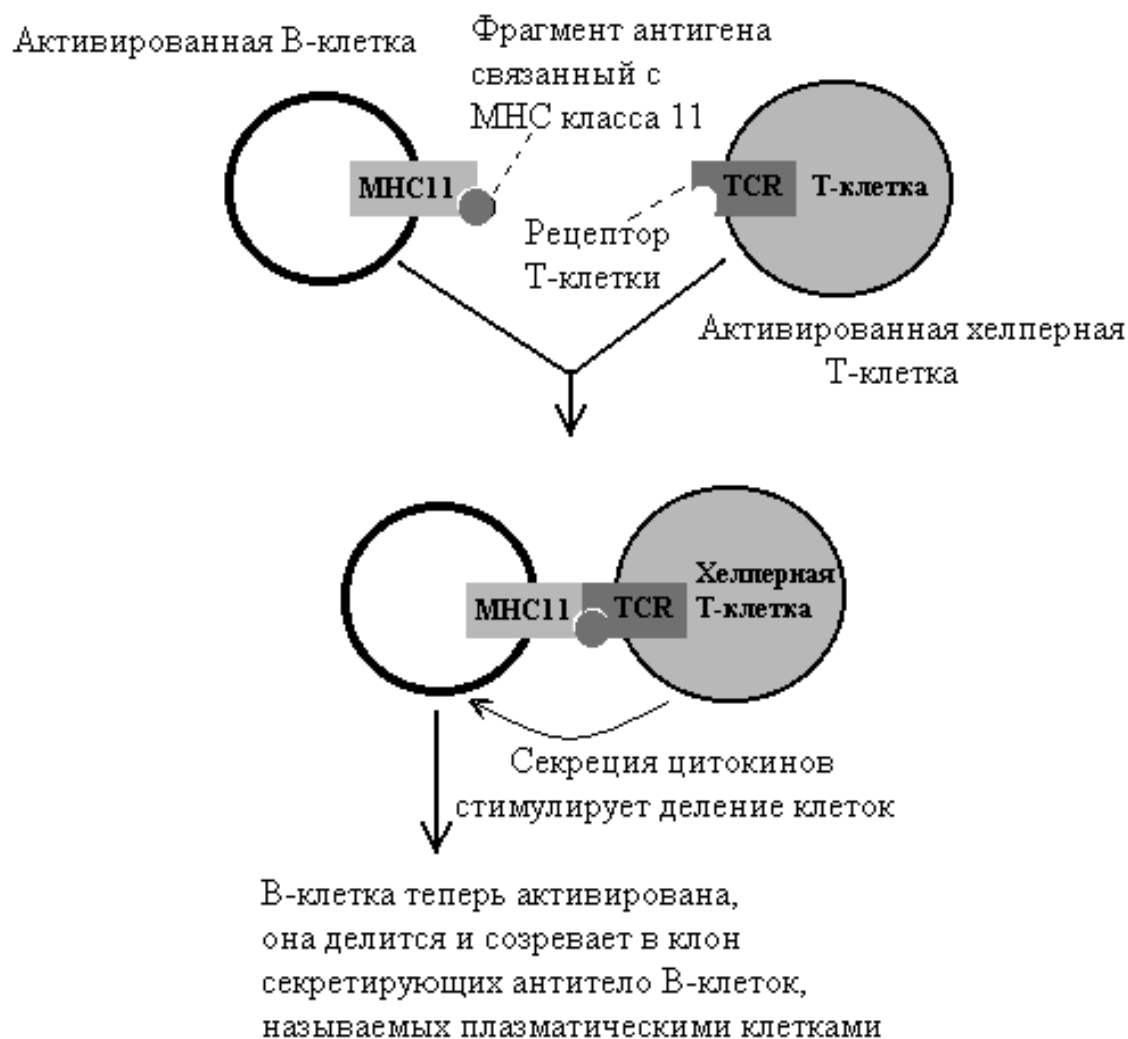


Рис. 3. Этапы активации хелперной Т-клеткой превращения В-клетки в клон плазматических клеток, секретирующих антитело (рис. и цит. по: В. Эллиот, Д. Эллиот, 2000).

Причинами отсутствия иммунного ответа организма пациента против раковых клеток могут быть изменения в генах TCR и генах МНС I и МНС II. В норме эти гены должны обеспечивать иммунной системе распознавание антигенов клетки и запускать иммунный ответ.

Теперь мы больше знаем о том, как и чем узнаётся «чужое» – антиген на раковой клетке, и как по нему – маркеру – иммунная система находит эту раковую клетку и может её уничтожить.

Важно то, что связывание цитотоксического Т-лимфоцита через его рецептор с антигеном-пептидом на раковой клетке диктуется взаимодействием

молекул CD8 – МНС. Поэтому Т-киллеры могут узнавать и уничтожать только раковые клетки, содержащие белок МНС класса I.

В регуляции начальных этапов иммунного ответа критическую роль играет механизм интерлейкин-2 – рецептор.

Легко представить себе, как можно использовать взаимодействие между интерлейкином-2 и его рецептором для усиления иммунного ответа с целью уничтожения раковых клеток.

Так как интерлейкин-2 вызывает клональное размножение Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, его ген можно использовать в составе ДНК-вакцины, что увеличит эффект вакцинации против раковых клеток.

В-лимфоцит и Т-лимфоцит – это продукты стволовых клеток костного мозга. Недавно наука совершила прорыв: впервые в истории удалось получить в лабораторных условиях Т-лимфоциты из стволовой клетки эмбрионов мышей.

Известно, что стволовые клетки способны трансформироваться в любые типы клеток. Но для этого необходимо подобрать правильный химический реагент.

Группа канадских учёных из университета Торонто во главе с доктором Хуан Карлос Сунига–Пфлаккер впервые в истории не только создали Т-лимфоциты, но и убедились, что они способны бороться с инфекцией. При раке и инфекциях нарушена иммунная система, раковые клетки секретируют вещества, подавляющие иммунную систему пациента. Этот прорыв в медицинской науке позволит открыть путь «к будущему революционному лечению пациентов от СПИДа и рака».

Учёные онкологического центра имени Слоана и Кеттеринга США (2003) выполнили серию экспериментов, которые могут стать основой для создания нового метода поиска и уничтожения раковых клеток. Они сконструировали лимфоциты-киллеры, обученные распознавать и уничтожать раковые клетки кроветворных органов. Для этого были выращены лимфоциты в культуре, а затем к ним учёные прикрепили рецепторы, которые распознают клетки человека,

поражённые лейкемией и лимфомой. Мышам предварительно были привиты подобные опухоли. Для лечения опухолей у мышей им были введены эти «рукотворные лимфоциты». Результат: лимфоциты-киллеры «разыскали и уничтожили большую часть раковых очагов у подопытных мышей».

Британские учёные заявили, что они с помощью генной инженерии сконструировали клетку-киллер. Она может распознавать и уничтожать клетки, поражённые лейкемией.

Доктор Ханс Стаусс и его группа, изучая раковые клетки лейкозиев, идентифицировали ген WT-1. Его продукт – белок синтезируется в больших количествах в клетках лейкозиев. Этот белок – маркер или метка на раковых клетках лейкозиев. Оказалось, что этот белок синтезируется также в клетках рака молочной железы, лёгких.

Сконструированная ими «клетка-истребитель», введённая в организм, находит места скопления этого белка и уничтожает раковые клетки, в которых он скапливается. Исследователи отмечают, что «этот механизм пригоден для лечения всех форм лейкозиев, а со временем может быть использован и для уничтожения других типов раковой клетки». Учёные надеются начать клинические испытания на пациентах с лейкозиев в течение двух лет.

## **9.2. Моноклональные Т-клеточные рецепторы (мТКР) – основа к созданию нового класса «препарата–уничтожителя» раковых клеток**

Поверхность мембраны живой клетки усеяна белками, часть их связана с углеводами. Среди них – белки-рецепторы и белки-маркеры. Первые используются клеткой для обмена информацией между клетками, а вторые служат для идентификации клеток.

На поверхности раковой стволовой клетки имеются белки, которых нет на нормальной клетке данного типа. Это фетальные белки-маркеры и белки изменённых генов-супрессоров клетки. Нет среди этих белков абсолютно чужеродного антигена и, если это антиген, то слабый и мозаичный антиген.

Главным элементом защиты организма от раковой клетки являются цитотоксические Т-лимфоциты, или Т-киллеры (от англ. killer – убийца). Они способны обнаруживать белки-антигены и уничтожать их носителя – раковые клетки.

Т-лимфоциты называются так потому, что их накопление и созревание, т.е. дифференцировка, происходит в тимусе – вилочковой железе. Они образуются из стволовых клеток костного мозга и мигрируют в тимус, где получают название тимоцита.

Основная функция Т-лимфоцита – распознавание чужеродного антиген-пептида в комплексе с антигеном МНС на поверхности антигенпредставляющей клетки. Белки-антигены раковой клетки – это белки, синтезируемые внутри её самой, поэтому они подвергаются процессингу внутри этой клетки и появляются на её поверхности в комплексе с белками МНС класса I.

Дифференцировка Т-лимфоцита происходит в два этапа: экспрессия на тимоците Т-клеточного рецептора (TCR) и способность рецептора его распознавать белки МНС I класса на мембране антигенпредставляющей клетки в комплексе с пептидом белка-антигена.

Связывания TCR с пептидом и молекулой МНС класса I недостаточно для превращения Т-лимфоцита в активную цитотоксическую клетку. Для полной активации требуется связывание ещё одной молекулы – CD8-корцептора. Эта молекула белка тоже связывается с молекулой МНС в другом участке от связывания TCR. CD8-корцептор имеется только у Т-лимфоцитов. Он является маркером клетки-киллера, отличающим её от других лимфоцитов.

Такие зрелые Т-лимфоциты поступают в кровь и берут на себя функции защиты против раковой клетки. Только в комплексе фрагмент антигена раковой клетки с МНС класса I на мембране клетки распознаются рецептором Т-лимфоцита. Лишь одна клетка синтезирует рецепторы для одного специфического антигена, не отличающиеся между собой по структуре активного центра.

Рецептор находит свой антиген на поверхности раковой клетки и прикрепляет Т-лимфоцит к ней. Т-лимфоцит секретирует белок перфорин, а он продырявливает мембрану раковой клетки, и она погибает (Г.И. Абелев, 1996, 1998).

Т-лимфоциты в организме выполняют роль своеобразных контролёров: своими рецепторами анализируют белки-рецепторы и белки-маркеры на поверхности клеток. Придя в контакт с клеткой, он определяет – должен ли быть в ней белок, из которого вышел его «остаток» на поверхность клетки. Если должен, то клетка остается живой. Если не должен, то его носитель – раковая клетка, уничтожается.

Так Т-лимфоциты могут распознавать чужеродные, т.е. раковые или даже другие больные, т.е. дефектные по антигенному составу клетки.

Способность Т-лимфоцитов с помощью своих рецепторов обнаруживать белки-антигены на поверхности клетки, а значит, и их носителей – раковые клетки, подтолкнула учёных к разработке нового класса «препарата-уничтожителя». Этот класс препаратов назван – моноклональные Т-клеточные рецепторы (мТКР) и может «охотиться» за антигенами раковых клеток.

Биотехнологическая компания Avidex (Великобритания) во главе с доктором Б. Джейкобсон из США приступила к первой стадии проекта по созданию нового семейства «препарата-уничтожителя», который нацелен только на раковые клетки. Учёные считают, что «естественные антитела и Т-клетки» организма человека способны обнаруживать различные виды аномальных белков, которые называются «антигенами».

Такие антитела могут отыскивать и уничтожать больные клетки, но не со стопроцентным эффектом. Они могут влиять только на антигены, расположенные на поверхности раковых клеток, – от 10% до 15% общего количества антигенов.

Новый класс препаратов, который назван моноклональные Т-клеточные рецепторы (мТКР), может «охотиться» за антигенами внутри раковых клеток. Т-клетки в организме человека используют эти рецепторы для идентификации

фрагментов белков, которые называются пептиды и которые появляются на поверхности всех клеток. Они – остатки белков, находящихся внутри клетки.

О «препаратах-уничтожителях» компаний Avidex и Sunol Molekular из Флориды (США) специалисты «уже сейчас говорят, что это крупнейший прорыв в онкологической терапии последних лет». Они создали искусственные Т-клеточные рецепторы, способные существовать независимо от своих носителей.

Для этого из Т-клеток человека исследователи из Avidex выделяют гены, которые производят эти рецепторы. Затем они с помощью вируса вводят эти гены в геном бактерии *E. coli*, которая становится практически неисчерпаемым источником идентичных копий белкового рецептора. Между ними и их Т-клеточными аналогами не существует никакой разницы. Сейчас учёные начинают опыты на животных, чтобы определить, насколько долго Т-клеточные рецепторы смогут существовать в организме.

По мнению учёных, новые препараты могут использоваться для атаки против конкретных раковых клеток. Идентифицируя Т-клетки пациента, на которые уже нацелились раковые клетки, эти препараты сами знают, какой рецептор нужно клонировать.

Другой метод состоит в изменении генов рецепторов до тех пор, пока не начнут производиться мТКР, которые прикрепляются к определённым клеткам. Учёные обеих компаний – американская и британская, уже открыли мТКР, которые присоединяются к раковым клеткам. Они уже начали тесты на животных, а тесты на людях начнутся не ранее, чем через два года.

Доктор Бент Джейкобсон из Avidex сказал: «Это открывает совершенно новую область для исследований. Эти препараты из того же класса, что и моноклональные антитела. Но они —лучше» тем, что могут ударить по более широким целям. Наиболее очевидная цель – это раковые клетки, но мТКР могут быть использованы также при лечении вирусных инфекций».

Чтобы быть способными убивать раковые или другие больные клетки к молекуле мТКР надо присоединить токсин или радиоактивный атом. В качестве

токсина – химиотерапевтический препарат, а в качестве радиоактивного атома – альфа- или бета-частица.

Итак, в распоряжении врачей «в скором времени может появиться совершенно новый класс лекарств», которые уже сейчас преподносятся авторами как лекарства от всех болезней. Они воссоздали рецепторы клеток иммунной системы, которые отвечают за распознавание чужеродных антигенов.

Таким образом, новые препараты смогут атаковать «все больные клетки без разбору». Они могут распознавать чужеродные или больные клетки, так как антигенный состав их меняется. То есть с помощью моноклональных Т-клеточных рецепторов можно уничтожать не только раковые клетки, но и любые дефектные клетки, ставшие причиной той или иной конкретной болезни.

Похожие технологии уже нашли применение в медицине – это моноклональные антитела (мКА). Технология их получения была разработана в 1975 г. Г. Келер (G.F. Kohler) и Ц. Мильштейн (C. Milstein).

На основе мКА возникла и была реализована идея иммунотоксинов для уничтожения раковых клеток. Идея эта проста и кратко заключается в следующем. Раковыми клетками, на поверхности которых есть опухолеспецифические белки-антигены, иммунизируют мышь, и она продуцирует антитела против белков-антигенов.

Эти антитела выделяют и соединяют с ядовитым для раковой клетки веществом – это иммунотоксин. После введения его в организм он связывается со специфическим белком-антигеном на раковых клетках и вызывает их гибель. Иммунотоксин не присоединяется к белкам-маркерам нормальных клеток, и поэтому нормальные клетки не уничтожаются.

Однако специфичность связывания моноклональных антител не всегда бывает абсолютно специфичной, что зависит от ряда причин, среди которых важен выбор значимых белков-маркеров раковой клетки.

Так как свойства раковой стволовой клетки создаются фетальными белками, то белками-маркерами для моноклональных антител могли бы стать: мо-

лекула адгезии CD44, белок под кодовым обозначением «5T4», белки Oct-4 и Nanog, нуклеостемин и остеопонтин, а также hTERT и другие.

Новые препараты – мТКР, по мнению д-ра Бент Джейкобсон, будут более универсальными. Однако скорого их появления на рынке не ожидают: для «моноклональных» антител этот путь потребовал долгих лет (2000).

Однако, моноклональные Т-клеточные рецепторы уже созданы и реализованы в клинической практике для поиска и селективного уничтожения раковых клеток.

Известно, что раковые клетки, выходя из-под контроля организма пациента, бесконечно делятся и распространяются – в окружающие здоровые ткани и по всему организму с образованием множества метастазов.

Проф. С. Розенберг (Steven Rosenberg, 2006) и группа из Национального института рака США давно занимаются проблемой повышения иммунного ответа организма на раковые клетки. Они воссоздали белок-рецептор цитотоксического Т-лимфоцита.

Для этого из цитотоксических Т-лимфоцитов от пациентов с меланомой выделили ген белка-рецептора, клонировали его, а затем внебрили его в обезвреженный ретровирус. У 17 пациентов с меланомой после химиотерапии иммунная система была сильно угнетена, а количество активных лимфоцитов в крови «упало». Учёные взяли из крови пациентов Т-лимфоциты, размножили в культуре и заразили их этим ретровирусом, – так лимфоциты получили информацию о белках-маркерах клеток меланомы. Затем каждому пациенту обратно ввели его цитотоксические Т-лимфоциты, т.е. уже генетически модифицированные.

Результаты:

- через месяц после лечения содержание таких клеток у 15 из 17 пациентов стало на уровне от 9% до 56% от общего количества Т-лимфоцитов;
- через 18 месяцев после лечения два пациента полностью избавились от меланомы, у них продемонстрирован высокий уровень Т-лимфоцитов в крови.

Проф. С. Розенберг отметил:



- «впервые генные манипуляции привели к регрессу рака у людей»;
- «мы можем брать нормальные Т-лимфоциты от пациентов и превращать их в способные уничтожать раковые клетки»;
- прежде важно узнать «как генетически модифицированные клетки выживут в организме в течение длительного срока»;
- «как сможет помочь такое лечение пациентов от других типов раковой клетки, здесь будут работать иные гены, кодирующие синтез других рецепторов».

Из того, что рак – не одно целое, а состоит из клеток-потомков от одной раковой стволовой клетки, то для пациента опасен не рак, а его раковые клетки; каждая из них – это клетка-организм.

мТКР может стать одним из средств, позволяющим найти и уничтожить в организме раковые стволовые клетки, не затрагивая нормальные стволовые клетки. Этим препаратом можно также уничтожать больные клетки, вызывающие ту или иную болезнь.

Для рака же это имеет принципиальное значение: уничтожая селективным лекарством или средством раковые стволовые клетки, и рак сам собой ликвидируется.

## **Глава 10. Иммуноterapia – лечение от рака в XXI веке**

### **10.1. Вакцины – основное средство поиска и уничтожения раковых клеток**

Рак – не одно целое, а расселяющиеся по всему организму пациента potomки раковой клетки-организма с образованием метастазов. Это причины того, что для уничтожения раковых клеток необходим иммунный вариант лечения, т.е. системное воздействие. Раковая клетка несёт на своей наружной мембране антигены, по которым её может распознавать иммунная система и уничтожать.

Основным средством иммунного варианта поиска и уничтожения раковых клеток является вакцина. Вакцина – это препарат, содержащий антиген или комплекс антигенов, введение которого в организм вызывает иммунный ответ – элиминацию антигена. Но так как антиген на себе несёт раковая клетка, то заодно уничтожается и она.

Вакцины в XXI веке станут основным средством для уничтожения раковых клеток, так как именно вакцины не оставят в организме ни одной раковой клетки. Для этой же цели будут также использоваться, избирательно действующие лекарства на основе генов-маркеров и белков-маркеров раковых клеток.

Раковая клетка возникает из клетки своего организма, поэтому отличить её от нормальной клетки – задача не из лёгких, а лекарства стандартной химиотерапии сами по себе не могут отличать раковую клетку от нормальной клетки.

Прогресс в знаниях защитных функций клеток иммунной системы и успехи генной инженерии привели к созданию новых способов использования иммунной системы организма для системного уничтожения раковых клеток.

В зависимости от состава, а значит и механизма формирования иммунного ответа, вакцины классифицируют так (В.М. Моисеенко, 2001):

#### **1. Вакцины на основе целых клеток:**

- аутологичные:

- немодифицированные;
- модифицированные с помощью трансфекции;

- аллогенные.

## 2. Антигенные вакцины:

- белки или фрагменты белков раковых клеток;
- ДНК- и РНК-содержащие вакцины;
- рекомбинантные вирусы;
- антиидиотипические вакцины;
- вакцины на основе дендритных клеток.

Для создания клеточных вакцин раковые клетки берут от самого пациента и выращивают в культуре. Затем раковые клетки убивают лучами, чтобы они не могли делиться, и вводят тому же пациенту обратно. В организме пациента вызывается иммунный ответ против антигенов раковой клетки.

Выделяют два типа клеточных вакцин против раковых клеток. Для создания аутологичной вакцины используются раковые клетки от пациента, предварительно убитые. Для создания аллогенной клеточной вакцины раковые клетки берут от другого пациента или пациентов, они также инактивируются.

Антигенные вакцины не содержат целых раковых клеток, а только их антигены. Пути включения антигена в состав антигенной вакцины:

- белки или фрагменты белков раковой клетки непосредственно вводятся в организм пациента в качестве вакцины;

- в раковые клетки пациента или в организм пациента вводятся чужеродные гены, кодирующие белки-антигены (ДНК- и РНК-вакцины). Такие гены доставляются в клетку различными путями: 1) прямым введением гена, который проникает через мембрану клетки; 2) ретро- или аденовирусными векторами; 3) введением липосом с геном; 4) введением искусственных хромосом с чужеродными генами др.

- АПК-вакцина создаётся на основе антигенпрезентирующих клеток, главными из них являются дендритные клетки. Эти клетки обладают наибольшей способностью к представлению антигенов раковой клетки как Т-лимфоцитам, так и В-лимфоцитам.

Дендритные клетки получают из предшественников костного мозга от

пациента, а также из периферической крови. Их инкубируют с антигенами из раковых клеток в культуре. Внутри дендритной клетки антигены подвергаются процессингу до пептидов. Пептиды встраиваются в молекулы HLA и в таком комплексе экспонируются на поверхности дендритной клетки. Дендритные клетки с нагруженным антигеном-пептидом – это вакцина, которую вводят пациенту (В.М. Моисеенко, 2001; И.А. Балдуева, 2003).

В.М. Моисеенко, И.А. Балдуева, К.П. Хансон (1999) приводят этапы развития вакцин против раковых клеток.

1. Конец XIX века. Токсин У.Б. Коли (1890) – пытался лечить пациентов, страдающих от рака, инъекциями бактериальных экстрактов.

2. XX век: 50-60-е годы. Антисыворотки от иммунизированных доноров и родственников пациентов.

3. 70-80-е годы. Аутологичные и аллогенные облученные раковые клетки вместе с неспецифическими стимуляторами защитных сил организма (бактерии, вирусы).

4. Конец 80-х годов – настоящее время. Генная терапия модифицированными клетками с помощью генов цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4; ИНФ; ГМ-КСФ), костимулирующих молекул (B7-1, B7-2) и молекул аллогенного главного комплекса гистосовместимости (HLA), создание рекомбинантных и синтетических вакцин на основе клонирования опухолеассоциированных антигенов.

N. Restifo и M. Sznol (1997) пишут: «Вакциноterapia – метод использования любого антигена или комплекса антигенов совместно или без адъювантов для модуляции иммунного ответа». Этот метод относится к методам активной специфической иммунотерапии для стимуляции иммунного ответа пациента на «собственную» опухоль; пока используется в условиях клинических испытаний (цит. по: В.М. Моисеенко и соавторы, 1999).

Лечение пациентов от рака путём активации естественных защитных механизмов или введения естественных полимерных молекул (цитокины, факторы роста и др.) – это биотерапия.

Классификация методов биотерапии рака (S. Rosenberg, 1997).

I группа – методы активной иммунотерапии:

- неспецифическая иммунотерапия (иммунные адъюванты: интерферон, ИЛ-2, ГМ-КСФ и др.)
- специфическая иммунотерапия с иммунизацией опухолевыми антигенами (вакциноterapia).

II группа – методы пассивной иммунотерапии:

- антитела (моно- или поликлональные антитела, или их конъюгаты с токсинами или изотопами);
- клетки [опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (от англ. TIL), лимфокинактированные киллеры (от англ. LAK)];

III группа – не прямые методы:

- удаление или блокирование факторов роста или ангиогенеза.

При раке нет «полноценного иммунного ответа». По мнению авторов, причинами этого являются:

- недостаточная иммуногенность антигена раковой клетки или её полное отсутствие;
- способность раковых клеток вызывать системную иммунодепрессию за счет ИЛ-10, ТФР-бета и других веществ со снижением активности Т-лимфоцитов;
- нарушение механизма презентации антигенов «профессиональными» антигенпрезентирующими клетками Т-лимфоцитам.

Но главной причиной авторы считают недостаточную иммуногенность раковых клеток. Раковые клетки в организме возникают часто и если клетки иммуногенны, то легко уничтожаются иммунной системой. При слабой иммуногенности раковых клеток они «ускользают» от иммунного контроля.

Целесообразность использования иммунной системы организма против раковых клеток была доказана в ряде экспериментов:

- после иммунизации против сингенных раковых клеток прививка этих клеток животным не удается;
- Т-лимфоциты способны лизировать аутологичные раковые клетки in

vitro;

- в ответ на стимуляцию аутологичными раковыми клетками Т-лимфоцитов они способны продуцировать цитокины;

- наличие антигенов на раковых клетках, которые распознают цитотоксические Т-лимфоциты.

Акад. В.В. Власов (2002) пишет: «При лечении рака главная проблема в иммунной системе: почему она не может нормально бороться? Дело в том, что белки раковой клетки плохо распознаются иммунной системой, кроме того, раковые клетки подавляют всю систему иммунного ответа. Чтобы иммунный ответ сработал, нужно, чтобы в клетках синтезировалось множество необходимых белков, а они в раковых клетках не производятся.

Так что можно сделать? Можно прямо в опухоль ввести гены, которые “спродуцируют” то, чего не хватает. И таким способом всё же заставить иммунную систему работать. То есть, побеждать опухоль будет своя иммунная система, просто ей надо помочь».

К. Вентер (2003), глава фирмы «Селера», говорит: «Вакцину против рака ищут уже давно. Проблема здесь в том, что организм не воспринимает раковые клетки как чужеродные и не борется с ними. В принципе, иммунная система обязана удалять из организма перерождённые клетки так же, как удаляет чужеродные, но в случае с раковым заболеванием этого не происходит. Дело в том, что сигнал о “чужеродности” система получает от антигенов, находящихся на поверхности клетки. А поскольку антигены на раковых клетках “свои”, то сигнала опасности организм не получает, и иммунного ответа не возникает». Учёный надеется, «что с его уже имеющимися базами данных он способен куда быстрее найти гены, которые лучше “настраивают” человеческий иммунитет, чем уже известные».

В.М. Моисеенко (2000) отмечает: «Проблема болезни в том, что опухоль для организма – “своя”, из-за чего иммунная система не всегда может распознать в ней врага». Система иммунного контроля «свой–чужой» даёт сбой и метод «биотерапии как раз и призван помогать ей распознавать раковые клетки».

«Мощный прогресс в молекулярной биологии “подстегнул” биотерапию, в результате чего она становится приоритетным методом лечения рака, а, возможно, и способом предупреждения рака».

Цель вакцины – сделать иммуногенными раковые клетки и стимулировать иммунную систему на уничтожение раковых клеток.

И.А. Балдуева, В.М Моисеенко (2005) пишут, что теперь на основе понимания молекулярных причин активации иммунного ответа на раковые клетки стоит задача: «не просто приготовить вакцину, а создать такую вакцину, которая обеспечила бы иммунный ответ даже в случае, если против данного нативного антигена раковой клетки иммунного ответа не возникает».

Доказано, что в потомстве рака среди клеток лишь «некоторые» являются причиной возникновения рака – это раковые стволовые клетки. Это потомки раковой стволовой клетки, возникшей из нормальной стволовой клетки ткани из-за генетических изменений в ней.

Раковые стволовые клетки уже обнаружены в ряде раков разного типа клетки, ведётся поиск их генов-маркеров и белков-маркеров, различий между раковой стволовой клеткой и нормальной стволовой клеткой. Они станут мишенями для разработки новых методов диагностики раковых стволовых клеток и методов их ликвидации, не затрагивая нормальные стволовые клетки ткани.

На поверхности раковой стволовой клетки имеются фетальные белки-антигены: Oct-4, Nanog, нуклеостемин – белок гена, белок под кодовым обозначением «5T4», маскирующий антигены на поверхности раковой клетки от иммунного контроля, а также известный белок – теломераза и др. Белки-антигены раковой стволовой клетки – основа для новых вакцин против раковых стволовых клеток.

Теперь при создании онко-вакцин необходимо использовать белки-антигены раковой стволовой клетки, выделяя раковые стволовые клетки из фрагмента опухоли или образца биологических жидкостей от пациента.

Онко-вакцины на основе активации антигенпрезентирующих клеток антигенами раковой стволовой клетки будут наиболее эффективными, так как ци-

тотоксические Т-лимфоциты будут прицельно активированными против пула раковых стволовых клеток в составе клеток рака.

Однако, при этом необходима стимуляция клеток иммунной системы введением в раковые стволовые клетки генов интерлейкинов: ИЛ-2, ИЛ-12, ген фактора некроза опухоли и др., так как раковые стволовые клетки – это клетки своего организма-хозяина.

Важнейшими вакцинами для уничтожения раковых клеток в организме пациента являются: вакцина на основе дендритных клеток и ДНК-вакцины. В ближайшие годы основной вакциной для ликвидации раковых клеток может стать вакцина из эмбриональных стволовых клеток (см. раздел 6.1).

«Использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) станет безопасным», – заявляют австралийские учёные. Им удалось преодолеть одно из главных препятствий на пути развития методов лечения эмбриональными стволовыми клетками – они разработали «способ удаления из культуры тех клеток, которые могут переродиться в раковые».

Вместе с сомнениями в этичности работ получением стволовых клеток при разрушении эмбриона, одной из главных причин против применения ЭСК была «невозможность контролировать склонность этих клеток» к канцерогенезу.

Учёные из Monash Institute of Medical Research и Monash University (2006) нашли признаки, которые связаны с экспрессией маркера CD30. Это позволяет обнаружить нарушения в развитии клеток, которые в дальнейшем могут привести к перерождению этих клеток в раковые клетки. Авторы пишут, что «это пока ещё не даёт полного контроля, но значительно приближает к нему». Можно определять: 1) «какие параметры культивирования имеют значение в появлении нежелательных изменений» и 2) «можно найти способ очистить культуру от начавших перерождение клеток, так что остальные можно будет использовать для клеточной терапии». (Источник: <http://urology.com.ua>.)



## **10.2. Вакцина на основе дендритных клеток для поиска и уничтожения раковых клеток**

Даже солидный рак с размера узелка 2 мм или даже 1 мм в ткани для пациента уже является болезнью всего организма. Так как каждая его клетка – это клетка-организм, то для излечения от рака необходимо уничтожение всех раковых клеток. Но прежде надо найти каждую раковую клетку в организме среди нормальных клеток. Этого можно добиться с помощью вакцины.

Рак – не одно целое, а незримое распространение потомков бессмертных клеток из одной раковой клетки в окружающие здоровые ткани и по всему организму через кровь и лимфу без границ и без конца с разрушением тканей и занятием их мест. Из этого ясно, что рак – это клеточная инвазия.

Этим и по механизму инвазии – включение определенных генов, распространение раковых клеток очень похоже на бактериальную инфекцию.

Одинаковы также молекулярные механизмы клеток иммунной системы для поиска и уничтожения, как бактерий и вирусов, так и раковых клеток в организме пациента.

Вакцина – это препарат, содержащий иммунный антиген. С помощью вакцины в организме вызывается иммунный ответ – уничтожение антигена, а вместе с ним и его носителя, в данном случае раковой клетки.

Мишенью для вакцины являются белки-антигены на раковой клетке. Их с помощью рецепторов захватывает антигенпрезентирующая клетка, и запускает процесс уничтожения их носителя – раковую клетку и без побочных эффектов.

Теперь доказано, что иммунная система способна уничтожать раковую клетку любого типа, однако раковая клетка вырабатывает в себе ряд защит, позволяющих ей ускользать от иммунного ответа. Не всё ещё здесь ясно. Среди защит раковой клетки могут быть:

- недостаточная иммуногенность опухолеспецифического антигена;
- способность раковой клетки вызывать иммунодепрессию секрецией интерлейкина 10, фактора роста эндотелия сосудов и др., со снижением функций Т-лимфоцитов;

- нарушения механизма представления опухолеспецифического антигена раковой клетки (И.А. Балдуева, 2001);

- маскировка антигена на поверхности раковой клетки фетальным белком под кодовым обозначением «5T4» и др.

Протеом раковой клетки лишь в начале изучения, поэтому антигены её определены только для отдельных типов клетки. Антигены авторы разделяют на группы по-разному:

1) антигены в результате эпимутаций в генах свойств нормальной клетки, превращающих её в раковую клетку, и антигены в результате мутаций или эпимутаций в генах-супрессорах этой клетки;

2) антигены, синтезируемые в раковой клетке, но отсутствующие в нормальной клетке того же типа; это ряд фетальных белков, среди них фермент теломераза – hTERT, Oct-4, Nanog, нуклеостемин, белок под кодовым обозначением «5T4» и др.

Оказалось, что в организме основными клетками поиска в тканях антигенов разных носителей являются дендритные клетки (ДК). Они имеются во всех тканях, но в малом числе. Это клетки с длинными и ветвящимися отростками, проникающими между клетками тканей, за что их так и называют – дендритные (от греч. dendron – дерево).

ДК – это первые клетки, которые осуществляют иммунный надзор за антигенами любого генеза. По ним эти клетки распознают их носителей – раковые клетки, бактерии, вирусы. ДК вылавливают раковые клетки в межклеточном матриксе, при проникновении в кровеносные и лимфатические капилляры и, особенно, в самом кровотоке.

Хотя раковая клетка происходит из клетки своего организма, она синтезирует специфические белки-антигены и выставляет их на своей поверхности. В таком случае раковая клетка распознается иммунной системой как «чужая», а не своя.

Мы уже знаем, что на поверхности антигенпрезентирующей клетки имеются молекулы HLA. Это гликопротеины, их структура уникальна у каждого

индивида. Для иммунной системы они служат знаками «своего». Антигены представляются иммунной системе связанными с молекулами HLA. Цитотоксический Т-лимфоцит одной молекулой-рецептором распознаёт на клетке не просто чужеродный антиген, а комплекс молекулы HLA и антигена, т.е. «свое» и «чужое». Из двух классов этих молекул только молекулы класса I непосредственно участвуют в контакте Т-киллеров с клетками-мишенями.

ДК происходит из стволовой кроветворной клетки. В организме человека она существует в двух состояниях – незрелая и зрелая. Незрелые располагаются в различных тканях, где захватывают антигены раковой клетки. При этом ДК своими рецепторами способны различать любой антиген, чем они отличаются от Т-клеток и В-клеток.

Фенотип незрелых ДК: высокие эндоцитоз и экспрессия захвата антигенов; невысокая экспрессия молекул адгезии и костимулирующих молекул; способность превращаться в макрофаги. Такой фенотип создает выраженную активность незрелых ДК захватывать антигены, но низкое представление антигенов. В присутствии факторов созревания эти клетки через 2 суток превращаются в зрелые ДК.

Фенотип зрелых ДК: наличие множества отростков, что увеличивает их поверхность и способность к активному передвижению; низкая адгезия к пластику; низкая способность к эндоцитозу и низкая экспрессия рецепторов для захвата антигенов; высокая экспрессия костимулирующих молекул B7-1, B7-2 и адгезии. Они являются единственными клетками, которые способны представлять наивным Т-клеткам неизвестные для них ранее антигены, и в отличие от других антигенпрезентирующих клеток, их стимулирующий эффект на Т-лимфоциты в 10-100 раз сильнее (М.В. Пашенков, Б.В. Пинегин, 2001; А.В.Кузнецова и соавт., 2003).

Раковая клетка разного типа секретирует интерлейкин 10, который препятствует созреванию ДК и блокирует антигенпрезентирующую активность ДК для Т-лимфоцитов, а также секретирует вещества, подавляющие дифференцировку CD34 – предшественников ДК.

Показано, что у пациентов, страдающих от рака, количество ДК в организме снижено, а сами клетки функционально неполноценны. На их поверхности снижена экспрессия адгезивных и костимулирующих молекул, критическое снижение молекул HLA, особенно класса I. «Так выпадает целое промежуточное звено иммунного ответа, из-за чего цитотоксические Т-лимфоциты не способны уничтожать раковые клетки». Эти изменения могут быть главными причинами отсутствия в организме иммунного ответа на раковые клетки (И.А. Балдуева, 2001; В.М. Моисеенко, 2005).

Уникальные способности дендритных клеток позволили использовать их для создания вакцин с целью уничтожения раковых клеток. При этом одним из этапов приготовления вакцины является размножение ДК в культуре. Это позволяет заменить дефектные ДК пациента на полноценные клетки.

Но учёные уже нашли другой выход из положения – разработали метод получения дендритных клеток из эмбриональных стволовых клеток для той же цели.

А.В. Кузнецова и соавторы (2004), пишут, что клинические испытания вакцин на основе дендритных клеток, несмотря на обнадеживающие результаты для уничтожения раковых клеток, «еще находятся в начальной фазе». Основными задачами при создании вакцин на основе ДК для этой цели являются:

- «изучение молекулярных причин, с помощью которых раковые клетки изменяют экспрессию генов и функции дендритных клеток»;
- «определение рецепторов дендритных клеток и сигнальных путей, через которые действуют раковые клетки»;
- «создание медиаторов, активирующих дендритные клетки в определенном направлении, для стимуляции необходимого иммунного ответа»;
- «выбор векторов, продуцирующих данные медиаторы и стимулирующие дендритные клетки *in vivo*»;

Учёные считают, что такие направления исследований «по использованию дендритных клеток могут привести к созданию новых лекарств и вакцин для стимуляции иммунного ответа против различных инфекций и рака».

Для вакцин ДК могут быть выделены из двух источников: из незрелых предшественников их – CD34 клеток костного мозга и из моноцитов периферической крови от пациента.

Схема изготовления вакцины на основе дендритных клеток такова:

1) приготовление дендритных клеток. Из крови пациента выделяют клетки, которые дают начало дендритным клеткам, например, моноциты. Их культивируют в течение 7 дней с факторами роста – гранулоцит-макрофаг колоние-стимулирующий фактор и интерлейкин-4 с контролем и сменой среды. На 4 день к ним добавляется антиген, приготовленный из раковых клеток данного пациента.

2) выделение белков-антигенов из живых раковых клеток из материала биопсии – обычно фрагмент опухоли.

Фрагмент опухоли диссоциируется на клетки с помощью ферментов. Раковые клетки отмываются и после специальной обработки разрушаются и из них получают лизат белков-антигенов. Его используют для представления дендритным клеткам.

3) инкубация ДК с белками-антигенами из раковой клетки в течение нескольких суток. Из этого получают суспензию дендритных клеток, нагруженных белками-антигенами раковой клетки – это вакцина.

Для чего нужна такая инкубация? Дело в том, что ДК «рассеяны» по тканям всего организма, поэтому шанс, что введённый антиген сам свяжется с ними, невелик. Во время инкубации дендритные клетки «запоминают» белки-антигены раковой клетки, а при введении их в составе вакцины распознают по ним раковые клетки и вызывают иммунный ответ на их уничтожение.

В настоящее время идёт процесс накопления знаний о ДК и их получении, культивировании и активации; об антигенах – их источники, приготовление и доставка; разрабатываются дозы, частота и пути введения; критерии оценки ответа иммунной системы на введение обычных и модифицированных дендритных клеток (А.В. Кузнецова и соавт., 2004).

Пути введения вакцины. Эти пути ещё изучаются. Пока показано, что ДК-вакцину эффективно вводить пациенту внутрикожно в виде «лимонной корочки» в 2 или 3 точки на спине. Объем вводимой суспензии клеток обычно до 3 мл.

Этапы активации цитотоксических Т-лимфоцитов после введения вакцины в организм пациента:

1) вакцинная ДК представляет антиген раковой клетки в виде пептида Т-лимфоцитам *in vivo* и активирует их;

2) «обученные» к антигену раковой клетки Т-лимфоциты распознают раковые клетки в организме и лизируют их;

3) «ДК хозяина распознаёт лизированные раковые клетки и поддерживает активность цитотоксических Т-лимфоцитов» (И.А. Балдуева, 2003).

Для эффекта против раковых клеток инкубация ДК с антигенами из раковой клетки повторяется по схеме сроков вакцинации. Антигенами для инкубации с ДК от пациента может быть не только лизат из раковых клеток – чаще всего, но и пептиды, кДНК или иРНК, кодирующие белки-антигены раковой клетки от пациента.

Итак, вакцина на основе ДК с антигенами раковой клетки от конкретного пациента имеет цели – научить Т- и В-лимфоциты иммунной системы отыскивать раковые клетки в организме пациента и уничтожать их.

Вакцина создаёт отсроченный пролонгированный иммунный ответ на раковые клетки, что отличает её от химиотерапевтических препаратов, оказывающих немедленное и кратковременное действие. Но это не профилактическая вакцина, а средство для уничтожения раковых клеток уже имеющегося у пациента рака.

Кроме этого, пока вакцины готовят против какого-то типа раковой клетки. То, что такие вакцины создаются из антигенов раковой клетки от пациента, и то, что они направлены против одного типа раковой клетки – это серьёзные недостатки вакцин, в отличие, от вакцин против бактерий и вирусов.

Для приготовления вакцины против любого типа раковой клетки необходимо, чтобы в них был синтез общего белка. Пока таким общим белком является фермент теломераза – hTERT и её РНК. Теломераза синтезируется в 90% раковых клеток разного типа у человека, а в нормальной клетке того же типа – синтеза её нет, т.е. гены её не включены.

Е.Ю. Москалёва, С.Е. Северин (2002) приводят данные из работ, в которых показано, что иммунизация с помощью РНК теломеразы вызывала иммунный ответ у животных против раковых клеток разного типа. Так, при иммунизации мышей с помощью дендритных клеток, трансфецированных РНК TERT, исследователями обнаружено появление цитотоксических Т-лимфоцитов, которые лизировали не только клетки меланом, но и разные типы раковой клетки. Это же было показано в опытах *in vitro* с раковыми клетками разного типа, взятых от пациентов.

Показано также, что иммунизация с помощью ДК, в которые вводилась РНК из раковых клеток, более эффективна, если используется не РНК отдельного белка, а суммарная РНК, так как при этом происходит активация дендритных клеток сразу против нескольких белков-антигенов.

Е.Ю. Москалева, Е.С. Северин заключают, что результаты экспериментов этих исследователей «позволяют рассматривать РНК hTERT в качестве потенциального универсального опухолеспецифического антигена».

Итак, вакцина на основе ДК может стать одним из наиболее эффективных средств уничтожения раковых клеток, так как не оставит в организме пациента ни одной раковой клетки.

В статье «Прививка от рака» (2000) американские учёные разработали вакцину, которая «может помочь от всех типов раковой клетки». Принцип её действия: она активирует собственные защитные силы организма, заставляя его отыскивать и уничтожать раковые клетки.

Идея авторов заключалась в том, чтобы создать универсальную вакцину против рака, такую, которая стимулирует собственную иммунную систему организма, атакует и уничтожает раковые клетки разного типа.

Вакцина, созданная учёными из американского университета Дьюк содержит особый белок. Он имеется в каждой клетке, а в раковых клетках его количество намного превышает норму. Поэтому исследователи решили, что этот белок представляет собой подходящую «мишень». Что это за «особый» белок, в работе не указывается.

При испытаниях вакцины на лабораторных мышах «количество различного типа рака значительно сократилось». Но доктор Джон Той из британского Фонда раковых исследований обеспокоен тем, что «вакцина действует на все клетки без разбора» и подстёгивает организм к уничтожению не только раковых клеток, но и здоровых клеток.

Учёные считают, что потребуется еще ряд исследований, в том числе и для того, чтобы развеять подобные опасения. Так или иначе, учёные установили, что «единую вакцину, которая применима против различных типов раковой клетки, создать можно».

До сих пор онко-вакцины готовятся на основе белков-антигенов из всех клеток в составе рака от пациента, чаще всего в виде лизата. Но теперь обнаружено, что в составе клеток рака два типа клеток: 1) раковые стволовые клетки – их очень мало и 2) нераковые клетки – они составляют основную массу клеток рака.

Раковая стволовая клетка – причина рака и за счёт самообновления сохраняет лишь численность пула своих потомков и рост рака за счёт размножения нераковых клеток в составе клеток рака.

Отсюда для онко-вакцин, в том числе для вакцины на основе дендритных клеток, в качестве антигенов должны быть взяты белки-антигены из раковой стволовой клетки, но не от нераковых клеток рака. Этот новый подход недавно реализован исследователями из Италии на глиоме головного мозга в опытах на мышах.

Были созданы две вакцины на основе дендритных клеток, активированных лизатами: 1) лизат из нераковых клеток и 2) лизат из раковых стволовых клеток.



Этапы опытов: 1) пересадка клеток глиомы в головной мозг мышам: одной группе – нераковые клетки, а другой – раковые стволовые клетки из той же глиомы.

2) через недели после пересадки клеток глиомы животным 3-хкратно вводили вакцины.

Результаты: 1) вакцина на основе лизата раковых стволовых клеток «надежно защищала животных от возникновения обоих типов опухоли»;

2) вакцина на основе лизата нераковых клеток приводила к излечению только 50% животных с опухолью от нераковых клеток и «абсолютно не избавляла от роста опухоли мышей от раковой стволовой клетки».

Так авторами исследования впервые был предложен новый подход к созданию онко-вакцин на основе дендритных клеток. Этот же подход должен быть и для создания другого типа онко-вакцин. Эффективность стимуляции цитотоксических Т-лимфоцитов против мишени – раковых стволовых клеток, оказалась гораздо выше, чем при стандартном подходе – на основе лизата из всех клеток рака.

Опыты показали также разницу при стимуляции иммунной системы против различных мишеней в составе одного рака. Авторы заключают, что вакцина на основе ДК, активированных антигенами раковых стволовых клеток «имеет огромные перспективы и, безусловно, будет развиваться. Именно такой подход найдет быстрое клиническое воплощение». Источник: Cancer Res. 2006. 66; 10247 – 10252 (цит. по: А.В. Берсенева, 2006).

### **10.3. ДНК-вакцина – новый способ поиска и уничтожения раковых клеток**

Идея использования иммунных средств для излечения от рака и попытки её реализации принадлежат американскому хирургу У. Коли (W. Coley) и относятся к концу XIX века.

Однако интерес к иммунным средствам угас на многие десятилетия, так

как начали применяться: хирургический метод лечения солидного рака, а позже – лучевое лечение и с 1940 г. – химиотерапия.

Проф. А.Ю. Барышников (2004) подчёркивает:

- «как бы тщательно не удалили рак, всегда остаются раковые клетки, из которых рак способен возродиться»;
- «вакцина как раз и направлена на усиление иммунного ответа организма, чтобы убить эти раковые клетки».

Лишь в последнюю четверть XX века иммунная терапия стала вновь развиваться для этой цели.

В настоящее время разработкой и использованием вакцин для уничтожения раковых клеток интенсивно заняты учёные во многих странах и в нашей стране.

Причин этого несколько:

- механизм уничтожения раковых клеток иммунной системой такой же, что и для уничтожения бактерий и вирусов при инфекциях;
- солидный рак с размера узелка из раковых клеток 2 мм – уже системная болезнь, а вакцина – это средство системного воздействия на раковые клетки и их метастазы;
- именно иммунная система избирательная: она уничтожает только поражённые клетки, не затрагивая здоровых клеток.

Однако, в создании вакцин для уничтожения раковых клеток очень много трудностей. Они создаются самой раковой клеткой, так как она возникает из клетки своего организма-хозяина за счёт дерепрессии в ней ряда генов фетальных белков. Они и являются для раковой клетки антигенами.

Так как иммунная система не даёт иммунного ответа на антигены раковой клетки у пациента, то и носители их, раковые клетки, практически незаметны для клеток иммунной системы. Чтобы организм пациента успешно уничтожал раковые клетки, надо сделать их «чужими» – искусственно «посадить» на них антигены, которые бы вызывали бурный иммунный ответ. Одним из таких способов является ДНК-вакцина.

Вспомним, что ген – это фрагмент ДНК. Каждый ген обеспечивает синтез определенных белков в клетке. Этот процесс осуществляется по этапам: ген → иРНК → белки.

Идея ДНК-вакцины состоит в том, чтобы в ДНК раковой клетки ввести ген, кодирующий новый для клетки белок-антиген. Тогда в клетке будет происходить синтез такого белка, который после процессинга в виде пептида в комплексе с молекулой HLA I выставляется на её поверхности. Это вызывает эффективный ответ иммунной системы организма против белка-антигена, а значит и против его носителя – раковой клетки.

ДНК-вакцина – это новый вид вакцин, так как в организм вводится не готовый белок, а его ген, и этот ген новый для клетки. Введение такой вакцины в организм пациента называют «ДНК-вакцинацией».

Новый ген вводится в раковые клетки, против которых хотят увеличить иммунный ответ, либо в клетки иммунной системы, чтобы усилить их иммунный ответ.

В зависимости от способа введения гена в раковые клетки ДНК-вакцину делят на два вида: «ex vivo», т.е. вне организма, и «in vivo», т.е. непосредственно в организме.

Приготовление ДНК-вакцины «ex vivo» состоит из следующих этапов: 1) из раковой опухоли берётся фрагмент и из него получают культуру раковых клеток; 2) в раковые клетки вводят ген с регуляторным участком методом трансфекции или с помощью обезвреженного вируса – методом трансдукции и др.; 3) раковые клетки облучают, чтобы они не могли делиться. Такие модифицированные раковые клетки – это вакцина, её вводят в организм пациента внутривенно или подкожно.

ДНК-вакцина «in vivo» представляет собой вектор, в который введён новый для клетки ген с его регуляторным участком. Часто в качестве вектора используют ретровирус или аденовирус, плазмидную ДНК, липосомы, а в будущем, искусственные хромосомы. Чтобы вирус не размножался, из его структуры удаляют соответствующие гены, т.е. он становится безопасным. Вектор с

геном вводят в организм или в опухоль, он проникает в раковые клетки.

В.Г. Дебабов (1999) пишет: «Очень важно, что, по-видимому, введенный ген ДНК-вакцины не встраивается в геном, а длительно в течение недель и месяцев существует в раковой клетке как эписома, синтезируя все это время в ней «чужой» антиген.

Для индукции иммунного ответа на антиген, последний должен быть представлен клеткам иммунной системы в виде пептида в комплексе с молекулой белка HLA I на поверхности раковой клетки. Если при этом пептиды распознаются как «чужие», то запускается ответ на уничтожение раковой клетки.

Доказано, что ДНК-вакцина вызывает в организме пациента полный иммунный ответ на антиген: гуморальный – образование антител и клеточный – активация цитотоксических Т-лимфоцитов.

Какие преимущества имеет ДНК-вакцина перед обычной вакцинацией, т.е. введением готового белка раковой клетки или убитой раковой клетки?

1. Используя один вектор, можно создавать различные вакцины, только меняя гены, кодирующие антиген.

2. Один вектор может нести несколько генов и индуцировать синтез нескольких белков-антигенов: например, ген белка «5T4», ген апоптоза – ген *bax*, ген интерлейкина-2 или 12.

3. Значительно снижается угроза побочных эффектов из-за токсичности вводимых при обычной вакцинации «балластных» белков в составе белка-антигена.

4. Введение в раковые клетки генов-супрессоров; например, ген *wt53*, в котором часто возникают мутации.

5. Блокирование генов свойств раковой клетки; например, ген *ost-4*, ген нуклеостемина, ген белка «5T4», маскирующего антигены на раковой клетке от клеток иммунной системы, ген теломеразы и др.

Для этого в раковую клетку вводится ген, приводящий к синтезу РНК, комплементарной мРНК вредного гена. Такая РНК является антисмысловой и по принципу комплементарности оснований будет подавлять синтез смысловой

мРНК вредного гена изнутри. Теперь же для этой цели можно использовать «малые интерферирующие РНК» – «выключатели гена».

В настоящее время уже начаты испытания ДНК-вакцин для поиска и уничтожения раковых клеток в клинической практике.

1. Учёными Медицинского центра Бэйлорского университета в Далласе (2002) разработана вакцина GVAX от рака лёгких. «Первые результаты испытаний показали её высокую эффективность в лечении запущенных форм болезни, в том числе в тех случаях, когда традиционное лечение не помогло. В ходе эксперимента в группе добровольцев несколько человек были полностью излечены от рака, у других удалось добиться стабилизации состояния». В ходе предварительных испытаний вакцина вводилась 43 пациентам с немелкоклеточной формой рака лёгких, из которых только у 10 была начальная форма болезни.

Вакцина представляет собой клетки рака от самого пациента, в которые внедрён ген GM-CSF. Она вводилась в организм с интервалом в две недели в течение трех месяцев. Добавленный ген помогал организму распознавать клетки как раковые, так что иммунная система могла эффективно противостоять обычным раковым клеткам и препятствовать прогрессированию болезни.

У трёх пациентов рак полностью исчез, рецидивов не было минимум три года. При этом у двоих из этих трех пациентов ранее оказалась неэффективной стандартная лучевая терапия. У остальных пациентов с поздней стадией болезни её прогрессирование прекратилось, эффект сохранялся на срок от пяти месяцев до двух лет и более.

Учёные заключают, что эти результаты внушают оптимизм. Обычные протоколы лечения работают лишь в небольшом проценте случаев, а средняя выживаемость не превышает восьми-девяти месяцев. Пока о внедрении вакцины в практику говорить рано, потребуются дополнительные исследования. Авторы надеются, что в течение трёх лет они смогут подать документы на получение разрешения».

2. В Бостонском Dana-Farber Cancer Institute создана вакцина на основе

раковых клеток пациента. «Она стимулировала иммунную систему на борьбу с опухолью», – сообщает UPI science news (2000).

Исследования проводились на 34 больных раком лёгких – одном из самых распространенном типе рака. Один из авторов исследования Глен Дранов (Glenn Dranoff) сообщил, что «именно использование собственных раковых клеток для вакцинации даёт максимальные шансы на развитие стойкого иммунного ответа». Данный метод называется терапевтической вакцинацией. В отличие от традиционной вакцинации, он направлен на лечение болезни, а не её профилактику.

Врачи генетически модифицировали клетки рака, которые были получены хирургическим путем. В клетки был введен ген гранулоцит-макрофаг колониестимулирующего фактора (GM-CSF) – сильного стимулятора иммунной системы. Вакцину на базе таких клеток и вводили пациентам.

Из 34 пациентов с раком легких и метастазами, т.е. когда раковые клетки распространились по всему организму, девять вышло из эксперимента, потому что их болезнь прогрессировала слишком быстро. У пяти пациентов рак перестал прогрессировать на период от нескольких месяцев до нескольких лет, а у восемнадцати был зарегистрирован появившийся после вакцинации стойкий иммунный ответ организма на клетки рака.

Гленн Дранов сообщил, что сейчас проводится большое количество исследований противораковых терапевтических вакцин. Большинство ранее полученных результатов относилось к достаточно редким типам рака, например, меланоме. Создание вакцины против такого распространенного заболевания, как рак лёгких, практически не рассматривалось. «Наши результаты в этом направлении очень предварительные, но они вдохновляют, – добавляет Дранов. – Чтобы стать общепринятой практикой новому методу предстоит выдержать несколько фаз клинических испытаний».

По мнению многих учёных, в ближайшие годы ДНК-вакцина «окажется в числе наиболее эффективных средств уничтожения раковых клеток в организме пациента (В.Г. Дебабов, 1997, и др.).

До сих пор в клинической практике мишенью для стандартных методов лечения, кроме химиотерапии, является не причина рака, а лишь его симптомы. Прогресс молекулярной онкологии предложил принципиально новый подход – лечить не рак, т.е. следствие, а его причину – раковую клетку и её потомки. Для лечения от рака это имеет принципиальное значение, так как рак – не одно целое, а состоит из расселяющихся по всему организму пациента клеток-организмов. Поэтому принцип излечения от него сводится к уничтожению каждой его раковой клетки, а значит, рак ликвидируется сам по себе.

ДНК-вакцинация особенно необходима для уничтожения раковых клеток, так как она: 1) преодолевает феномен «ускользания раковых клеток» от иммунного ответа; 2) в раковую клетку можно вводить разные гены: те, что кодирует антигены раковой стволовой клетки, гены цитокинов, гены апоптоза клетки. При этом трансфецированная раковая клетка превращается в «фабрику» по производству вакцины прямо внутри организма. Эта «фабрика» способна работать длительный период – до года.

Акад. Е.Д. Свердлов (1997) отмечает, что «скорость приближения к реальной генной терапии рака весьма значительна. Это связано с тем, что рак настолько опасен и в большинстве случаев настолько быстро прогрессирует, что применение новых методов для спасения обречённых на близкую смерть пациентов, средств для спасения которых не существует, совершенно оправдано с этической точки зрения».

Теперь для многих раков разного типа клетки доказано, что раковая клетка возникает из стволовой клетки ткани, в результате генетических нарушений в ней. И так как стволовая клетка делится асимметричным способом, то и состав её клеток-потомков в составе рака оказался разным.

В нём два типа клеток: наименьшая часть их – это потомки раковой стволовой клетки, поддерживающие жизнь клеток рака. Основная же масса клеток – это нераковые клетки, выполняющие функции клеток ткани, после чего они погибают сами естественным способом, т.е. через апоптоз.

Таким образом, в составе одной опухоли – рака, два разных типа клеток,

т.е. две разные мишени. При этом раковая стволовая клетка – это мишень номер один для диагностики рака и она же мишень для разработки новых лекарств и средств ликвидации раковых стволовых клеток, т.е. излечения от рака.

Нераковые клетки в составе клеток рака не являются мишенью для диагностики и лечения, так как достаточно уничтожить каждую раковую стволовую клетку в составе рака и рак ликвидируется, так как после этого нераковые клетки, как короткоживущие, будут погибать сами через апоптоз. Отсюда важное следствие: для изготовления любого типа онко-вакцин необходимо брать только раковые стволовые клетки

Для ДНК-вакцины гены белков должны вводиться в раковые стволовые клетки, а для других вакцин, например, для вакцины на основе дендритной клетки – белки-антигены от раковой стволовой клетки. Но для этого необходимо прежде выделить раковые стволовые клетки из клеток рака. Это можно сделать с помощью моноклональных антител или моноклональных Т-клеточных рецепторов (mTKR) к белкам-антигенам раковой стволовой клетки.

Исследователи из Италии первыми на примере вакцины на основе дендритных клеток показали выраженную эффективность использования для вакцины белков-антигенов раковой стволовой клетки в экспериментах на мышах при лечении их от глиомы головного мозга. Это учёные объяснили тем, что при этом цитотоксические Т-лимфоциты прицельно активируются против пула раковых стволовых клеток в составе клеток рака.

#### **10.4. Вакцина на основе «гена tag7» для уничтожения раковых клеток и профилактики их возникновения**

При любой инфекции человека возбудитель – бактерия или вирус извне. Бактерия – прокариот, а раковая клетка – это клетка своего организма и эукариот. Эти резкие отличия вызывают иммунный ответ организма против возбудителей: В- и Т-лимфоциты распознают их по белкам-антигенам и уничтожают.



При повторном инфицировании организма эти возбудители будут сразу уничтожены, так как их уже «запомнила» иммунная система. Организм повторно реагирует на антигены возбудителя быстрее и эффективнее, чем в первый раз.

Иммунная система организма призвана сохранять «свое» и устранять «чужое», реагируя не на клетку, а на ее белки – антигены.

Но совсем иная картина, когда рак возникает от причины внутри этого же организма – раковой клетки, возникшей из нормальной клетки.

Проф. С.Л. Киселёв (2003) говорит: «...иммунная система тут беспомощна, так как не различает в раковых клетках «чужое»: ведь это свои клетки, почти родные».

К. Вентер (2000) объясняет это так: «дело в том, что сигнал о «чужеродности» иммунная система получает от антигенов – особых молекул, находящихся на поверхности клетки. А поскольку антигены на раковых клетках «свои», то сигнала опасности организм не получает и иммунного ответа не возникает».

Вакцина от рака может быть эффективной только тогда, когда белки-маркеры на раковой клетке будут белками-антигенами. Выход для этого один: необходимо модифицировать поверхность раковой клетки чужими для иммунной системы организма пациента белками.

То есть искусственно создать на поверхности раковых клеток, взятых с помощью биопсии от пациента, чужеродный белок-антиген. Тогда иммунная система пациента сможет распознавать эти белки-антигены как чужеродные. Действуя на них, иммунная система будет уничтожать их носителей, т.е. раковые клетки.

Но это означает, что мы будем лечить уже рак, а это не просто даже с помощью вакцины.

Известно, что при введении в клетку какого-либо гена, в ней будет синтезироваться кодируемый геном белок. Если этот белок – цитокин, то такая рако-

вая клетка вызовет ответ Т- и В-лимфоцитов иммунной системы (Г.П. Георгиев и соавт., 2003).

Часто в практике в качестве цитокина используют: GM-CSF – стимулятор образования колоний гранулоцитов и макрофагов, а также IL-2, IL-12 и др.

Под влиянием цитокина раковая клетка атакуется антигенпрезентирующими клетками – дендритные клетки, макрофаги и В-лимфоциты. Такая клетка захватывает белок-антиген и расщепляет его до пептидных фрагментов, которые связываются внутри клетки с молекулами HLA I класса и представляются Т-лимфоцитам. Они после «обучения» распознаванию антигенов раковой клетки становятся цитотоксическими Т-лимфоцитами, и, атакуя их, уничтожают раковые клетки.

Вначале путём биопсии опухоли берётся из неё фрагмент. Из его клеток выращивают на питательной среде колонию раковых клеток. Методом трансфекции вводят в эти клетки ген, кодирующий данный цитокин, с промотором, регулирующим экспрессию данного гена. Затем эти модифицированные раковые клетки облучают и вводят обратно, в организм пациента. В организме они синтезируют цитокин, и цитотоксические Т-лимфоциты находят по белкам-антигенам раковые клетки, в том числе клетки метастазов, и уничтожают их.

Проф. С.Л. Киселёв и его группа под руководством акад. Г.П. Георгиева (1998) впервые открыли «ген tag7» у человека, который кодирует белок Tag-7, клонировали его, изучили структуру и структуру его белка. Это новый ген и новый белок.

Об этом гене и его продукте – белке Tag7 стало известно следующее.

1. В подавляющем числе раковых клеток разного типа ген не экспрессируется, т.е. его иРНК нет среди иРНК в этих раковых клетках. Другими словами, с возникновением раковой клетки любого типа этот ген «не связан».

2. Ген экспрессируется в различного типа лимфоцитах, «причём его белок – Tag7 образуется только в части этих клеток», и преимущественно локализуется на наружной мембране клеток.

3. Белок гена выявляется в разных клетках – макрофагах и других типах клеток «в зонах на границе с окружающей организм средой».

4. Белок гена отсутствует в большинстве раковых клеток, но он имеется в клетках стромы опухоли, а также в межклеточном пространстве, т.е. это секретируемый во внешнюю среду белок.

Изучение свойств белка – продукта гена tag7 выявило следующее:

1) Инкубация разных типов раковой клетки с культуральной средой, содержащей белок Tag7, показала, что этот белок токсичен для раковых клеток: значительная часть клеток-мишеней подвергается апоптозу, «такая гибель клеток под влиянием Tag7» достигает максимума уже через 6 часов.

2) Высокая цитотоксичность белка Tag7 создаёт трудности при работе с ним.

При трансфекции нормальных клеток в культуре геном tag7 с промотором в случае синтеза ими большого количества белка Tag7, такие клетки в скором времени от него погибали. Только клетки с низким уровнем синтеза белка, способны нормально жить в культуре.

3) Подавление роста опухоли при экспрессии её клетками, введённого в них гена tag7.

Было отобрано две группы раковых клеток: контрольная без модификации геном tag7, а другая группа – с модификацией этим геном под контролем промотора.

Произведена перевивка раковых клеток подкожно в область бедра изогенным мышам. В контрольной группе возникли опухоли, они быстро росли и через 1-1,5 месяца мыши погибали.

Опухоли из модифицированных раковых клеток «росли в несколько раз медленнее и даже через 4 месяца размеры их не достигали размеров опухолей контрольной группы, которые они имели через месяц». Кроме этого, у «большинства мышей в этой группе через более длительные сроки опухоли рассосались».

Изменялся и характер роста опухоли. В контрольных опухолях уже через две недели возникали некрозы, а в опухолях, из клеток, синтезировавших Tag7, некроза не было.

Используя антитела против Tag7, учёные установили, что «подавление роста опухоли непосредственно связано с образованием белка Tag7».

4) Ингибирование роста немодифицированной опухоли у мышей трансфецированными геном tag7 раковыми клетками. Для этого в одно бедро мыши прививали трансфецированные геном tag7 раковые клетки, а в другое бедро – клетки немодифицированной опухоли, «которые служили моделью метастаза».

И в этом случае модифицированные раковые клетки подавляли рост отдалённой немодифицированной опухоли. Степень подавления роста опухоли была от «почти полного подавления до умеренного эффекта».

При введении животному немодифицированных раковых клеток вблизи от привитых трансфецированных геном tag7 раковых клеток, рост опухоли из этих клеток подавлялся. При этом в раковых клетках резко снижалось количество делящихся клеток, и во многих раковых клетках возникал апоптоз. Через несколько месяцев опухоли рассасывались – за счёт апоптоза, а опухоли без введения в её клетки гена tag7 быстро росли, и животное погибало через месяц.

5) Роль гена tag7 в защите против раковых клеток.

Цитотоксические Т-лимфоциты распознают раковые клетки в организме животного по наличию на раковой клетке чужеродного белка Tag7 и атакуют их.

При контакте таких активированных цитотоксических Т-лимфоцитов с раковыми клетками, они выделяют токсические белки, которые вызывают апоптоз в раковых клетках.

Токсические белки присутствуют в среде в очень малом количестве, среди них был обнаружен белок Tag7. Антитела против белка Tag7 подавляли токсичность на 90%. Отсюда ясно, что токсичность вызывается в основном белком Tag7, выделяемым цитотоксическими Т-лимфоцитами.

6) Профилактическое действие нежизнеспособных раковых клеток, синтезирующих белок Tag7.

Для этого были использованы клетки меланомы мыши, в них ген tag7 не экспрессируется.

Одну группу мышей иммунизировали клетками меланомы, в которые не вводили ген tag7. Другую группу мышей иммунизировали клетками меланомы, в которые ген tag7 с промотором был введён с помощью липосом. Такие клетки экспрессируют ген в течение нескольких дней, а затем обычно погибают. Через неделю мышам обеих групп подкожно прививали клетки мышинной меланомы.

Вакцинация немодифицированными клетками меланомы «никакого влияния на рост у животного перевитой меланомы не оказывала». Зато рост привитой такими клетками меланомы у мышей, иммунизированных модифицированными клетками меланомы, сильно подавлялся: «у части мышей опухоли из этих клеток вообще не возникали, а у других рост меланомы был замедлён».

Для дополнительного контроля, учёные модифицировали также клетки меланомы введением в них гена наиболее эффективного цитокина, стимулирующего образование колоний гранулоцитов и макрофагов, т.е. GM-CSF.

Оказалось, что профилактическое действие белка Tag7 было даже более сильным, чем у GM-CSF.

Результаты изучения гена tag7 и свойств его продукта – белка Tag7 позволило учёным создать на основе гена ДНК-вакцину для лечения рака. Это было тщательно проверено при лечении рака в опытах на мышах. Вот её основные этапы.

1. Мышам подкожно вводятся раковые клетки. Из них возникает рак. Без лечения такие мыши погибают от рака через несколько недель.

2. В такие раковые клетки методом трансфекции в культуре вводится ген tag7 вместе с промотором. Для этого в питательную среду добавляют ген tag7 или вводят в составе липосом, либо заражают клетки вирусом, содержащим этот ген с промотором; модифицированные клетки облучают для инактивации размножения – это ДНК-вакцина.

3. Мышам с раковой опухолью делается прививка вакцины подкожно инъекцией её. Клетки вакцины продуцируют белок Tag7. Этот белок-антиген появляется на поверхности раковых клеток. Так как для организма мыши этот белок чужеродный, то иммунная система узнаёт этот белок, и вырабатывает ответ и на него, и на раковые клетки – носители белка, уничтожая их. Иммунный ответ будет в виде антител через активацию В-лимфоцитов и выработку цитотоксических Т-лимфоцитов.

Введение такой вакцины, раковые клетки которой синтезируют цитокин Tag7, не просто активирует иммунную систему мыши, но вынуждает её прицельно атаковать раковые клетки. Это приводит к подавлению роста рака у мышей, во многих случаях опухоли рассасываются за счёт апоптоза раковых клеток от токсического действия на клетки белка Tag7. У мышей вырабатывается иммунитет против того типа раковой клетки, которая входит в состав вакцины. Повторная прививка тех же раковых клеток, против которых применялась вакцина, ведёт к отторжению их. Но «в случае прививки раковых клеток, другого типа, защита отсутствует».

Этот метод лечения рака и предупреждения рецидива рака в опытах на мышах дал очень хорошие результаты, что позволило применить его в клинической практике. При этом ученые считают важным разработку методов введения гена tag7 или его белка «непосредственно в опухоль, минуя этап работы с раковыми клетками вне организма». Для этого могут быть использованы разные средства их доставки – липосомы, вирусы и др. (Рис.1).

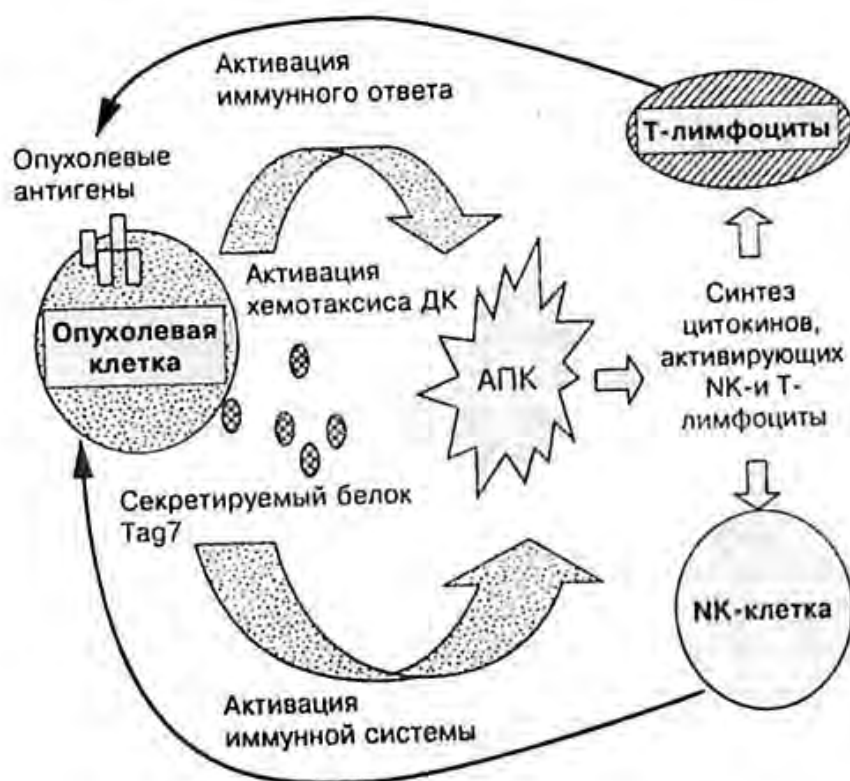


Рис.1. Схема генной вакцинотерапии рака (рис. и цит. по: Г.П. Георгиев и соавт., 2003).

«Сделан прорыв в лечении рака», так называется статья в «Интернет» о начале клинических испытаний первой, разработанной в РФ вакцины от рака на основе «гена tag7», открытого группой наших учёных во главе с акад. Г.П. Георгиевым. Так как материал в статье изложен кратко, но конкретно, мы цитируем его почти дословно.

«Вакцина, полученная методами генной инженерии, вырабатывает иммунитет против конкретного вида опухоли».

«Речь не идёт о профилактических прививках здоровым людям. Вакцина может уничтожить уже имеющуюся в организме опухоль, а также предотвратить повторное её возникновение и появление метастазов, т.е. распространения раковых клеток по всему организму у больных, перенесших операцию по удалению опухоли. Проводимая сейчас первая стадия клинических испытаний в онкологическом центре РАМН должна показать, что такие вакцины, по крайней мере, безопасны. Уже получены обнадеживающие результаты по лечению меланомы — одного из видов рака кожи. Фактически это первые в нашей стране

клинические эксперименты по генной терапии, которые уже несколько лет ведут в Европе и США.

Вакцина, разработанная в Институте биологии гена РАН, основана на генетическом модифицировании опухолевых клеток. Учёные нашли, а затем клонировали ген белка Tag7, который может уничтожать раковые клетки. В здоровом организме такие белки должны вырабатывать клетки иммунной системы – лимфоциты – в ответ на попадание в организм чужеродных клеток, в том числе и раковых. Однако раковые клетки организм иногда принимает как «свои», и иммунный ответ, призванный их уничтожить, не развивается.

Именно эту ошибку исправляет вакцина. Чтобы добиться реакции пораженного организма, берут кусочек опухолевой ткани, вводят в него ген белка-убийцы, а затем эту ткань возвращают в организм человека. В результате иммунная система «учится» распознавать и убивать раковые клетки сначала в определенном месте, а затем во всем организме в целом.

Предварительные эксперименты на животных показали, что иммунитет к определенному виду рака под действием вакцины возникает в 70% случаев. У животных, которым удаляли опухоль хирургически, она повторно появлялась в три-четыре раза реже.

Для «размножения» генетически изменённых клеток в изъятый из организма опухолевой ткани требуется 2-3 месяца. Чтобы не упускать драгоценное для ракового больного время, можно пересаживать ткань с модифицированными клетками, ранее полученную от другого больного. Сейчас в онкологическом центре началось создание «банка данных» модифицированных опухолевых клеток меланомы, которое позволит каждому пациенту подобрать ткань, совместимую с его организмом».

В связи с этой целью, проф. С.Л. Киселев (2003) говорит: «Задача эта могла быть решена, если бы в опухолях разных больных содержались одинаковые белки, которые иммунная система воспринимала как чужеродные и уничтожала вместе с опухолями. И учёные нашли такие белки, исследовав огромное количество больных, – те же самые маркеры, опухолевые антигены.



Оказалось, что «в отличие от самих раковых клеток, которые индивидуальны у каждого больного, маркеры одинаковы у 70% пациентов. А значит и иммунная система этих больных, активированная вакциной, будет реагировать на маркеры одинаково».

«Правда, речь не идёт об универсальной панацее – от всех видов рака», – говорит учёный. – Да, очевидно, это и невозможно: в отличие от других болезней этот недуг разнообразен, и каждый его вид имеет свои специфические особенности».

В настоящее время используются две схемы вакцинации от рака: 1) аутологичная, т.е. пациенту вводят его же раковые клетки, генетически модифицированные с помощью гена *tag7*, и 2) аллогеничная, т.е. используются не свои, а модифицированные раковые клетки геном *tag7* от других пациентов, которые уже получали эту вакцину.

### **10.5. РНК-вакцина – новый способ поиска и уничтожения раковых клеток**

Стандартная лучевая терапия и химиотерапия рака не различают раковые клетки от нормальных клеток, что приводит к гибели последних. То есть оба вида лечения с тяжёлыми побочными эффектами и не уничтожают все раковые клетки в организме пациента.

Раковая клетка отличается от нормальной клетки наличием на своей поверхности белков-антигенов. При сравнении белков, синтезируемых раковой и нормальной клетками одного и того же типа, можно выявить разницу в составе белков. Белки, характерные для раковой клетки и отсутствующие в нормальной клетке, и есть те самые белки-антигены, которые должна распознавать иммунная система пациента.

Но раковая клетка – это «продукт» из нормальной клетки собственного организма. Путем размножения за счёт бессмертия и распространения её потомков за счет свойства к инвазии, она создает самую опасную для человека

болезнь – рак.

Протеом раковой клетки кодируется геномом организма-хозяина, что обуславливает его толерантность и отсутствие иммунного ответа. Известны и другие причины этого.

Только иммунная система обладает системным воздействием против белков-антигенов на раковых клетках. Поэтому учёные давно пытаются использовать клетки иммунной системы пациента для уничтожения раковых клеток.

Так, в Германии для этого используется прививка из убитых раковых клеток, взятых от самого пациента. Как пишут об этом авторы, благодаря прививке этих клеток, в иммунную систему поступает информация: «Так выглядит раковая клетка, нападайте на неё!». Такое же происходит при прививках против вирусной инфекции, когда иммунная система пациента «ознакомлена» с антигенами этого вируса и может усилить иммунный ответ.

Используются два способа прививки раковыми клетками, взятыми от самого пациента.

В первом способе для изготовления прививочного материала берется 5 грамм «массы опухоли», причём первичной и взятой в первой операции или методом биопсии. Первая прививка пациенту вводится «с высокой дозой» убитых облучением раковых клеток. После этого следуют поддерживающие прививки 1-2 раза в месяц в зависимости от ответа иммунной системы пациента. Такая терапия может продолжаться годы и, блокируя возникновение метастазов, «не давать развиваться болезни».

Во втором способе для изготовления материала прививки используются дендритные клетки из предшественников крови и раковые клетки от пациента также из первичной опухоли. Дендритные клетки выращиваются отдельно в культуре с цитокинами. Раковые клетки выращиваются отдельно также в культуре и затем из них выделяют белки-антигены. После этого для изготовления прививочного материала дендритные клетки обогащаются белками-антигенами от раковых клеток. Такую вакцину вводят в организм пациента.

За счёт выращивания дендритных клеток в культуре с цитокинами им-

мунная система «надёжно уничтожает раковые клетки» с помощью двух механизмов: цитотоксическими Т-лимфоцитами и антителами к белкам-антигенам раковой клетки.

Авторы отмечают, что данная методика «активно используется в университетских клиниках для уничтожения всех типов раковой клетки и даёт убедительные позитивные результаты».

Однако, использование комбинации дендритных клеток и специфических белков-антигенов от раковой клетки и её потомков требует идентификации таких антигенов для каждого типа раковой клетки, что является нелёгкой задачей. Кроме того, далеко не для всех опухолей возможно получить достаточное количество белка, необходимого для запуска иммунного ответа.

Компания Merix Bioscience в 2001 г. начала разрабатывать новый подход к уничтожению раковых клеток, который будет подходящим для конкретного пациента. Её метод заключается в стимулировании иммунной системы пациента, что позволяет ей находить и уничтожать раковые клетки. Это достигается РНК-вакциной.

РНК-вакцина состоит из: 1) дендритных клеток от пациента, они контролируют его иммунную систему, и 2) матричной РНК (мРНК или иРНК) из его же раковых клеток. Дендритные клетки готовятся из образцов крови от пациента, а мРНК выделяется из раковых клеток материала биопсии этого пациента.

Как видно, эта вакцина не для профилактики рака, а для уничтожения раковых клеток уже возникшего у пациента рака. Этим онкологи и заняты до настоящего времени. Однако, прогресс в молекулярной биологии и возникновение молекулярной медицины позволяют уже теперь перейти к диагностике и лечению от рака в досимптомном его периоде на уровнях: первой раковой клетки и её первых потомков и даже предраковой клетки или клеток.

Чтобы понять смысл РНК-вакцины, необходимо вспомнить некоторые данные о гене и мРНК.

Ген – это фрагмент ДНК, кодирующий белок или белки. Специфический порядок или последовательность нуклеотидов, из которых состоит этот фраг-

мент, соответствует специфическому порядку размещения аминокислот, из которых построен этот белок.

Схема этапов образования белков в клетке: Ген — мРНК — белки.

Для построения белка необходимо, чтобы произошла транскрипция, т.е. синтез молекулы матричной РНК (мРНК). Затем трансляция этой мРНК, т.е. образование белка с соответствующей последовательностью аминокислот. Белки синтезируются на рибосоме в цитоплазме клетки при участии рибосомной РНК (рРНК) и множества транспортных РНК (тРНК).

В состав РНК входят четыре нуклеотида, в составе которых азотистые основания, несущие генетическую информацию: аденин (А), урацил (У), цитозин (Ц) и гуанин (Г). В ДНК вместо урацила входит тимин (Т) (Рис.1).

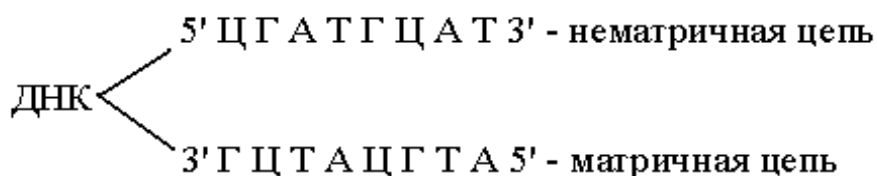


Рис. 1. Схема строения гена.

В фрагменте ДНК две цепи из комплементарных пар оснований: А-Т, Т-А, Г-Ц, Ц-Г и никак иначе. На матричной цепи ДНК как на матрице синтезируется мРНК, исходя из принципа комплементарности пар оснований. На рисунке это нижняя цепь. Последовательность оснований в мРНК та же, что и в нематричной цепи – верхняя цепь. Отличие лишь в замене Т цепи ДНК на У в цепи мРНК. Важно еще то, что мРНК – молекула из одной цепи, т.е. это копия одной из двух цепей гена.

5' Ц Г А У Г Ц А У 3' – цепь мРНК (копия цепи гена).

Синтез мРНК осуществляется ферментом РНК-полимеразой, затем из неё удаляются некодирующие участки – интроны, а кодирующие последовательности оснований – экзоны, соединяются, следуя друг за другом.

Дендритные клетки – это разновидность лейкоцитов. В организме человека их очень мало – всего лишь 0,2% от общего числа лейкоцитов.

В последние годы выяснено, что они помогают иммунной системе выявлять антигены проникших в организм бактерий и вирусов, а также на раковых

клетках. Распознав антигены, дендритные клетки вызывают ответ клеток иммунной системы, которые уничтожают носителей этих антигенов.

Дендритные клетки своими длинными отростками проникают во все ткани, вылавливая антигены, а по ним их носителей в организме. Впервые они были выявлены в коже в 1868 г. немецким учёным П. Лангергансом, по ошибке принявшим их за нервные окончания.

В 1973 г. Р. Стейнмен (Ralph M. Steinman) из США вновь открыл дендритные клетки, исследуя органы у мышей и показал, что они являются очень важным элементом иммунной системы. В опытах на животных эти клетки вызвали поразительно высокую способность стимулировать иммунный ответ на антигены. Р. Стейнмен дал им название – дендритные клетки (от греч. *dendron* – дерево) за шиповидные отростки, похожие на дендриты нервных клеток.

Попытки выделить дендритные клетки из живых тканей предпринимали многие исследователи, но это им не удавалось. В 1992 г. Жак Баншеро (Jaques Banchereau) и его группе из Франции удалось разработать метод их массового выращивания в культуре из стволовых клеток костного мозга человека.

В 1994 г. Антонио Ланцавекья (Antonio Lanzavecchia), вырастила дендритные клетки из клеток крови – моноцитов. При этом в процессе дифференцировки они могут стать либо дендритными клетками, либо макрофагами, уничтожающими носителей антигенов. Для этого они имеют: чашевидные рецепторы на клеточной поверхности – это белки, связывающие антигены. Кроме этого, они способны к фагоцитозу: клетка выпячивает клеточную мембрану и затягивает внутрь «чужака», т.е. вирус или бактерию, или захватывает антигены на раковой клетке.

Захваченный незрелой дендритной клеткой антиген подвергается внутри неё расщеплению. Образующиеся короткие фрагменты – пептиды – распознаются иммунной системой с помощью белков, расположенных на поверхности дендритных клеток.

Дендритная клетка представляет антигены-пептиды другим клеткам иммунной системы при помощи расположенных на её поверхности молекул белка

главного комплекса гистосовместимости – МНС, у человека – HLA.

Молекулы этих белков имеют форму вилки и делятся на две группы: класс I и класс II. Они различаются по структуре и характеру взаимодействия с антигеном. Каждый белок МНС подходит к определённому антигену, как ключ к замку, и за счёт структурной комплементарности связывает его.

Дендритные клетки во многом схожи с антителами, т.е. они улавливают и представляют антиген даже тогда, когда его концентрация «ничтожно мала». Пока в дендритной клетке идет процессинг антигена, т.е. расщепление его с целью представления иммунной системе, они перемещаются с потоком крови и с лимфой в лимфатические узлы. В них они полностью созревают и представляют связанные с белками МНС антигены-пептиды «необученным» хелперным Т-лимфоцитам, ещё не встречавшимся с антигенами.

Обучившись таким путём распознавать конкретный антиген, Т-хелперы стимулируют В-лимфоциты, а они через стадию плазматической клетки производят антитела – белки, называемые иммуноглобулинами. Эти белки связывают и инактивируют данный антиген.

Дендритные и хелперные клетки активируют также цитотоксические Т-лимфоциты, т.е. Т-киллеры – клетки-убийцы, уничтожающие клетки заражённые вирусом, а также раковые клетки.

Некоторые из «обученных» лимфоцитов становятся клетками иммунологической памяти. Такие клетки могут жить в организме длительно – годами, и если антиген снова появляется в организме, они обнаруживают его и вызывают иммунный ответ для уничтожения его носителя.

Дендритные клетки вызывают в организме два типа иммунного ответа: гуморальный, т.е. антителами, и клеточный, т.е. клетками – Т-киллерами.

Тип ответа в основном зависит от того, какие дендритные клетки подают сигнал к атаке и выделение каких цитокинов они стимулируют.

Цитокины – это белки, стимулирующие образование и активацию хелперных Т-клеток. Если в организм проник экзогенный антиген, нужны цитокины типа 2, что вызывает синтез антител. При вирусных инфекциях и при обра-

зовании в организме раковой клетки требуются цитокины типа 1. Они активируют цитотоксические Т-лимфоциты на атаку против вирусов и раковых клеток.

Раковая клетка синтезирует белки-антигены, не свойственные здоровой клетке того же типа. Если бы удалось создать лекарства или вакцины, нацеленные только на эти опухолеспецифические белки-антигены, то раковые клетки уничтожались бы избирательно, а нормальные клетки не повреждались. При лучевой и лекарственной терапии происходит повреждение в одинаковой степени как раковых, так и нормальных клеток, а главное – угнетается иммунная система пациента белками-токсинами из раковых клеток.

Раковые клетки из-за нестабильности генома часто изменяются – на их поверхности меняется состав белков-антигенов. Это позволяет таким клеткам избегать воздействия иммунной системы, вызванного вакциной. Если в раковых клетках прекращается синтез белка-антигена, взятого за основу для создания вакцины, то и сама вакцина уже не даст лечебного эффекта.

На основе дендритных клеток от пациента вакцины для уничтожения раковых клеток получают всё большее применение при раке, например, ДНК-вакцина. Некоторые учёные стремятся упростить этот процесс, воздействуя на имеющихся в организме пациента предшественников дендритных клеток, стимулируя их дифференцироваться и вызывать иммунный ответ против раковых клеток. Дэвиду Линчу (David H. Lynch) удалось открыть цитокин, стимулирующий у подопытных мышей образование дендритных клеток. Трансфекция гена такого цитокина в раковые клетки вызывает синтез в них цитокина в большом количестве, активирующего дендритные клетки у пациента, для уничтожения раковых клеток. Это может стать мощной вакциной против раковых клеток.

#### Приготовление РНК-вакцины на основе дендритных клеток

1. Из раковых клеток пациента выделяют мРНК. Для этого достаточно несколько раковых клеток. Затем мРНК искусственно размножают в условиях лаборатории.

2. Выращивают в культуре дендритные клетки, полученные от этого па-

циента. Насыщают дендритные клетки путём введения в них мРНК, т.е. копии гена белка-антигена раковой клетки. Этот ген в самой клетке вызывает синтез белка-антигена по схеме: мРНК — белки. Затем происходит его разделение, т.е. процессинг, на мелкие фрагменты. В дендритные клетки можно легко ввести мРНК с помощью обезвреженного вируса гриппа. При этом в лабораторных опытах у 90% дендритных клеток синтезировалось значительное количество белков-антигенов.

Когда вакцина введена в организм пациента, модифицированные дендритные клетки легко распознают раковые клетки, стимулируют к массовой атаке цитотоксические Т-лимфоциты, а также выработку антител на клетки рака и надёжно уничтожают их.

РНК-вакцина компании Merix появится на рынке не ранее 2006 г. при соблюдении ныне действующих условий испытания и регистрации. Так как рак является «весьма серьёзной болезнью, в случае получения выдающихся результатов во время клинических испытаний этот процесс может быть ускорен».

Ещё не начато тестирование этой технологии вакцинирования на пациентах. Но клинические испытания безопасности вакцины проводились: в исследовании принимали участие 30 пациентов, страдающих от рака предстательной железы и почек.

По словам доктора J. Vieweg, из Медицинского центра Дьюка университета США, вакцина не только прошла испытания на безопасность, но и привела к «некоторому замедлению» развития рака. Такого эффекта исследователи не ждали, так как в первоначальные испытания вакцины на безопасность были включены только пациенты, чьи раковые клетки не отвечали на традиционные методы лечения. J. Vieweg сказал: «Достигнутый эффект был весьма неожиданным».

Использование мРНК из раковых клеток вместо белка позволяет избежать описанных выше проблем. мРНК — главный компонент клетки, необходимый для синтеза белка в рибосомах. Работа с мРНК позволяет избежать проблемы идентификации важного антигена на раковой клетке, а так как мРНК может



быть искусственно размножена с помощью ПЦР в условиях лаборатории, для её начального выделения достаточно всего нескольких раковых клеток из удаленной опухоли или материала из биопсии опухоли.

«Главным моментом является индивидуализированность этого метода уничтожения раковых клеток, – сказала доктор Isadore Pike, вице-президент клинического отдела. – Используя этот метод, вы точно знаете, что вероятность успеха при лечении конкретного пациента весьма высока, так как эта вакцина специально разработана таким образом, чтобы помочь излечить конкретного человека».

#### **10.6. Ксеновакцина – метод профилактики возникновения раковых клеток и их уничтожения**

Термин ксеновакцина (от греч. xenos – чужой + вакцина – от лат. vaccinus – коровий) означает препарат, применяемый для профилактики и лечения, в данном случае рака.

Для излечения любого типа рака необходимо уничтожение всех раковых клеток в организме пациента. Но достичь этого традиционными методами лечения – хирургия, лучевая терапия и химиотерапия – не удаётся, так как эти методы неадекватны свойствам раковой клетки – инвазии и метастазированию без конца и границ.

Проф. В.М. Моисеенко и соавторы (1997) о возможностях излечения от солидного рака пишут так:

- «смертность в целом от онкологических заболеваний увеличилась»;
- «химиотерапия при солидных опухолях по-прежнему носит преимущественно паллиативный характер, имея целью не излечение, а продление жизни больных ...»;
- «достижение лучших результатов при использовании известных препаратов в настоящее время маловероятно в связи с особенностями механизма их

действия и кинетики опухоли». Это некоторые из ряда причин высокой смертности от рака.

Лучевое лечение и химиотерапия не различают раковые клетки среди нормальных клеток, что приводит к гибели последних, лишают иммунную систему организма пациента уничтожать раковые клетки.

Напротив, иммунная система избирательна: 1) в норме она уничтожает только раковые клетки, не повреждая здоровые клетки; 2) она может применяться системно – для уничтожения разрозненных раковых клеток и метастазов. То есть, можно разработать методы иммунотерапии рака строго специфичные против его клеток.

Так как иммунная система защищает организм человека от инфекций, учёные давно предположили, что она также и защищает против раковых клеток. Но исследования долго не выходили на тот уровень, чтобы выявить степень и механизмы этой защиты.

Распространение раковых клеток по организму пациента без конца и границ то же, что и бактерий при бактериальных инфекциях. Поэтому и была создана химиотерапия, чтобы уничтожить каждую бактерию или каждый вирус при вирусной инфекции, но при этом не повреждая нормальные клетки пациента. Без уничтожения всех бактерий или вирусов не будет излечения и от инфекции.

Это же легло в основу того, что вторым приложением химиотерапии стал рак, чтобы уничтожить все раковые клетки.

У всех болезней, побеждённых при помощи вакцин, есть одна общая черта. Во всех без исключения случаях эти болезни вызываются вторжением в организм человека одноклеточного организма – это бактерия, или вирус – это нуклеиновая кислота + белковая оболочка. То есть эти возбудители не возникают в организме человека «сами по себе». Это имеет место при раке – раковая клетка образуется в организме своего хозяина из нормальной клетки какого-либо типа, затем она создаёт «из себя» колонию клеток-организмов, т.е. рак. Клетки рака отделяются друг от друга и инвазируют в окружающие здоровые

ткани, уничтожая ткани и её клетки, а через кровь часть раковых клеток проникает в ткани других органов и «делают» в них то же самое, ведя пациента, если не пытаться лечить, к смерти.

Такое сходство в распространении раковых клеток с бактериями при инфекциях по организму и привело к антимикробному принципу лечения рака с помощью химиотерапии. Но это же дало идею о том, чтобы уничтожать раковые клетки, используя скрытые силы иммунной системы пациента. Эта идея возникла очень давно.

Ещё в начале XIX в. некоторые врачи пытались добиться этого путём введения в организм пациента убитых бактерий. В 1890 г. американский хирург У. Коли (W. Coley) стал лечить больных, страдающих от рака, с помощью инъекций бактериальных экстрактов, которые стали называть вакцинами Коли. Позднее было доказано, что эти препараты стимулируют фактор некроза опухоли (ФНО). Это белок, который способен нарушать кровообращение в опухоли, уменьшать деление раковых клеток и убивать их.

Чтобы понять её принцип действия, необходимо кратко привести некоторые данные из истории ксеновакцины. Она связана с оспой.

Ещё древними китайцами было замечено, что переболевший оспой человек «больше не заболевает оспой». Это привело к попыткам защититься от инфекции при помощи искусственного заражения инфекционным материалом.

Этот метод получил название вариоляции (от лат. variola – «оспа»). В Китае во II веке до н.э., чтобы не заболеть оспой, применяли такие меры: 1) вдувание в нос здоровому человеку «измельчённые оспенные струпья»; 2) в древней Индии здоровому человеку втирали «струпья» в ссадины на коже и другие меры. Но в «струпьях» сохранялся «живой» вирус, и это было опасно.

Позднее был много попыток перенести идею вариоляции на другие болезни – скарлатину, дифтерию и пр., но без успеха. Вариоляция приводила к болезни в легкой, но не смертельной форме, и главное – к невосприимчивости натуральной оспы.

Польза от вариоляции заключалась в том, что она подготовила почву для идеи вакцинации, которую впервые затем открыл английский врач Эдвард Дженнер (1749-1823).

Пишут, что до Э. Дженнера несколько врачей сообщали о том, что «вариоляция», т.е. прививка натуральной человеческой оспы переболевших коровьей (!) оспой не приводит к болезни.

В одном из журналов в 1769 г. в статье было сказано, что «скотоводы, переболевшие коровьей оспой, считают себя в полной безопасности от человеческой оспы».

Однако, только Э. Дженнер догадался, что «перенесённая коровья оспа является защитой от человеческой, и что прививать нужно не человеческую, а именно коровью».

Для читателя важно заметить, что «прививать нужно не человеческую, а именно коровью оспу». На этом принципе и создаётся ксеновакцина от рака для пациента.

В качестве эксперимента Э. Дженнер в 1796 г. произвёл первую настоящую вакцинацию Дж. Филипсу – мальчику 8 лет против натуральной оспы человека.

Он сделал два небольших надреза на коже руки мальчика и внёс в эти ранки жидкость из оспенного пузырька женщины, заражённой коровьей оспой. Через две недели, после того как у ребёнка прошло лёгкое недомогание, исследователь привил ему натуральную «человеческую» оспу. Болезнь не возникла ни в этот раз, ни в другие, после повторной прививки, сделанной через несколько месяцев.

Так, Э. Дженнером был изобретён термин «вакцинация» от лат. васса, т.е. корова. С тех пор под вакцинацией подразумевают самые разнообразные прививки, а препарат, используемый для них, называют вакциной.

Вакцина против оспы открыла список побеждённых с помощью вакцин ряда опасных болезней – чуму, дифтерию, корь и др. Лишь от рака с распро-

странением и метастазами нет до сих пор для пациента способа избавиться, а тем более предотвратить рак и, может быть, когда-то искоренить.

Никакая бактерия или вирус не создаёт таких проблем, как в ранней диагностике их инфекций, так и в излечении пациента, кроме раковой клетки-организма.

Бактерия и вирус – это для организма человека возбудители болезней извне. Друг от друга они резко отличаются геномом и протеомом. Совсем другое дело с раковой клеткой:

- она возникает внутри своего организма из нормальной клетки – «чужая» для организма пациента из-за изменений в геноме, но всё же для него своя;

- бессмертие раковой клетки и свойство её к инвазии создают самую опасную болезнь – рак, с которым человечество не может справиться уже многие века.

Именно вакцины против рака занимают одно из главных направлений в будущем лечении рака. На этом сконцентрирован научный потенциал во всех странах мира.

Как мы видели, основы иммунотерапии рака были заложены очень давно – токсинами У. Коли. Но в начале XX века к хирургическому методу лечения рака добавились лучевая терапия, а позже широкое применение получила химиотерапия. Надежды врачей-онкологов стали возлагаться именно на эти методы лечения рака, которые и остаются основными до сих пор. По этой причине и по причине отставания науки биотерапия рака осталась в тени. Однако, к концу XX в. стало понятно, что удалить или уничтожить у пациента все раковые клетки этими тремя методами, за исключением редких случаев, невозможно. Это определяется нетипичной причиной рака – его раковой клеткой. Она возникает в самом организме для его уничтожения, после чего погибает и сама.

Как причина рака из нормальной клетки какого-либо типа организма-хозяина, она создаёт пока непреодолимые трудности изготовления против неё профилактической вакцины. Этого нет при создании вакцин против любой бактерии или вируса, так как это возбудители болезней извне.

Протеом раковой клетки кодируется геномом клетки организма-хозяина, и это явно мешает иммунной системе реагировать на белки раковой клетки. На поверхности раковой клетки имеются всегда белки-антигены. Это белки-маркеры для распознавания по ним раковых клеток иммунной системой. Они же – мишени для воздействия вакцин.

Различают два типа белков-маркеров: 1) специфичные антигены, появляющиеся только на поверхности раковых клеток. Это продукты ряда фетальных генов и некоторых мутантных генов-супрессоров клетки; 2) антигены, синтезирующиеся и нормальными клетками, но с меньшей интенсивностью. К настоящему времени изучены белки-маркеры лишь у некоторых типов раковой клетки, но это ещё неполные данные. Изучение протеома раковой клетки только начато.

Для идентификации белков-антигенов раковых клеток используют технологию: 1) выделение кДНК из раковых клеток; 2) клонирование их и получение белков, кодируемых этими генами; 3) тестирование этих белков на роль белка-антигена для вызывания иммунного ответа на эти раковые клетки (С.А. Коростелов, 2003).

Иммунный ответ организма против раковых клеток контролируется генами клеток иммунного надзора. Такими клетками являются лимфоциты: В-клетки и Т-клетки.

В-лимфоциты обеспечивают гуморальный ответ: они производят антитела, которые нейтрализуют бактерии и раковые клетки. Каждая В-клетка имеет молекулу-рецептор только для одного антигена, по которому раковая клетка идентифицируется как «чужое».

Антитела от В-лимфоцита циркулируют в кровотоке и связываются с белками антигенами раковой клетки. Этим они «помечают» их, в результате раковые клетки разрушаются другими клетками иммунного надзора.

Н.А. Попова (2001) пишет, что некоторые белки-антигены раковых клеток вызывают в организме синтез антител. Такие антитела, соединяясь с бел-

ком-антигеном, маскируют его от Т-киллера. Эту же роль играет белок под кодовым обозначением – 5T4, о нём мы пишем в разделе 7.4.

Т-лимфоциты создают клеточный иммунитет – разрушают бактерии и раковые клетки в организме. Сами они не могут, в отличие от В-лимфоцитов, распознавать белки-антигены на раковых клетках. Для этого им нужна помощь вспомогательных клеток – дендритные клетки, макрофаги и др.

Если антитела В-лимфоцита узнают белок-антиген на раковой клетке по его пространственной структуре, то для ответа Т-лимфоцита требуется, чтобы белок-антиген прежде подвергся внутри вспомогательной клетки процессингу. Это процесс расщепления молекулы белка-антигена на короткие пептиды – до 20 аминокислот в одном фрагменте. То есть для распознавания раковой клетки Т-лимфоцитом ему нужна последовательность аминокислот во фрагменте пептида, а не форма белка-антигена.

Такой антиген перемещается на поверхность вспомогательной клетки вместе с белками самой клетки, кодируемыми генами главного комплекса тканевой совместимости – МНС класса I, и представляются цитотоксическим Т-лимфоцитам.

Цитотоксический лимфоцит или Т-киллер при контакте с раковой клеткой-мишенью уничтожает её либо секрецией белка перфорины, образующего в мембране раковой клетки поры, либо путем апоптоза.

Многие раковые клетки разного типа ускользают от реакции клеток иммунного надзора различными путями:

- в раковой клетке может подавляться синтез молекул МНС-1, которые представляют фрагменты расщепленного белка-антигена Т-киллера, тогда ответа Т-киллеров на раковую клетку не будет;
- в раковой клетке могут возникать мутации генов, что изменяет состав белков-антигенов;
- раковая клетка способна подавлять иммунный ответ, секретируя супрессивные белки, например, TGF-b.

Важную роль в защите от раковых клеток играют натуральные киллеры (НК) и активированные макрофаги – АМ. Натуральные киллеры имеют ряд молекул-рецепторов: одни активируют их функцию, а другие подавляют.

Так, снижение или отсутствие экспрессии белка МНС-1 на поверхности раковой клетки позволяет ей ускользнуть от Т-киллера. Но это является сигналом для активации НК. Они уничтожают раковые клетки теми же двумя путями, что и Т-киллеры.

В здоровом организме человека постоянно возникают раковые клетки, но при нормальном состоянии генов клеток иммунного надзора, они уничтожаются (Р.В. Петров, 2003).

Причины возникновения раковых клеток: во многих клетках организма ежедневно возникают повреждение в их ДНК токсическими продуктами кислорода – перекись водорода и др., ошибками при репликации ДНК, ошибками в процессе репарации ДНК и др. Отсюда следует, что предотвратить возникновение раковой клетки где-то в ткани организма невозможно.

По его мнению, если гены иммунного ответа не смогут обеспечить достаточный иммунный ответ, тогда возникает раковая клетка, а затем из неё рак.

Для всех до сих пор привычно, что вакцина обычно предназначена для двух целей: 1) предупреждение болезни, – обычно инфекции, и 2) для излечения болезни, действуя против возбудителя инфекции.

Однако против рака нет профилактической вакцины, так как учёным пока не удалось обнаружить общий белок, синтезируемый в раковой клетке каждого типа. Пока на такую роль могут претендовать: белок под кодовым обозначением – «5T4» и фермент теломераза. Акад. Г.И. Абелев (2002) для выхода из этого тупика дал подсказку: попробовать для этой цели детально изучать состав иРНК из раковых клеток разного типа.

Из-за свойства к инвазии раковой клетки и его последствий следует, что рак лучше предупредить, чем лечить, так как распространяющиеся по организму пациента раковые клетки стандартными методами нельзя все уничтожить.



До сих пор в практике методы для диагностики симптомов солидного рака, а не его причины – раковой клетки и её потомков.

Если говорить словами наших учёных – А.В. Лихтенштейн, Г.И. Потаповой (2005), то это «борьба со злокачественной опухолью в момент, когда «битва» уже в значительной степени проиграна».

Поэтому они пишут так: «Значительно более благодарной мишенью для терапевтического воздействия является предшествующий опухоли массив мутантных клеток, не обладающих ещё свойствами злокачественности». То есть они имеют в виду лечение пациента до начала рака – на этапе предраковой клетки и её первых потомков в ткани у пациента.

Они заканчивают свою статью тем, что так ждут от нас, онкологов, пациенты:

«Всё более актуальным становится мнение о необходимости новой противораковой стратегии – концентрации противораковых усилий на превентивных мерах, способных либо обратить вспять процесс канцерогенеза, либо затормозить его настолько, чтобы отодвинуть момент появления рака за пределы естественных жизненных сроков».

Для лечения уже возникшего у пациента рака учёные вернулись к необходимости создания вакцин от рака. В настоящее время во многих странах, в том числе и в нашей стране, разработан ряд разных вакцин. В нашей стране такие вакцины только начинают «входить» в клиническую практику.

Необходимость создания вакцин от рака обусловлена причинами: 1) солидный рак с размера 2 мм и даже 1 мм в диаметре становится болезнью всего организма; 2) распространение потомков раковой клетки в окружающие здоровые ткани и по организму без конца и границ очень сходно с распространением бактерий при бактериальной инфекции. К сожалению, предупредить в организме пациента возникновение первой раковой клетки наука пока не в состоянии.

Но свойство раковой клетки к инвазии всегда будет вынуждать учёных искать пути создания профилактической вакцины от рака, чем лечить «уже» рак лечебной вакциной.

При раке с симптомами применению любой вакцины должна предшествовать тщательно выполненная операция в области первичного рака и путях метастазирования его клеток.

Однако создание даже лечебной вакцины против раковых клеток оказывается крайне трудным делом: на раковой клетке белки-антигены от своего организма-хозяина. Иными словами, эти белки-антигены кодируются геномом клетки организма-хозяина, что, скорее всего, и обуславливает его толерантность<sup>1</sup> и отсутствие иммунного ответа.

Трудностями для создания даже лечебной вакцины от рака могут быть:

1) кроме белков-антигенов своего организма на раковой клетке, белки-антигены раковой клетки маскируются белком под кодовым обозначением – «5T4»;

2) среди раковых клеток происходит отбор; такие клетки более эффективно противодействуют клеткам иммунного ответа (Г.И. Дейчман, 2000);

3) раковая клетка способна угнетать клетки иммунного ответа, секретируя интерлейкин-10, трансформирующий фактор роста-бета и др.

4) дефекты в механизме синтеза белков HLA-системы – антигенов тканевой совместимости (синоним: МНС). Синтез белков HLA-системы кодируется генами HLA. Различают два основных класса этих генов: I класс и II класс.

HLA антигены I класса представлены на поверхности практически всех клеток организма, белки II класса выражены в основном на клетках иммунной системы, макрофагах.

Антигены HLA выполняют роль своеобразных «антенн» на поверхности клеток, позволяющих организму распознавать собственные и, чужие клетки – бактерии, вирусы, раковые клетки и т.д. и при необходимости запускать иммунный ответ для выработки специфических антител и удаления чужеродного агента из организма;

---

<sup>1</sup> Толерантность (от лат. *tolerantia* – терпение) – полное или частичное отсутствие иммунного ответа на антиген.

5) даже при наличии на раковой клетке специфических антигенов имеется дефект их представления Т-лимфоцитам дендритными клетками: количество дендритных клеток в организме пациента снижено, а сами они по функциям неполноценны (И.А. Балдуева, 2001);

6) добавляется иммунодепрессивный эффект от химиотерапии и облучения при лечении ими пациента от рака.

Это основные причины, которые вызывают недостаточный иммунный ответ организма-хозяина, что позволяет раковым клеткам «ускользнуть» от иммунного контроля.

Эти причины создаются самой раковой клеткой-организмом и лишь одна – отбор, в процессе роста рака. Свойство к инвазии раковой клетки делают бессильными стандартные методы для лечения рака, так как этими методами нельзя распознать каждую раковую клетку, а затем уничтожить их все. Это истинные причины того, что рак самая древняя, но до сих пор неизлечимая болезнь человека во всем мире.

Чл.-корр. РАМН С.Е. Северин и В. Сологуб МНИИ медицинской экологии в 2002-2003 гг. изобрели метод профилактики и излечения от рака разного типа раковой клетки с помощью ксеновакцины на основе живых раковых клеток мыши.

В основе создания ксеновакцины авторов лежит принцип ксеновакцинации для человека от «человеческой» оспы, впервые изобретённый Э. Дженнером в 1796 г. Но в данном случае авторы применили пересадку пациенту, страдающему от рака, живых раковых клеток мыши.

Как готовится учёными из нормальной клетки мыши раковая клетка для ксеновакцины – это их «ноу-хау».

Клетки мыши нужно «заражать» генетическим материалом, обычно чистой ДНК из раковой клетки, что была у пациента. Этой цели может служить метод трансфекции ДНК клеток в культуре, в данном случае – для нормальных клеток мыши. После получения «заражённых» раковых клеток часть колонии клеток инъецируют мышам, чтобы получить у них рак.

Учёные давно пытались создать ксеновакцину, используя раковые клетки животных, в частности, мыши против каждого типа раковой клетки. Но это им не удавалось: введение такой чужеродной вакцины из живых раковых клеток в организм пациента быстро приводило к разрушению этих клеток Т-киллерами пациента из-за клеточной несовместимости.

Проблема была решена с помощью инертного полиакриламидного гидрогеля – ПААГ. Они заметили, что через месяц после подкожного или внутримышечного введения его животным вокруг него формируется соединительнотканная капсула. Тогда у учёных и возникла идея использовать такую капсулу для введения внутрь неё «заражённые» живые раковые клетки мыши.

В. Сологуб, один из авторов работы, говорит: «Год назад лабораторной мыши ввели пятидесятикратную летальную дозу раковых клеток. А перед этим этой мыши ввели вакцину по разработанному здесь методу. Но умирать мышь пока не собирается. Её спасение – в человеческих раковых клетках. На них и основана вакцина для мыши».

Учёные отмечают, что попадание в организм больных клеток другого вида позволяет сильнее активировать иммунитет. Это знали давно: клетки животного – коровы – брали ещё до создания первой вакцины от оспы в конце 18-го века.

Теперь учёные из Научно-исследовательского института медицинской экологии уверяют, что «подошли совсем близко к созданию вакцины против рака, и она основана на мышинных раковых клетках».

Самым трудным для них «оказалось как раз удерживать небольшое количество чужих раковых клеток в организме, – их тут же уничтожали клетки-защитники». Решить этот вопрос удалось с помощью капсулы вокруг введённого гидрогеля.

По словам чл.-корр. РАМН С.Е. Северина, в эту капсулу и впрыскивают живые раковые клетки от больной мыши. Эти клетки призваны «обучать» иммунную систему пациента распознавать раковые клетки и их скопления. В результате иммунные клетки пациента, «запрограммированные» на уничтожение

раковых клеток не могут проникнуть в капсулу и находятся в «постоянной готовности», так как «чувствуют» присутствие «источника заражения». За счёт того, что клетки внутри капсулы живут – питаются, делятся, умирают, – они продукты своей жизнедеятельности выбрасывают в организм человека. И если раковые клетки похожи на те клетки, которые посажены за этот барьер, то у человека формируется устойчивый иммунитет к данному типу раковой клетки.

Пересаженные раковые клетки мышцы сохраняют свою активность в течение длительного времени: в эксперименте на животных – до нескольких месяцев, контактируя с иммунными клетками организма человека лишь на поверхности капсулы. Так наши учёные преодолели проблему совместимости клеток мышцы с клетками человека.

Результаты проверки метода на животных позволили перейти к испытаниям его эффективности против некоторых типов раковой клетки у человека.

Метод ксеногенной вакцинации против меланомы человека успешно был апробирован на пациентах на предмет безопасности для их здоровья в Московском научно-исследовательском онкологическом институте им П.А. Герцена. В эксперименте приняли участие двадцать человек, и учёные смогли сделать предварительные выводы, что метод абсолютно безопасен и в ряде случаев явно способствовал выздоровлению пациентов, – подчеркнул чл.-корр. РАМН С.Е. Северин.

В. Сологуб подчеркивает, что с помощью такой ксеновакцины «иммунитет у пациентов усиливается во много раз». Он и чл.-корр. РАМН С.Е. Северин считают, что «это лучшая профилактика против рака».

Чл.-корр. РАМН С.Е. Северин отмечает, что «Вакцинация здорового человека – это та цель, к которой мы стремимся. Пока до этой цели ещё далеко. Идёт вторая из четырех стадий эксперимента в ведущих клиниках».

По его мнению, «в случае успешного завершения клинических исследований, вакцина может стать первым действительно эффективным способом профилактики и лечения целого ряда рака разного типа клетки».

## **Глава 11. Реверсия раковых клеток**

### **11.1. Индукция реверсии раковых клеток в нормальные – путь их ликвидации**

Термин «реверсия» (от лат. *reversio* – возврат). Этим термином обозначают:

- возврат свойств раковой клетки к норме или возврат её к нормальной клетке;
- утрата раковой клеткой злокачественности;
- созревание раковой клетки до нормально дифференцированной клетки и другое (И.Н. Швембергер, 1976, 1980).

До сих пор причиной канцерогенеза считали изменения структуры генов и аберрации хромосом в клетке; а такие изменения в принципе не обратимы. Из этого был сделан вывод: раковую клетку нельзя превратить в нормальную клетку.

Это одна из причин того, что до сих пор все методы лечения рака – для удаления и уничтожения раковых клеток.

Но есть в литературе примеры спонтанной реверсии раковых клеток, хотя и очень редкие, и множество экспериментов, доказавших, что раковые клетки можно вернуть к нормальному состоянию.

При введении генов-супрессоров в раковые клетки *in vitro* наблюдалась реверсия раковых клеток:

- клетки остеосаркомы имели мутации в гене *Rb1*; введение кДНК нормального гена *Rb1* в эти клетки в культуре вызывало их реверсию;
- в раковые клетки также в культуре вводился нормальный ген *wt53*; под его действием раковые клетки теряли свойства ракового фенотипа. Из работы не ясно, насколько стабильна реверсия раковых клеток в этих опытах (Н.Б. Варшавер, 2000).

T.J. King, R.G. McKinnell (1960) выделили из клетки кератокарциномы почки лягушки ядро и пересадили в оплодотворенную и энуклеированную яйцеклетку лягушки – развились нормальные лягушки. Из этих опытов учёные

сделали два вывода: 1) ядро яйцеклетки может быть заменено ядром раковой клетки; 2) ядро раковой клетки, участвуя в эмбриогенезе, теряет раковые свойства. Недостаток опытов этих авторов: в них нет данных, что генетический материал раковой клетки был нормальным.

В. Минтц (В. Mintz, 1978) проведены опыты на мышах. В бластоцисты вводили по несколько раковых клеток из тератокарциномы мыши. Получено нормальное потомство, ткани их были сформированы клетками донора и клетками хозяина. Нормальные потомки могли вырасти только в том случае, если раковые клетки испытали обратное превращение, т.е. в опытах показана реверсия раковых клеток в нормальные клетки. Позже при анализе кариотипа перенесенных раковых клеток оказалось, что все они были анеуплоидными.

Так было доказано, что причина канцерогенеза – не мутации генов и/или абберрации хромосом, а эпигенетические изменения. Это изменения экспрессии генов: включение генов или их выключение, но без изменения их структуры. В отличие от мутаций, эпигенетические изменения генов обратимы. Это указывает на новый способ ликвидации раковых клеток – их реверсию.

Если причина – мутация гена, тогда воздействовать на него можно только генетически, что не просто. Но так как причина канцерогенеза – эпигенетическое изменение гена, то его можно исправить: ген можно включать и выключать.

Эпигенетические изменения чаще всего осуществляются обратимой химической модификацией в промоторе гена: удаление метильной группы ( $-\text{CH}_3$ ) – ген включен, присоединение метильной группы ( $-\text{CH}_3$ ) – ген выключен.

Включение гена или его экспрессия означает синтез в клетке иРНК – это транскрипция, а затем синтез по ней белка в рибосоме – трансляция. При этом субстратом метильных групп является цитозин (С). Цитозин метилируется лишь тогда, когда за ним в одной цепи ДНК следует гуанин, т.е. CpG, где p – остаток фосфорной кислоты (В.А. Гвоздев, 1999).

Различают два типа распределения дуплетов CpG в ДНК: они рассеянные и одиночные или в виде скоплений и тогда их называют CpG-островками.

Метилирование цитозина осуществляет фермент метилтрансфераза, а деметилирование – фермент деметилаза. Присоединение метильной группы ( $-CH_3$ ) к пятому атому углерода на место атома водорода превращает его в 5-метилцитозин. Метильная группа ( $-CH_3$ ) – это регулятор включения или выключения гена в клетке. Это изменяет состав белков в дочерних клетках, и тем самым изменяются свойства клеток. При делении клетки метильные группы передаются клеткам-потомкам, а, значит, в них сохраняется такой же набор включенных и выключенных генов, что и в материнской клетке.

Перед репликацией ДНК её цепи расходятся, и каждая цепь сохраняет свои метильные группы. Ясно, что после репликации две дочерние молекулы получаются полуметилированными. Но их сразу же метилирует метилтрансфераза в тех местах, где в исходной цепи есть метильные группы.

Если исходная ДНК не метилирована, то и дочерние молекулы будут такими же, так как метилтрансфераза действует только на полуметилированных молекулах ДНК.

Наличие или отсутствие метильных групп является сигналом для белков транскрипции. Включение гена начинается с того, что белок транскрипции узнает специфическую последовательность в промоторе гена и связывается с ним. Лишь после этого РНК-полимераза начинает синтез иРНК, она комплементарна кодирующей цепи гена.

Дело в том, что РНК-полимераза сама по себе не узнаёт последовательность нуклеотидов в промоторе гена, а значит, сама не может соединиться с ним (Р. Холлидей, 1989; В.А. Гвоздев, 1999) (Рис.1).



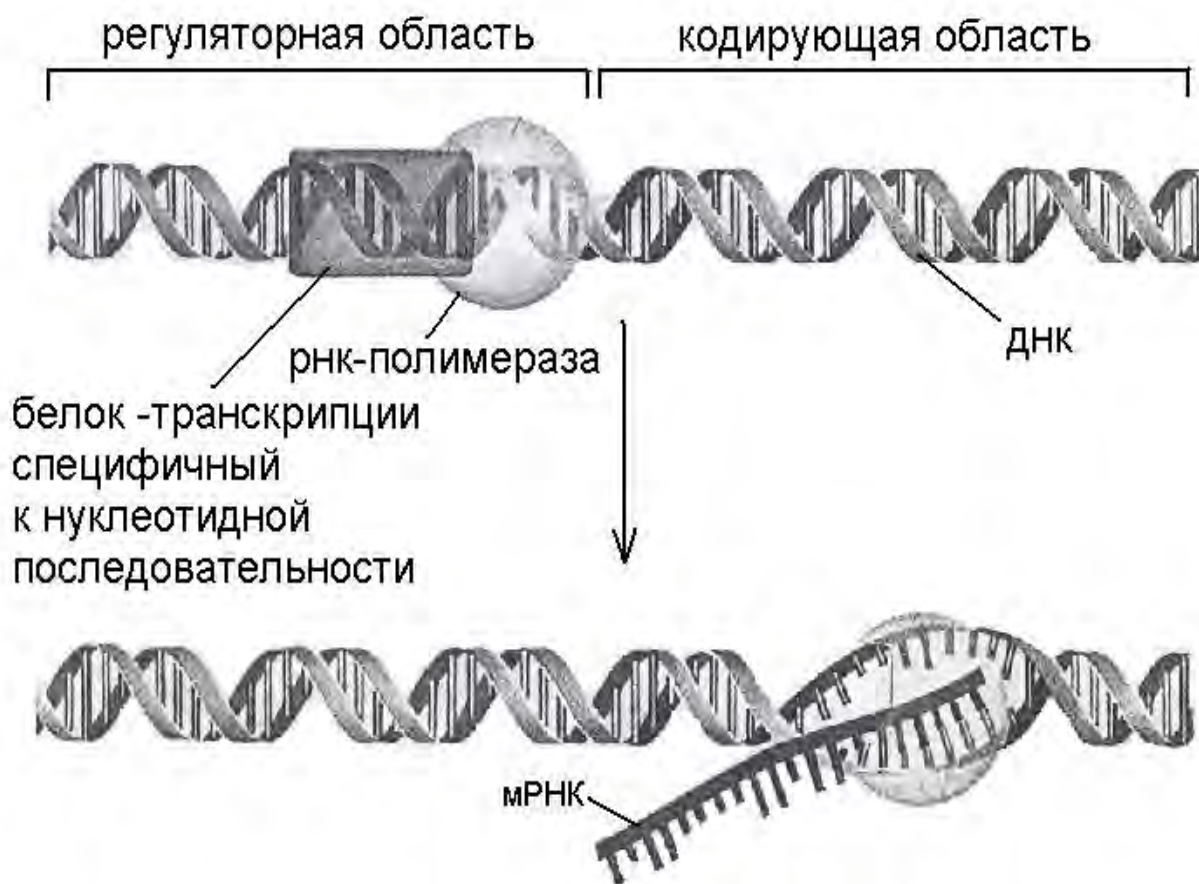


Рис. 1. Белок транскрипции связывается с последовательностью нуклеотидов, и РНК-полимераза синтезирует иРНК (рис. и цит. по: Р. Холлидей, 1989).

В результате метилирования CpG-динуклеотидов в промоторе ген выключается, т.е. репрессируется. Это может иметь две причины: метильные группы препятствуют связыванию белка транскрипции с промотором гена или способствуют присоединению репрессора (Рис. 2).

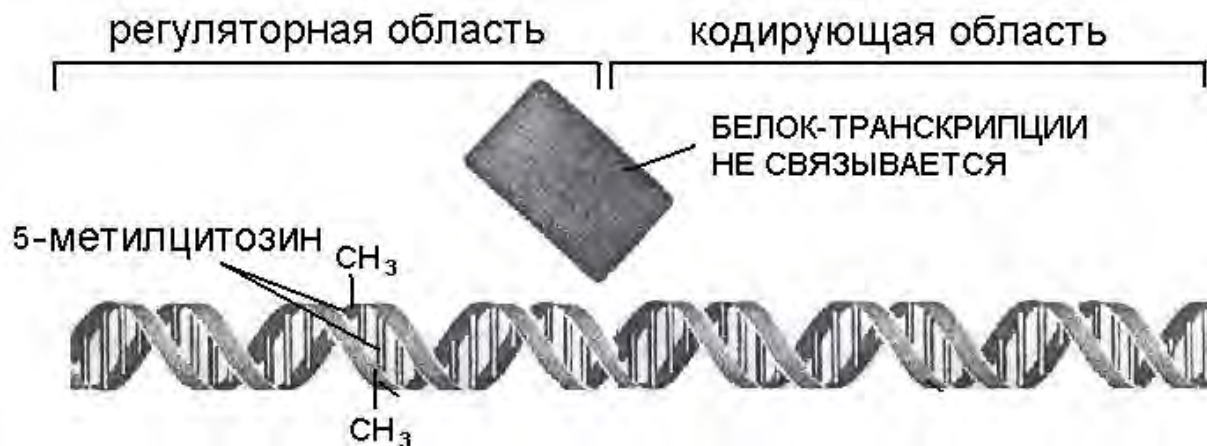


Рис. 2. Присоединение метильных групп  $-CH_3$  к цитозину в составе CpG-динуклеотида. Связывания белка транскрипции с промотором гена не происходит, и ген выключается (рис. и цит. по: Р. Холлидей, 1989) .

У. Гиббс (2004) подчёркивает, что для раковой клетки характерны: снижение метилирования её генома в целом и повышение содержания метильных групп в генах-супрессорах, препятствующих превращению нормальной клетки в раковую клетку.

До недавнего времени, продолжает автор, «многие учёные полагали, что канцерогенез начинается с мутации, выводящей из строя гены-супрессоры. Однако во многих раковых клетках эти гены не содержат никаких изменений в нуклеотидной последовательности» (У. Гиббс, 2004).

В настоящее время клиницисты уже проводят тестирование препаратов против избыточного количества метильных групп ( $-CH_3$ ) в раковой клетке. Такие лекарства должны обеспечивать: либо «отщепление метильных групп от генов, либо препятствовать их присоединению в новых клетках». Такие препараты перспективны, – считает С. Майер (S. Maier). Она же работает над созданием методов диагностики раковых клеток на основе метилирования их генов.

Но, по мнению С. Майер, существует одна проблема: «Все такие препараты деметилируют геном в целом, т.е. не избирательно, что приводит к побочным эффектам». Другой проблемой «для беспокойства является – нестабильность действия: вскоре метильные группы ( $-CH_3$ ) появляются снова, и гены-супрессоры в раковой клетке выключаются».

«Изменение экспрессии генов под влиянием лекарств носит временный характер», – считает Ж.-П. Исса (Jean-Pierre Issa). – Но если изменение будет таким, что иммунная система организма сможет распознавать раковые клетки, или если оно включит процесс апоптоза, то результат так или иначе будет достигнут».

G. Fichera (1932) впервые для реверсии раковых клеток использовал экстракты эмбриональных тканей, а теперь из них выделяют фетальные белки – альфа-фетопротеин и другие.

Понимание этого вызывает интерес к изучению взаимодействия раковых клеток с эмбриональными клетками и тканями. Это открывает пути к индукции реверсии раковых клеток в нормальные клетки.

Во многих странах исследования ведутся по трем направлениям:

- культивирование раковых клеток в присутствии эмбриональных клеток и экстрактов;
- введение раковых клеток в сингенные эмбрионы;
- введение эмбриональных экстрактов или эмбриональных белков в раковую опухоль, а также и внутримышечно в организм.

Д-р Линне-Мари Постовит и её группа (2005) из США показали, как микросреда эмбриональных стволовых клеток человека стимулирует реверсию метастатических клеток меланомы в нормальные клетки.

Они создали трёхмерную коллагеновую матрицу, которую предварительно заселяли эмбриональными стволовыми клетками человека и давали им несколько дней на формирование колоний и подготовку микросреды. Затем эти клетки удаляли, а микросреда оставалась в матрицах нетронутой. Потом микросреду матриц засеивали клетками меланомы и оставляли на несколько дней, а затем проводили молекулярный и функциональный анализ.

Результаты: у клеток меланомы изменялась программа, и они начинали секретировать протеин Melan-A, связанный с меланоцитами, и образовывать колонии, подобные колониям эмбриональных стволовых клеток человека. Клетки становились менее инвазивными, чем меланомные клетки, не испытывавшие на себе воздействие этих матриц.

Учёные подчеркивают, что «эти результаты дают новый подход к изучению возможных последствий выявления факторов микросреды, созданной человеческими эмбриональными стволовыми клетками, которые влияют на обращение метастатических свойств опухолевых клеток».

Известно, что в составе клеток рака часть клеток имеет признаки дифференцировки. Поэтому возникло предположение, что с появлением их дифференцировки, злокачественность раковых клеток должна снижаться (G.B. Pirce,

1970; G.B. Pierce, L.D. Jonson, 1971; G.B. Pierce, 1972; И.Н. Швембергер, 1978, 1980).

G.B. Pierce, G. Wallace (1971) изучали роль дифференцировки в реверсии раковых клеток. Крысам делали прививки клеток из ороговевающего рака и изучали методом автордиографического анализа.

Через 2 ч после введения Н-тимидина мечеными были только недифференцированные участки рака, а уже через 96 ч клетки, связавшие Н-тимидин, обнаруживались в дифференцированных участках рака в составе «раковых жемчужин».

Выделение раковых клеток из дифференцированного участка и попытка прививки их животным – не вызывала рак, тогда как такое же количество клеток из недифференцированного участка – давало рост рака. Из этого ясен вывод: дифференцировка раковых клеток приводит к утрате у них злокачественных свойств и превращает их в нормальные клетки. Известно, что дифференцированная клетка после выполнения функций прекращает делиться и погибает через апоптоз. Это путь ликвидации раковых клеток не методами уничтожения их, а через их реверсию в нормальные клетки (Л. Сакс, 1986; В.А. Галицкий, 2003).

А.П. Савононская (1952) вводила по 10 млн. клеток первичной саркомы Уокера крыс в крысиные эмбрионы, находящиеся на ранних стадиях развития. Оказалось, что клетки, введенные в эмбрионы в течение первых двух третей беременности, не вызывали рак, а введенные в последнюю треть дали рост саркомы на эмбрионах.

Эти опыты показали, что при введении раковых клеток в эмбрионы раннего периода они подвергаются воздействию какого-то фактора и происходит их реверсия в нормальные клетки. В последнюю треть срока этого фактора нет – нет и реверсии клеток саркомы.

Из исследований Л. Сакс (1986) и В.А. Галицкого (2003) следует, что фактором реверсии в приведённом опыте мог быть фактор роста, к которому на раковой клетке обычно сохраняется рецептор. Связывание фактора роста с ре-

цептором на раковой клетке включает в ней ген дифференцировки, и она превращается в дифференцированную нормальную клетку, а вместе с этим утрачивает все свойства раковой клетки.

W.E. Poel (1964) провёл анализ всех типов канцерогенеза. По его мнению, «во всех этих случаях нет доказательств, что канцерогены действуют и вызывают необратимые изменения в тех клетках, которые претерпевают злокачественное перерождение, но все они прямо или косвенно вызывают нарушения регуляции размножения клеток, т.е. эпигенетические изменения».

Канцероген является «веществом, которое способно изменять характер репрессии генов – веществом, способным «снимать»  $-CH_3$ -группы, экранирующие промотор гена и тем самым вызывать дерепрессию определенных генов в клетке.

Дж. Пирс (G.B. Pierce, 1972) на основе анализа ряда эмбриональных и неэмбриональных раков разного типа клетки предложил схему канцерогенеза.

В основе канцерогенеза, по мнению Дж. Пирса, лежит воздействие на клетку-мишень канцерогена, что вызывает эпигенетические изменения в её определённых генах – включение одних генов и выключение других: нормальная стволовая клетка – раковая стволовая клетка, а из неё образуется раковая стволовая клетка и нормальная дифференцированная клетка.

Такая концепция канцерогенеза, с точки зрения Дж. Пирса, «объясняет безнадежность борьбы с раком с помощью цитотоксических веществ, а указывает иной путь – направленное изменение экспрессии генов и реверсию раковых клеток в нормальное состояние».

Для этой цели во многих странах и в нашей стране готовят препараты из эмбриональных и плацентарных тканей человека.

1. С.Ю. Родионов и соавторы (1995) применили экстракт из фетальных тканей человека для лечения инкурабельных пациентов IV клинической группы с различными типами рака.

Основаниями для этого служили: появление на поверхности раковых клеток и в сыворотке крови пациента фетальных антигенов, в норме обнаруживаемых только в тканях эмбрионов.

Однако, иммуногенность белков-антигенов на поверхности раковых клеток мала. Одной из причин этого является экранирование антигенов антителами. Основным из них на раковой стволовой клетке любого типа является фетальный белок под кодовым обозначением – «5T4».

Авторы считают, что введение экстрактов фетальных тканей «снимает» с поверхности раковых клеток антитела и открывает эпитопы антигенов для узнавания клетками иммунной системы пациента.

Исследования эмбриональных фетальных тканей в опытах на животных по стандартной схеме доклинических испытаний, показали отсутствие токсического действия на организм, способность стимулировать клеточную иммунную реакцию и фагоцитоз.

Авторы провели лечение пациентов экстрактом из фетальных тканей человека и получили результаты: из 39 пациентов, страдающих от рака, применение таких препаратов дало эффект у 20 (51,2%), а сроки ремиссии от 2 мес. до 4 лет.

2. Д-р С. Пеленгарис (S. Pelengaris, 2002) и её группа из Глазго (Англия), а также проф. Д. Фелшер (D. Felscher, 2002) из США изучили роль гена c-myc в возникновении раковой клетки из нормальной клетки в культуре и в опытах на мышах. На основании результатов исследований авторы заключили:

- «представление, что для канцерогенеза необходимо множество мутаций в нормальной клетке, неверно»;

- «причиной возникновения раковой клетки может быть всего один ген и его продукт, известный как – c-Myc. Именно в нарушении регуляции его экспрессии на фоне нарушений в апоптозе учёные видят причину образования раковой клетки».

Эти же учёные из Глазго с коллегами из Сиэтла, США (2002), нашли способ «выключать» ген c-myc, «делающий раковые клетки смертельными».

Оказалось, что известный антибиотик доксициклин останавливает деление раковых клеток.

На мышах был поставлен опыт с генетически модифицированными клетками печени: до тех пор, пока животным добавляли в корм доксициклин, рак у них не возникал. Когда антибиотик давать прекращали, у них опять начинался рак этого органа. После того, как мышей снова «посадили» на антибиотик, у них началась стремительная ремиссия: рак исчез, а клетки печени не проявляли никаких отклонений от нормы. То есть учёные смогли по своему желанию «включать» и «выключать» опасный ген, вызывающий рак.

Авторы пишут, что в странах мира «рак поражает каждого третьего человека и убивает каждого пятого». «Теперь выявлено лекарство, которое может блокировать раковые клетки». Но «интересно уже то, что раковые клетки можно преобразовывать обратно в нормальные», заключают учёные.

3. «Вакцинация эмбриональными стволовыми клетками предотвращает рак у мышей», – так называется статья учёных университета Луизианы (США), работающих под руководством проф. Джона Итона (John Eaton, 2006).

Учёные показали, что вакцинация эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) предотвращает рак лёгких у мышей, подвергающихся воздействию канцерогенных веществ или трансплантации раковых клеток.

Было обнаружено, что вакцинация ЭСК предотвращает рак с эффективностью 80-100% в случае прививки клеток карциномы Льюиса и 60-90% в случае воздействия канцерогенов.

Учёные проверяли два типа вакцин против раковых клеток. Один тип состоял только из ЭСК, взятых из мышинных бластоцист. Другой тип – из этих же ЭСК в комбинации с фибробластами, синтезирующими гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста (GM-CSF). Такие фибробласты (STO) используют в качестве фидера – питающей подложки, на котором выращивают ЭСК, что поддерживает ЭСК в недифференцированном состоянии.

Этапы эксперимента. На первом этапе – мышам делали инъекции одной или другой вакцины, на втором этапе – одним мышам трансплантировали клетки карциномы лёгких Льюиса, а на других мышей воздействовали веществом – 3-метилхолантрен, вызывающим рак лёгких.

Результаты. В случае заражения клетками карциномы ЭСК предотвращали рост рака в 80% случаев, а ЭСК в сочетании с STO/GM-CSF – в 100% случаев.

При воздействии канцерогена первый тип вакцины действовал с 60% эффективностью, а второй – 90%. В течение 27 недель наблюдения у соответствующего процента мышей не развивались опухоли. У тех вакцинированных мышей, у которых опухоли всё-таки выросли, размер их был на 80 – 90% меньше, чем у невакцинированных животных. Опухоли развились у всех без исключения мышей контрольной группы, которым не проводили вакцинацию, как в результате трансплантации клеток карциномы, так и в результате воздействия канцерогена. Ни у одной из вакцинированных мышей не наблюдалось побочных эффектов – аутоиммунная реакция или угнетение стволовых клеток костного мозга.

«Учёные считают, что предотвращение вызванного канцерогенами рака – более важный результат их работы, так как эта модель ближе к реальной жизни, чем трансплантация раковых клеток». Этот эффект вакцинации эмбриональными стволовыми клетками учёные объясняют тем, что стволовые и раковые клетки вырабатывают ряд сходных белков. Вакцинация приводит к выработке иммунитета против раковых клеток, содержащих эти белки.

На наш взгляд, основной причиной эффекта с помощью этой вакцины могла быть индукция реверсии раковых клеток, что продемонстрировано в опытах с клетками меланомы *in vitro* в микросреде от эмбриональных стволовых клеток человека Л.-М. Постовит (2005).

Открытие учёных позволяет им надеяться на разработку клеточных вакцин для людей с повышенным риском рака или подвергающихся воздействию канцерогенов.



Тестировать новую противораковую вакцину на людях учёные считают преждевременным из-за возможных побочных эффектов. Не исключено, что такая вакцинация может вызывать реакцию клеток иммунной системы на собственные стволовые клетки организма. Но проф. Джон Итон полагает, что «дальнейшее совершенствование метода позволит избежать этого риска».

В настоящее время он и его группа изучают возможности предотвращения при помощи своих вакцин различных типов рака, вызванных канцерогенами, а также «вакцинируют старых животных, чтобы предупредить гормонально-зависимые опухоли, которые обычно развиваются у многих из них».

Материалы исследования были доложены на международном онкологическом симпозиуме EORTC–NCI–AACR в Праге (2006). (Источник: [www.medlinks.ru](http://www.medlinks.ru).)

## **Заключение**

Р. Вирхов (1821–1902) впервые заявил, что любая болезнь возникает «от патологии клетки или клеток». Теперь это всеми подтверждено, и ключ к проблемам любой болезни нужно искать именно в клетке.

Клетка – это место болезни, а её причина внутри клетки: на молекулярном уровне – сегодня, а на уровне атомов и их электронных оболочках – в будущем.

Причина любой болезни на молекулярном уровне – это изменения в геноме и протеоме клетки. Для каждой болезни эти изменения свои. Эти изменения и есть – «патология клетки или клеток». Главная задача науки – познать в деталях эти изменения.

Древнее и опаснее для человека болезни, чем рак, в медицине нет. Это связано с его нетипичной причиной – раковая клетка. Но термин «рак» не выражает ни причины и ни сущности болезни.

Рак возникает от патологии одной клетки. На первом этапе нормальная клетка превращается в раковую клетку, т.е. создаётся причина. На втором этапе раковая клетка путем размножения создает следствие – колонию дочерних клеток, т.е. рак.

Что удивляет в раковой клетке? То, что при других болезнях клетка-причина либо погибает сразу или как дефектная после выполняет функций своей ткани. Раковая же клетка из-за изменений в геноме становится клеткой-организмом и неуязвимой для организма-хозяина.

Как видно, рак – не одно целое, а представляет колонию из клеток-организмов – потомков из одной раковой клетки, которые расселяются в тканях без конца и границ.

При солидном раке часть его клеток создает скопления: первичный очаг рака и его метастазы – это симптомы рака. Это причины того, что все трудности диагностики и излечения не в раке, а в его раковых клетках:

- нет в организме пациента раковой клетки, не будет и рака;

- если уничтожены в процессе лечения все раковые клетки, рак сам собой ликвидируется.

Из-за отставания науки о раковой клетке объектом диагностики и лечения стали и пока остаются симптомы рака, т.е. следствие, а не его причина – раковая клетка. Теория канцерогенеза из стволовой клетки меняет многое в знаниях о раковой клетке и её следствии – раке.

В учебном пособии мы сделали акцент на раковую клетку, чтобы познать её следствие – рак. На этой основе изложены решения проблем ранней диагностики и излечения от рака, а теперь подчёркнем основные положения.

1. Раковая клетка – это стволовая раковая клетка. Она возникает из стволовой клетки или из любой дифференцированной клетки ткани, ставшей стволовой.

Молекулярные причины: нарушения в геноме клетки. При этом строение последовательности нуклеотидов генов не изменяется, а нарушается функция генов.

В основе изменений лежат дерепрессия в норме неактивных генов фетальных белков, соответствующих периоду бластоцисты эмбриогенеза, и репрессия или мутации активных генов-супрессоров в этой клетке.

Нормальная стволовая клетка живёт в организме не сама по себе, а в «нише» ткани. Нарушения в геноме стволовой клетки превращают её в раковую клетку.

Обычно стволовая клетка делится асимметрично: одна из её клеток – остается стволовой, а другая для – замещения погибающей клетки после выполнения своих функций в ткани. Это свойство стволовой клетки обозначают термином «стволовое» состояние.

Деление нормальной и раковой стволовой клеток происходит по сигналам от клеток ниш и под их строгим контролем. Ниша им необходима для выживания и сохранения свойства «стволовости».

Приложения:

- поиск раковой стволовой клетки по её генам-маркерам и белкам-маркерам и её уничтожение предупреждает возникновение рака;

- ниша в будущем может стать необычно новой мишенью для лекарств, воздействующими на раковую стволовую клетку несколькими способами.

2. Асимметричное деление раковой стволовой клетки – причина различий в потенциях к делению клеток рака.

Состав клеток в пределах одного типа рака разный: наименьшую часть его клеток составляют долгоживущие раковые стволовые клетки, а основная масса его клеток состоит из короткоживущих нераковых клеток;

И тот, и другой вариант клеток в составе рака – это «продукт» раковой стволовой клетки.

Пока это обнаружено учёными во всех типах клеток рака крови и в пяти типах клеток солидного рака, но учёные не сомневаются, что это же будет выявлено и в остальных его типах (М. Кларк, 2003).

Приложение:

- объектом для методов диагностики и лечения должна быть только раковая стволовая клетка.

3. Инвазия и метастазирование раковой стволовой клетки и её потомков – это выражение хоуминга раковых стволовых клеток.

Два следствия свойства инвазии раковой стволовой клетки делают её для жизни пациента очень опасной:

- инвазия раковых клеток в окружающие здоровые ткани без конца и границ;

- инвазия раковых клеток через стенку кровеносных и лимфатических капилляров и их перенос с кровью и лимфой в различные органы. При этом раковые клетки разрушают ткани и занимают их места, а в органах образуют метастазы.

Теперь и в инвазии раковых клеток наши знания существенно дополнены благодаря тому, что раковая клетка оказалась стволовой клеткой.

Причинами инвазии раковой стволовой клетки являются сигналы от неё – факторы роста и рецепторы к ним на клетках ниш и на повреждённых клетках в организме.

То есть инвазия раковых стволовых клеток – это проявление хоуминга их: миграция их в «нужное место», т.е. в стволовую нишу, а также в места повреждения клеток тканей в организме.

Реализуется миграция за счет генов свойства инвазии раковой стволовой клетки, которые включаются сразу или с размера узелка из его потомков в 2 мм в ткани.

Кроме этого, не исключается выход раковой стволовой клетки в ткань органа способом трансмиграции, т.е. через стенки капилляров без их разрушения (от лат. trans – через и migration – движение через неповреждённые капилляры).

По сигналу от раковой стволовой клетки, клетки костного мозга мигрируют в места будущих метастазов и создают в тканях преметастазные ниши. В них затем придут раковые стволовые клетки, из них формируются метастазы.

Приложения:

- нейтрализация сигнала от раковой стволовой клетки к гемопоэтическим клеткам прервёт образование метастазов в самом начале этого процесса;

- блокирование секреции гемопоэтическими клетками фибронектина – «жидкого клея» на поверхности клеток ниши, не даст раковым стволовым клеткам прикрепиться в нише;

- моноклональными антителами или моноклональными Т-клеточными рецепторами к белку-маркеру гемопоэтических клеток блокировать эти клетки, тем самым предотвратить метастазы раковых стволовых клеток.

- антителами или моноклональными Т-клеточными рецепторами связать молекулу адгезии CD44 на раковой стволовой клетке, т.е. «обездвижить» её, что приведёт к утрате ею свойства «стволовости», подавлению миграции с последующей гибелью.

Как видно, эти виды лечения воздействует непосредственно на раковые стволовые клетки, т.е. на причину, а не на следствие – симптомы рака.

4. Отсутствие абсолютных отличий раковой клетки от нормальной – главная причина всех трудностей ранней диагностики рака и излечения от него.

Причина этого одна и вечная – раковая клетка возникает из нормальной клетки своего организма, а не пришелец извне. На поиски отличий учёными потрачены все века. Без таких отличий нельзя создать, как селективные методы диагностики раковой клетки, так и методы ликвидации раковых клеток.

Только на уровне раковой стволовой клетки учёным уже удалось найти некоторые из таких отличий между ней и нормальной стволовой клеткой. Но это лишь начало:

- для деления и выживания нормальной стволовой клетки ей необходим ген-супрессор PTEN, а в раковой стволовой клетке этот ген «отсутствует или выключен»;

- если ген PTEN вовлечён не только в подавление раковой стволовой клетки, но и в развитие стволовой клетки, то из этой клетки «зачастую может возникать раковая стволовая клетка любого типа»;

- на поверхности раковой стволовой клетки есть специфические маркеры – молекула адгезии CD44 (Н. Ponta et al., 2003), ряд фетальных белков, в том числе белок под кодовым обозначением «5T4»;

- ген Ink4a контролирует деление стволовой клетки, при метилировании его промотора или мутации стволовая клетка превращается в раковую клетку.

Изменения в генах PTEN и Ink4a, экспрессия генов oct-4, Nanog и hTERT и их белки, ген и белок под кодовым обозначением «5T4», молекулы адгезии CD44 – это маркеры для диагностики раковых стволовых клеток, а также для выявления и выделения их из состава клеток рака.

Открытие этих отличий учёные с успехом начали применять на практике для уничтожения раковых стволовых клеток, не затрагивая при этом нормальные стволовые клетки.

5. Отсутствие ответа клеток иммунной системы организма на раковую стволовую клетку.

Раковая стволовая клетка – причина рака, возникает из клетки своего организма, поэтому её протеом кодируется геномом организма-хозяина. Это главная причина его толерантности и отсутствия реакции клеток иммунной системы на образование в организме раковой клетки.

Из этого следует, что белки-маркеры на поверхности раковой стволовой клетки не могут быть антигенами или они очень слабые антигены. Их достаточно для диагностики раковой стволовой клетки, но недостаточно для вызова ответа клеток иммунной системы организма.

Однако многие учёные причиной отсутствия ответа иммунной системы считают эмбриональный белок под кодовым обозначением «5T4», маскирующий белки-маркеры на раковой клетке. Кроме этого, известен ряд других причин – дефекты дендритных клеток и др.

6. Объектом для методов диагностики должна быть раковая стволовая клетка.

Рак – не одно целое, а раковая стволовая клетка – это клетка-организм и причина рака, поэтому именно она – объект для диагностики. Нераковые клетки в составе клеток рака диагностировать не требуется, они после выполнения функций клеток своей ткани погибают сами через апоптоз.

Диагностировать рак необходимо задолго до его симптомов – узелок из раковых клеток в ткани размером 2 мм, так как при размере его больше 2 мм солидный рак – болезнь уже всего организма.

Молекулярная, т.е. геномная медицина, уже сейчас позволяет выполнять диагностику на двух уровнях: «до начала» – это предраковые клетки, и «начало» – раковая стволовая клетка и её первые потомки в ткани по их генам-маркерам и белкам-маркерам.

В образцах крови от пациента с помощью ПЦР-ММК и МС-ПЦР и биочипов можно обнаруживать по маркерам раковые стволовые клетки в различных органах с размера 2 мм первичного рака или микрометастаза.

7. Раковые стволовые клетки можно не только уничтожать, но и возвращать в нормальное состояние.

До сих пор целью лечения от рака было уничтожение всех раковых клеток, что не удаётся достичь с помощью стандартных методов лечения, за исключением редких случаев.

Теперь обнаружено, что причиной рака является раковая стволовая клетка. Но среди всей массы нераковых клеток рака лишь минимальную часть составляют раковые стволовые клетки.

Приложения:

- раковая стволовая клетка – мишень номер один для противораковых препаратов и других средств;
- для излечения от рака достаточно уничтожить только раковые стволовые клетки, выборочно целясь по ним;
- оставление в тканях в процессе лечения даже одной раковой стволовой клетки даст рак в этом месте, так как каждая такая клетка – это клетка-организм;
- нераковые клетки в составе клеток рака после выполнения функций своей ткани, как попало, умрут сами собой через апоптоз (М. Кларк, М. Бекер, 2006).

Что рак – не одно целое, для излечения от рака имеет принципиальное значение: ликвидация каждой раковой стволовой клетки в организме пациента само собой приведёт к излечению от рака. Или, как говорит акад. В.А. Кордюм (1998), – «и рак уйдёт».

Но это можно достичь только новыми методами и селективными средствами. При солидном раке ликвидации раковых стволовых клеток должна предшествовать операция удаления симптомов рака: первичный очаг рака и его метастазы, или рецидив рака.

Методы уничтожения раковых стволовых клеток. Гены-маркеры и белки-маркеры раковой стволовой клетки – это мишени для изготовления новых, избирательно действующих лекарств и других средств ликвидации раковых стволовых клеток.

Онко-вакцины – лучшее средство от раковых клеток по трём причинам:



- их действие системное;
- вакцина избирательно уничтожает раковые стволовые клетки, не затрагивая нормальные клетки;
- вакцина не оставит в организме ни одной раковой стволовой клетки, что необходимо для излечения от рака.

Для приготовления онко-вакцин обычно в качестве белков-антигенов используется лизат из всех клеток рака.

Теперь же для изготовления таких вакцин необходимо использовать белки-антигены только раковых стволовых клеток рака – это вакцины нового поколения.

Для стимуляции иммунного ответа организма на раковые стволовые клетки нужно модифицировать его клетки: в Т-лимфоциты ввести ген цитокина, а в раковые стволовые клетки от пациента ввести ген чужеродного белка. Экспрессия этого белка на поверхности раковой стволовой клетки сделает её «чужой» для клеток иммунной системы организма, что и вызовет их сильный ответ.

Индукция реверсии раковых стволовых клеток. Это метод ликвидации раковых стволовых клеток в организме пациента путём возврата их к нормальному фенотипу, что обозначают термином – реверсия.

Так как причиной превращения стволовой клетки в раковую клетку является дерепрессия в ней фетальных генов, – явление обратимое, то возможна реверсия раковых стволовых клеток.

При реверсии раковые стволовые клетки возвращаются в нормальные клетки, после чего они становятся дифференцированными клетками, а затем погибают через апоптоз.

Этот путь ликвидации раковых стволовых клеток доказан в экспериментах как *in vitro* с раковыми стволовыми клетками, так *in vivo* на животных. В настоящее время экстракты из тканей эмбрионов или их белки и экстракты плаценты применяются в клинической практике для лечения пациентов от рака.

Ещё Н. Busch (1976) отмечал, что канцерогенез начинается вследствие дерепрессии фетальных генов в клетке, вызывающих размножение и инвазию клеток. Отсутствие ингибиторов этих генов, продуцируемых только эмбриональными клетками, создаёт раковую клетку.

Я.Г. Эренпрейс (1982, 1983) подчёркивал, что раковая клетка – это эмбриональная клетка и обосновал два важных вывода: 1) эмбриогенез – единственный способ подавления эмбриональных свойств раковой клетки и 2) введение раковых клеток в эмбрион лишает клетки злокачественного фенотипа.

Это открыло пути к индукции реверсии раковой стволовой клетки в нормальную клетку под воздействием на неё экстрактов фетальных тканей или их белков. Это то, что начинали применять для лечения от рака некоторые учёные, в том числе и учёные нашей страны, ещё в 30-х гг. XX века, а в настоящее время – во многих странах мира.

Ранее мы рассматривали опыты *in vitro*, когда клетки от меланомы человека помещали в микросреду из эмбриональных стволовых клеток. В результате клетки меланомы становились нормальными клетками. Это реверсия клеток.

Теперь проф. Джон Итон (John Eaton, 2006) и его группа (США) в опытах на мышах показали, что предварительная вакцинация эмбриональными стволовыми клетками предотвращает развитие рака лёгких у мышей, подвергающихся воздействию канцерогенов или трансплантации раковых стволовых клеток.

Они приготовили два типа противораковой вакцины. В состав одной входили только эмбриональные стволовые клетки, взятые из бластоцист мышей. В состав другой взяты эти же клетки с фибробластами, синтезирующими гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ КСМ).

Вначале опыта учёные делали мышам инъекции стволовых клеток, выделенных из бластоцист мышей. После этого мышам пересаживали под кожу раковые клетки. У всех мышей контрольной группы это приводило к развитию рака, а у 20 из 25 мышей, прошедших вакцинацию стволовыми клетками, рак не развивался.

Вакцинация эмбриональными стволовыми клетками предохраняла также мышей от рака лёгких, вызываемого канцерогенными веществами из табачного дыма. Эти эффекты авторы объясняют тем, что эмбриональные стволовые клетки и раковые синтезируют ряд сходных белков. Это вызывает иммунный ответ против клеток, содержащих эти белки.

Но эффекты вакцинации в этих опытах могут быть связаны с белками-ингибиторами из эмбриональных стволовых клеток, что могло вести к реверсии раковых стволовых клеток у мышей.

Эта новая вакцина авторами на людях ещё не протестирована из-за возможных побочных эффектов – «атаки клеток иммунной системы на собственные стволовые клетки организма». Однако Джон Итон и его группа считают, что в таком случае «совершенствование методики позволит избежать этого риска».

Если побочные эффекты от противораковой вакцины на основе эмбриональных стволовых клеток будут исключены, то такая вакцина, на наш взгляд, может стать ключом от раковых стволовых клеток любого типа и для профилактики их возникновения при угрозе рака в организме человека.

8. До сих пор объектом диагностики и лечения являются симптомы солидного рака, т.е. следствие, а не причина – раковая клетка.

Причины этого: 1) отставание науки о раковой клетке и незнание до недавнего времени того, что раковая клетка – это раковая стволовая клетка; 2) солидный рак клиницистами представляется как «сугубо локальный процесс», т.е. как одно целое.

Симптомам рака соответствуют и стандартные методы их лечения: хирургический метод, лучевое лечение, кроме химиотерапии. Но ни один из них не удаляет и не уничтожает всех раковых клеток.

Теперь диагностику и лечение пациента на этапе симптомов рака считают «стратегическим просчетом» (M.B. Sporn, N. Suh, 2002; C. Leaf, 2004) и как «битва в значительной степени проигранная» (А.В. Лихтенштейн, Г.И. Потапова, 2005).

Хирургическим методом часто сразу можно удалить из организма пациента множество раковых клеток иссечением первичного рака и его метастазов, но лучевое лечение убивает лишь часть раковых клеток.

Объектом для химиотерапии являются раковые клетки, т.е. быстро делящиеся клетки. Но оказалось, что такие клетки в составе клеток рака нераковые, – при прививке их мышам они не вызывают рак.

Причиной рака является раковая стволовая клетка, из которой возникают два варианта клеток в составе рака: нераковые клетки – их множество с коротким сроком жизни и быстро делятся, и раковые стволовые клетки – их очень мало и они делятся редко и медленно. Из этого следует, что стандартная химиотерапия для уничтожения раковых стволовых клеток оказывается неэффективной (Дж. Висвейдер, 2006).

Из следствий «просчёта» и того, что рак – не одно целое, возникает необходимость смены объекта для методов диагностики и лечения от рака. Вместо рака, т.е. следствия, объектом должна быть его причина – раковая стволовая клетка.

Только в таком случае, действуя селективным лекарством или средством на причину – каждую раковую стволовую клетку, и уничтожая их все, ликвидируется само собой следствие – рак.

#### 9. Критерии излечения от рака.

Во многих странах и в нашей стране критерием излечения от рака является – отсутствие рецидива и метастазов рака у пациента в течение пяти лет после окончания лечения его от рака. По такому критерию пациенту скажут, что он излечен, – через пять лет после проведенного лечения.

Однако критерии должны быть такими, чтобы ими можно было контролировать процесс лечения пациента от рака и после окончания лечения – примерно через две недели, убедиться: есть излечение или нет.

Единственным критерием излечения от рака пациента может быть – отсутствие у него в организме после лечения раковых стволовых клеток, что устанавливается анализом образцов крови на эти клетки.

Кроме клеток критериями может быть отсутствие в образце крови пациента генов-маркеров и белков-маркеров из раковых стволовых клеток, которые выявлялись у него до лечения и в процессе лечения от рака.

Слабый эффект или отсутствие эффекта в процессе лечения от рака – признак непригодности используемых средств и методов лечения. Однако, до внедрения в практику врачей-онкологов этих критериев излечения ещё далеко.

Причины:

- необходима организация лабораторий ПЦР-ММК и МС-ПЦР, лаборатории выращивания клеток в культуре в онкологических диспансерах для исследования образцов крови пациента на гены-маркеры и белки-маркеры раковых стволовых клеток;

- набор значимых генов-маркеров и белков маркеров раковой стволовой клетки учёные дополняют быстрыми темпами.

На основе таких критериев, диспансеризация онкологических пациентов может быть упрощена и сокращена. Такой контроль удобно будет выполнять на ДНК-чипе и белковом чипе по маркерам из раковых стволовых клеток. Появление вновь раковых стволовых клеток или их генов-маркеров или белков-маркеров будет указывать на рецидив или метастаз рака.

В будущем бывший пациент сможет носить на руке ДНК-чип или белковый чип размером с наручные часы с интегральной микросхемой для анализа информации на чипе. Периодические микроанализы образца крови на гены-маркеры и белки-маркеры раковой стволовой клетки 2-3 раза в год позволят подтвердить его излечение или выявить самое начало рецидива или метастаза рака.

Итак, знания о раковой стволовой клетке позволяют перейти от диагностики и лечения симптомов рака – следствия, к его причине – раковой стволовой клетке, а от неё к первопривине – генам, которые особенно активны и отвечают за раковое перерождение клетки.

Эти гены могут стать мишенью для лекарств нового типа, например, интерферирующая РНК к иРНК генов и ряд других средств, избирательно поражающих такие клетки.

Выявление набора таких генов у пациента сможет предсказать трудности или успешность лечения в его случае.

В конечном итоге это даст возможность решить основные проблемы рака: 1) как найти раковую стволовую клетку и её потомки в организме пациента и 2) как ликвидировать их все, не повреждая нормальные стволовые клетки, а это означает излечение от рака.

Проф. С.А. Тюлядин (1999) об этом этапе в онкологии пишет так: «От лечения нозологической формы рака мы начинаем переходить к лечению фенотипических и генетических изменений имеющихся в раковой клетке».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелев Г.И. Что такое опухоль? / Г.И. Абелев. // Соросов. образоват. журн. – 1997. – Т.3, № 10. – С.85-90.
2. Абрамова Е.Б. Протеасома: разрушение во имя созидания. / Е.Б. Абрамова, В.Л. Карпов. // Природа. – 2003. – № 7. – С.36-45.
3. Анализ экскретируемой из организма ДНК как подход к выявлению растущей в организме опухоли. / Ю.К. Моляка, И.В. Ботезату, Г.И. Потапова и др. // Вест. РАМН. – 2000. – № 7. – С.24-27.
4. Арчаков А.И. Биоинформатика, геномика и протеомика – науки о жизни XXI столетия. / А.И. Арчаков. // Вопр. мед. химии. – 2000. – Т.46, № 1. – С.4-7.
5. Арчаков А.И. Что за геномикой? – протеомика. / А.И. Арчаков. // Вопр. мед. химии. – 2000. – Т.46, № 4. – С.335-343.
6. Балдуева И.А. Противоопухолевые вакцины. / И.А. Балдуева. // Практическая онкология. – 2003. – Т.4. – № 3. – С.157-166.
7. Балдуева И.А. Вакциноterapia злокачественных опухолей (молекулярно – генетические аспекты). / И.А. Балдуева, В.М. Моисееко. // IX Российский онкологический конгресс: Материалы конгресса. Москва, 22-24 ноября 2005. – М., 2005. – С.14-16.
8. Баранов В.С. Генная терапия – медицина XXI века. / В.С. Баранов. // Соросов. образоват. журн. – 1999. – Т.5, № 3. – С.63-68.
9. Белохвостов А.С. Полимеразная цепная реакция и лигазные реакции, принципы, традиционные методики и нововведения. / А.С. Белохвостов. // Молекулярная генетика. – 1995. – № 2. – С.21-26.
10. Белохвостов А.С. Прорыв в диагностике рака. / А.С. Белохвостов. // Вместе против рака. – 2000. – № 1. – С.1-3.
11. Белохвостов А.С. Новые успехи в диагностике рака. / А.С. Белохвостов. // Вместе против рака. – 2000. – № 4. – С.1-2.
12. Бирнблум И. Канцерогенез и патогенез опухолей. / И. Бирнблум. // Успехи в изучении рака: Пер. с англ. – М., 1956. – Т.2. – С.9-57.

13. Богданов А.А. Теломеры и теломераза. / А.А. Богданов. // Соросов. образ. журн. – 1996. – Т.2, № 12. – С.12-18.
14. Вайнберг Р.А. Молекулярные основы рака. / Р.А. Вайнберг. // В мире науки. – 1984. – № 1. – С.26-37.
15. Вайнберг Р.А. Поиск антионкогенов. / Р.А. Вайнберг. // В мире науки. – 1988. – № 11. – С.16-24.
16. Васильев Ю.М. Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток. I. Сигнальные молекулы, вызывающие размножение и гибель клеток. / Ю.М. Васильев. // Соросов. образоват. журн. – 1997. – Т.3, № 4. – С.17-22.
17. Васильев Ю.М. Социальное поведение нормальных клеток и антисоциальное поведение опухолевых клеток. II. Клетки строят ткань. / Ю.М. Васильев. // Соросов. образоват. журн. – 1997. – Т.3, № 5. – С.20-25.
18. Вахтин Ю.Б. Сохранение способности к дифференцировке при малигнизации клеток крысы *in vitro*. / Ю.Б. Вахтин, И.Н. Швембергер. // Клеточная наследственность и злокачественный рост. – М.-Л., 1966. – С.80-93.
19. Галицкий В.А. Канцерогенез и механизмы внутриклеточной передачи сигналов. / В.А. Галицкий. // Вопр. онкологии. – 2003. – Т.49, № 3. – С.278-293.
20. Гвоздев В.А. Регуляция активности генов, обусловленная химической модификацией (метилованием) ДНК. / В.А. Гвоздев. // Соросов. образоват. журн. – 1999. – Т.5, № 10. – С.11-17.
21. Георгиев Г.П. Белок Mts и контроль метастазирования опухолей. / Г.П. Георгиев, Л. Луканидин. // Молекулярная биология. – 2000. – Т.34, № 5. – С.727-730.
22. Георгиев Г.П. Генотерапия рака. / Г.П. Георгиев, С.Л. Киселев, Н.В. Гнучев. // Молекулярная медицина. – 2003. – № 1. – С.12-16.
23. Георгиев Г.П. Как нормальная клетка превращается в раковую. / Г.П. Георгиев. // Соросов. образоват. журн. – 1999. – Т.5, № 4. – С.17-22.



24. Георгиев Г.П. Молекулярно-генетические механизмы прогрессии опухолей. / Г.П. Георгиев. // Соросов. образоват. журн. – 2000. – Т.6, № 1. – С.2-7.
25. Георгиев Г.П. Перспективы использования гена Tag 7 в терапии опухолей. / Г.П. Георгиев, С.Л. Киселев, Н.В. Гнучев. // Рос. химич. журн. – 1998. – №5. – С.146-153.
26. Гиббс У. Рак: как распутать клубок? / У. Гиббс. // В мире науки. – 2003. – № 10. – С.55-85.
27. Гиббс У. «Теневая» часть генома: за пределами ДНК. / У. Гиббс. // В мире науки. – 2004. – № 3. – С.65-70.
28. Дебабов В.Г. ДНК-вакцинация и генотерапия на основе транзientной экспрессии нуклеиновых кислот в соматических клетках человека и животных. / В.Г. Дебабов. // Молекулярная биология. – 1997. – Т.31, № 2. – С.209-215.
29. Дильман В.М. Эндокринологическая онкология. / В.М. Дильман. – Л., 1983. – 230 с.
30. Докудовская С.С. Теломераза – необычный РНК–содержащий фермент. / С.С. Докудовская, А.В. Петров, О.А. Донцова, А.А. Богданов. // Биохимия. – 1997. – Т.62, вып.11. – С.1411-1422.
31. Егоров Е.Е. Теломераза, старение, рак. / Е.Е. Егоров. // Молекулярная биология. – 1997. – Т.31, № 1. – С.16-24.
32. Жданов Р.И. Реальности и надежды генной терапии. / Р.И. Жданов, Н.В. Семенова, А.И. Арчаков. // Вопр. мед. химии. – 2000. – Т.46, № 3. – С.197-206.
33. Залетаев Д.В. ДНК-диагностика в онкологии. / Д.В. Залетаев. // Молекулярная биология. – 2000 – Т.34, № 4. – С.671-683.
34. Зеленин А.В. Генная терапия сегодня и завтра. / А.В. Зеленин, В.А. Кайгородов, В.С. Прасолов. // Молекулярная биология. – 1998. – Т.32, № 2. – С.219-228.

35. Зеленин А.В. Генная терапия на границе третьего тысячелетия. / А.В. Зеленин. // Вест. РАН. – 2001. – Т.71, № 5. – С.387-395.
36. Зеленин К.Н. Возникновение и развитие химиотерапии. / К.Н. Зеленин. // Соросов. образоват журн. – 2001. – Т.7, № 5. – С.23-28.
37. Имянитов Е.Н. Иммуно- и генотерапия рака. / Е.Н. Имянитов, В.Б. Окулов, А.В. Того, К.П. Хансон. // Юбил. сб. науч. работ онкологического диспансера С. Петербурга. – СПб., 1996. – С.234-242.
38. Карпов В.Л. ДНК, хроматин, гистоновый код. / В.Л. Карпов. // Вестн. Рос. Акад. Наук. – 2003. - Т.73, № 6. – С.509-513.
39. Каудри Е. Раковые клетки: Пер. с англ. / Е. Каудри. – М., 1958. – 295 с.
40. Кенакин Т. Новые мишени для лекарств. / Т. Кенакин. // В мире науки. – 2006. – №2.
41. Конгейм Ю. Общая патология. / Ю. Конгейм. – СПб., 1879. – Т.1. – 698 с.
42. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. / Б.П. Копнин. // Биохимия. – 2000. – Т.65, вып.1. – С.5-33.
43. Кордюм В.А. Генная терапия – новая эра новой эры. / В.А. Кордюм. // Лікуванна та діагностика. – 1998. – № 1. – С.6-9.
44. Кушлинский Н.Е. Исследование механизмов передачи митогенных сигналов факторов роста – основа для создания противоопухолевых препаратов. / Н.Е. Кушлинский. // Материалы третьей ежегод. Рос. онкологич. конф., Санкт-Петербург, 29 ноября – 1 декабря 1999. – СПб., 1999. – С.23-27.
45. Кушлинский Н.Е. Новые подходы к противоопухолевой терапии: использование препаратов, воздействующих на процессы, регулируемые эпидермальным и/или трансформирующим факторами роста. / Н.Е. Кушлинский, Е.С. Герштейн. // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1996. – Т.59, № 1. – С.74-80.

46. Ланца Р. Стволовые клетки: сомнения и надежды. / Р. Ланца, Н. Розенталь. // В мире науки. – 2004. – № 9. – С.6-10.
47. Лиотта Л.Л. Инвазия и метастазирование раковых клеток. // Л.Л. Лиотта. // В мире науки. – 1992. – № 4. – С.22-30.
48. Лихтенштейн А.В. Метилирование ДНК и канцерогенез. / А.В. Лихтенштейн, Н.П. Киселева. // Биохимия. – 2001. – Т.66, вып. 3. – С.293-317.
49. Лихтенштейн А.В. Генодиагностика рака: реальность и перспективы. / А.В. Лихтенштейн, Г.И. Потапова. // Пат. физиология и эксперим. терапия. – 2005. – № 1. – С.2-7.
50. Маквей Г. Перспективы научных исследований в онкологии в третьем тысячелетии. / Г. Маквей. // V ежегод. Рос. онкологич. конф. – М., 2001. – С.47.
51. Микер А.К. Теломераза: многообещающий маркер биологического бессмертия половых, стволовых и раковых клеток. / А.К. Микер, Д.С. Коффи. // Биохимия. – 1997. – Т.62, вып. 11. – С.1547-1557.
52. Мирзабеков А.Д. Биочипы в биологии и медицине XXI века. / А.Д. Мирзабеков. // Вестн. Рос. акад. наук. – 2003. – Т.73, № 5. – С.412.
53. Моисеенко В.М. Биотерапия при злокачественных новообразованиях. / В.М. Моисеенко, Н.Н. Блинов, К.П. Хансон. // Рос. онкологич. журн. – 1997. – № 5. – С.57-59.
54. Моисеенко В.М. Вакциноterapia злокачественных опухолей. / В.М. Моисеенко, И.А. Балдуева, К.П. Хансон. // Вопросы онкологии. – 1999. – Т.45, № 3. – С.327-332.
55. Моисеенко В.М. Возможности вакцинотерапии меланомы кожи. / В.М. Моисеенко. // Практ. онкология. – 2001. – № 4(8). – С.58-64.
56. Москалева Е.Ю. Перспективы создания противоопухолевых вакцин с использованием дендритных клеток человека. / Е.Ю. Москалева, С.Е. Северин. // Иммунология. – 2002. – Т.23, № 1. – С.8-15.

57. Напалков Н.П. Эволюция представлений о природе опухолевого роста. / Н.П. Напалков, М.А. Забежинский, В.Н. Анисимов. // Вопр. онкологии. – 1996. – Т.42, № 4. – С.73-79.
58. Неттелбек Д. Вирусы: оружие против рака. / Д. Неттелбек, Д. Карел. // В мире науки. – 2004. – № 1. – С.47-53.
59. Носов Д.А. Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста. / Д.А. Носов. // V ежегод. Рос. онкологич. конф. – М., 2001. – С.48-50.
60. Оловников А.М. Принцип маргинотомии в матричном синтезе полинуклеотидов. / А.М. Оловников. // Докл. АН СССР. – 1971. – Т.201, № 6. – С.1496-1499.
61. Пальцев М.А. Молекулярная медицина и прогресс фундаментальных наук. / М.А. Пальцев. // Вестн. РАН. – 2002. – Т.72, № 1. – С.13-21.
62. Петров Н.Н. Общее учение об опухолях (патогенез и клиника). / Н.Н. Петров. // СПб: Гигиена и санитария. – 1910. – 373 с.
63. Петров Н.Н. Злокачественные опухоли. / Под ред. Н.Н. Петрова. – Л., 1947. – Т.1, ч.1.
64. Попова Н.А. Иммуитет против опухолей. Миф или реальность? / Н.А. Попова. // Соросов. образоват. журн. – 2001. – Т.7, № 3. – С.12-17.
65. Ровенский Ю.А. Клеточные и молекулярные механизмы опухолевой инвазии. / Ю.А. Ровенский. // Биохимия. – 1998. – Т.63, вып.9. – С.1204-1221.
66. Ровенский Ю.А. Как клетки ориентируются на местности. / Ю.А. Ровенский. // Соросов. образоват. журнал. – 2001. – Т.7, № 3. – С.4-11.
67. Розенберг С. Адаптивная иммунотерапия рака. / С. Розенберг. // В мире науки. – 1990. – № 7. – С.26-34.
68. Рукавишников А.И. К организации первичной диагностики рака нижней губы и слизистой оболочки полости рта в условиях сельской местности. Частные вопросы практической онкологии. / А.И. Рукавишников, К.К. Бельский, В.П. Подъяпольский, В.В. Ткач. // Сб. науч. тр. Волгогр. мед. акад. – Волгоград, 1995. – Т.51, вып.3. – С.77-80.

69. Рукавишников А.И. К проблеме преклинической диагностики злокачественной опухоли. / А.И. Рукавишников. // Акт. вопр. стоматологии: Сб. науч. тр. Волгогр. мед. акад. – Волгоград, 1999. – Т.55, вып.1. – С.194-198.
70. Рукавишников А.И. К тактике хирургического лечения рака кожи ушной раковины / А.И. Рукавишников // Акт. вопр. стоматологии: Сб. науч. тр. Волгогр. мед. акад. – Волгоград, 1996. – Т.52, вып.1. – С.174-177.
71. Рукавишников А.И. К технике срочной и экстренной трахеотомии у больных злокачественными опухолями в области головы и шеи. / А.И. Рукавишников, В.В. Подъяпольский, И.Г. Сметанин и др. // Областной клинической – 90: Научно-практ. Сборник. – Волгоград, 1995. – С.297-301.
72. Рукавишников А.И. О борьбе с кровотечением из распадающейся злокачественной опухоли в области головы и шеи. / А.И. Рукавишников, В.П. Подъяпольский, В.В. Ткач. // Вестн. Волгогр. мед. акад.: Сб. науч. тр. – Волгоград, 1997. – Т.52, вып.3. – С.134-136.
73. Рукавишников А.И. Первичная диагностика злокачественных опухолей челюстно-лицевой области. / А.И. Рукавишников, А.В. Сидорук. // Акт. вопр. стоматологии: Сб. науч. тр. Волгогр. мед. акад. – Волгоград, 1996. – Т.52, вып.1. – С.169-174.
74. Рукавишников А.И. Фоновые процессы и ранний рак слизистой оболочки красной каймы губы и полости рта: Учебное пособие для студентов, врачей-интернов, практических врачей. / А.И. Рукавишников. – Волгоград, 1994. – 36 с.
75. Рукавишников А.И. Что есть «ранняя» диагностика рака. / А.И. Рукавишников. // Вестн. ВолГМУ. – 2002. – Т.58, вып.8. – Волгоград, 2002. – С.170-173.
76. Рукавишников А.И. Что такое предрак? / А.И. Рукавишников. // Акт. вопр. стоматологии: Сб. науч. тр. Волгогр. мед. акад. – Т.57, вып.4. – Волгоград, 2001. – С.145-150.

77. Рукавишников А.И. Эмфизема подкожной клетчатки во время и после срочной трахеотомии. / А.И. Рукавишников, В.П. Подъяпольский, И.Г. Сметанин, В.В. Ткач. // Частные вопросы практической онкологии: Сб. науч. тр. / Под ред. Г.А. Ефимова. – Т.51, вып.4. – Волгоград, 1995. – С.114-117.
78. Сакс Л. Остановка злокачественного роста путем принудительной дифференцировки клеток. / Л. Сакс. // В мире науки. – 1986. – № 3. – С.14-22.
79. Свердлов Е.Д. Генная терапия и медицина XXI века. / Е.Д. Свердлов. // Молекулярная генетика. – 1997. – № 2. – С.3-28.
80. Свердлов Е.Д. Рак – болезни генома. «Гены рака» и передача сигнала в клетке. / Е.Д. Свердлов. // Очерки современной молекулярной генетики. – М.: МГУ, 1993-1998. – С.3-25.
81. Скулачёв В.П. В своем межмембранном пространстве митохондрия таит «белок самоубийства, который, выйдя в цитозоль, вызывает апоптоз». / В.П. Скулачёв. // Биохимия. – 1996. – Т.61, вып.11. – С.2060-2063.
82. Скулачёв В.П. Явление запрограммированной смерти митохондрии, клетка и органы. Роль активных форм кислорода. / В.П. Скулачёв. // Соросов. образоват. журн. – 2001. – Т.7, № 6. – С.4-10.
83. Скулачёв В.П. Явление запрограммированной смерти. Организм. / В.П. Скулачёв. // Соросов. образоват. журн. – 2001. – Т.7, № 10. – С.2-6.
84. Сопоцинская Е.Б. Усиление процессов диссеминации при пальпировании и пунктировании опухолей. / Е.Б. Сопоцинская, И.А. Лисняк. // Вопр. онкологии. – 1990. – Т.36, № 12. – С.1454-1455.
85. Степанова Е.В. Оценка ангиогенеза опухолей человека. / Е.В. Степанова, А.Ю. Барышников, М.Р. Личиницер. // Успехи совр. биологии. – 2000. – Т.120, № 6. – С.599-604.
86. Степанова Е.В. Антиангиогенная терапия: новые возможности лечения злокачественных заболеваний. / Е.В. Степанова. // Практич. онкология. – 2002. – Т.3, № 4. – С.246-252.

87. Сыркин А.Б. Экспериментальная химиотерапия злокачественных опухолей на современном этапе / А.Б. Сыркин, Г.К. Герасимова, Ю.А. Барышников и др. // Вопр. онкологии. – 1995. – Т.41, № 2. – С.41-46.
88. Ткачук В.А. Лауреаты Нобелевской премии 1999 года: По физиологии и медицине – Г. Блобель. / В.А. Ткачук, Л.П. Белянова. // Природа. – 2000. – № 1. – С.83-87.
89. Тюляндин С.А. Мишени лекарственной терапии будущего. / С.А. Тюляндин. / Материалы III ежегод. Рос. онкологич. конф., г. Санкт-Петербург, 29 ноября - 1 декабря 1999 г. – СПб., 1999. – С.43-46.
90. Хансон К.П. Перспективы молекулярной диагностики в онкологии. / К.П. Хансон. // Третья ежегод. Рос. онкологич. конф., Санкт-Петербург, 29 ноября - 1 декабря 1999 г. – СПб., 1999. – С.7-8.
91. Хансон К.П. Современные тенденции в развитии биологической терапии злокачественных опухолей. / К.П. Хансон, Б.В. Афанасьев, Л.М. Берштейн и др. // Вопр. онкологии. – 1996. – Т.42, № 5. – С.7-12.
92. Хейфлик Л. Смертность и бессмертие на клеточном уровне. / Л. Хейфлик. // Биохимия. – 1997. – Т.62, вып.11. – С.1380-1393.
93. Холлидей Р. Эпигенетическая наследственность. / Р. Холлидей. // В мире науки. – 1989. – № 8. – С.30-38.
94. Четверин А.Б. Точная диагностика с помощью молекулярных колоний. / А.Б. Четверин, Е. В. Четверина. // Молекулярная биология. – 2002. – Т.36. – С.320-327.
95. Четверин А.Б. Преодоление проблем ПЦР-диагностики с помощью метода молекулярных колоний. / А.Б. Четверин, Е.В. Четверина. // Молекулярная медицина. – 2003. – № 2. – С.30-39.
96. Чикилева И.О. Современные подходы и направления в иммунотерапии и иммунопрофилактике злокачественных новообразований. / И.О. Чикилева, Е.О. Халтурина, М.В. Киселевский. // Клинич. медицина. – 2003. – № 2. – С.40-47.

97. Швембергер И.Н. Дифференцировка и нормализация опухолевых клеток. / И.Н. Швембергер. // Вопр. онкологии. – 1980. – Т.26, № 3. – С.112-115.
98. Шелепов В.П. Возможность использования полимерной ДНК, происходящей из гибнущих в организме клеток и проходящей через почечный барьер, для генетического анализа. / В.П. Шелепов, С.Л. Арсенин, И.В. Ботезату и др. // Вестн. Рос. Онкологич. научн. центра РАМН. – 1997. – № 4. – С.13-17.
99. Эллиот В. Биохимия и молекулярная биология: Пер. с англ. / В. Эллиот, Д. Эллиот. – М., 2002. – С.291-310.
100. Эренпрейс Я.Г. Опыт теоретического анализа процесса малигнизации. / Я.Г. Эренпрейс. // Изв. АН Латв. ССР. – 1983. – № 7(432). – С.79-89.
101. Эренпрейс Я.Г. Эмбриональные свойства опухолевых клеток: факты и гипотезы. / Я.Г. Эренпрейс. // Эксперим. онкология. – 1982. – Т.4, № 6. – С.13-18.
102. Янов Ю.К. Молекулярно-генетические маркеры опухоли и их анализ для диагностики и терапии онкологических больных. / Ю.К. Янов, А.А. Новик, А.С. Белохвостов. // Клинич. медицина. – 1999. – № 11. – С.4-9.
103. Avalosse B. Gene therapy for cancer. / B. Avalosse, F. Dupont, A. Burny. // Curr. Opin. Oncol. – 1995. – N.7. – P.94-100.
104. Baal N. Expression of transcription factor Oct-4 and other embryonic genes in CD133 positive cells from human umbilical cord blood. / N. Baal et al. // Thromb. Haemost. – 2004. – Vol.92, N.4. – P.767-775.
105. Berenblum J. A new, quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. / J. Berenblum, P. Shubik. // Brit. J. Cancer. – 1947. – Vol.1. – P.383-391.
106. Belt W.R. Historical aspects of cancer. / W.R. Belt. // Cancer. / Ed. R.W. Raven. – London: Butterworth, 1957. – Vol.1. – P.1-5.



107. Birchmeier W. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. / W. Birchmeier, J. Behrens. // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1994. – Vol.1198. – P.11-26.
108. Bonnet D. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. / D. Bonnet, J.E. Dick. // *Nat. Med.* – 1997. – Vol.3. – P.730-737.
109. Boyer L.A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. / L.A. Boyer, T.I. Lee, M.F. Cole et al. // *Cell.* – 2005. – Vol.122, N.6. – P.947-956.
110. Busch H. A general concept for molecular biology of cancer. / H. Busch. // *Cancer Res.* – 1976. – Vol.36, N.11. – Pt.2. – P.4291-4294.
111. Clarke M.F. Cancer stem Cells – perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. / M.F. Clarke, J.E. Dick, P.B. Dirks et al. // *Cancer Rev.* – 2006. – Vol.66. – P.9339-9344.
112. Colombo M.P. Cytokine gene transfer in tumor inhibition and tumor therapy: where are we now? / M.P. Colombo, G. Form. // *Immunol. today.* – 1994. – N.15. – P.48-51.
113. Culver K.V., Blaese R.M. Gene therapy for cancer. / K.V. Culver, R.M. Blaese. // *TIG.* – 1994. – Vol.10, N.5. – P.174-178.
114. Decosse I.I. Embryonic inductive tissue that causes histologic differentiation of murine mammary carcinoma in vitro. // I.I. Decosse, Gossens C., I.F. Kuzma, B.R. Unsworth. // *J. Nat. Cancer Inst.* – 1975. – Vol.54. – P.913-922.
115. Fujiwara T. A retro-viral wild type p-53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by including apoptosis. / T. Fujiwara, E.A. Grimm, D.W. Cai. // *Cancer Res.* – 1993. – V.53. – P.4129-4133.
116. Gidekel S. Oct- $3/4$  is a dose-dependent oncogenic fate determinant. / S. Gidekel, G. Pizov, Y. Bergman, E. Pikarsky. // *Cancer Cell.* – 2003. – Vol.4, N.5. – P.361-370.

117. Greider C.W. Identification of specific telomere terminal transferase activity in Tetrahema extracts. / C.W. Greider, E.H. Blackburn. // Cell. – 1985. – Vol.43. – P.405-413.
118. Hanahan D. The hallmark of cancer. / D. Hanahan, R.A. Weinberg. // Cell. – 2000. – Vol.100. – P.57-70.
119. Hattori K. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. / K. Hattori, B. Heissig, K. Tashiro et al. // Blood. – 2001. – Vol.97. – P.3354-3360.
120. Hayflick L. The serial cultivation of human diploid cell strains. / L. Hayflick, P.S. Moorhead. // Exp. Cell. Res. – 1961. – Vol.25. – P.585-621.
121. Holliday R. A new theory of carcinogenesis. / R. Holliday. // Br. J. Cancer. – 1979. – Vol.40, N.4. – P.513-522.
122. Kafiq K. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. / K. Kafiq, A. Bergtold, R. Clynes. // J. Clin. Invest. – 2002. – Vol.110. – P.71-79.
123. Kaplan R.N. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. / R.N. Kaplan, R.D. Riba, S. Zacharoulis et al. // Nature. – 2005. – Vol.438. – P.820-827.
124. King T.I. An attempt to determine the developmental potentialities of the cancer cell nucleus by means of transplantation. / T.I. King, R.G. McKinnell. // In: Cell Physiology of Neoplasia. – Austin. – 1960. – P. 591-617.
125. Kucia M. Bone marrow as a source of circulating CXCR4+tissue-committed stem cells. / M. Kucia, J. Ratajczak, M.Z. Ratajczak. // Biol. Cell. – 2005. – Vol.97. – P.133-146.
126. Kucia M. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. / M. Kucia, R. Reca, K. Miekus et al. // Stem Cells. – 2005. – Vol.23(7). – P.879-894.

127. Lyden D. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumour angiogenesis and growth. / D. Lyden et al. // *Nature Med.* – 2001. – N.7. – P.1194-1201.
128. Mantel Ch. Steel factor regulates cell cycle asymmetry. / Ch. Mantel, P. Hendrie, H.E. Brokmeyer. // *Stem Cell.* – 2001. – Vol.19. – P.483-491.
129. Mintz B. Gene expression in neoplasma and differentiation. / B. Mintz. // *Harvey Lect.* – 1978. – Vol.71. – P.193-246.
130. Mintz B. Teratocarcinomas and other neoplasms as developmental defects in gene expression. / B. Mintz, R.A. Fleishman. // *Adv. Cancer. Res.* – 1981. – Vol.34. – P.211-278.
131. Morgan R.A. Human gene therapy. / R.A. Morgan, W.F. Anderson. // *Annu. Rev. Biochem.* – 1993. – Vol.62. – P.191-217.
132. Parmiani G. Immunological gene therapy with ex vivo gene-modified tumor cells: a critique and reappraisal. / G. Parmiani, M. Rodolfo, C. Melani. // *Hum. Gene Ther.* – 2000. – Vol.11. – P.1269-1275.
133. Parmiani G. Vaccination of patients with solid tumours. / G. Parmiani, L. Pilla, C. Castelli, L. Rivoltini. // *Ann. Oncol.* – 2003. – Vol.418. – P.817-824.
134. Perl A.K. A causal role for E-cadherin in the transition adenoma to carcinoma. / A.K. Perl, P. Wilgenbus, U. Dahl et al. // *Nature.* – 1998. – Vol.392. – P.190-193.
135. Pierce G.B. Differentiation and cancer. / G.B. Pierce, L.D. Jonson. // *In Vitro.* – 1971. – Vol.7. – P.140-145.
136. Pierce G.B. Differentiation of normal and malignant cells. / G.B. Pierce. // *Fed. Proc.* – 1970. – Vol.29, N.3. – P.1248-1254.
137. Pierce G.B. Differentiation of malignant to benign cells. / G.B. Pierce, C. Wallace. // *Cancer Res.* – 1971. – Vol.31. – P.127-134.
138. Ponta H. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. / H. Ponta, L. Sherman, P.A. Herrlich. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2003. – Vol.4. – P.33-45.

139. Ribas A. Cancer immunotherapy using gene-modified dendritic cells. / A. Ribas, L.H. Butterfield, I.A. Glaspy et al. // *Curr. Gene Ther.* – 2002. – Vol.110. – P.57-78.
140. Ribas A. Current development in cancer vaccines and cellular immunotherapy. / A. Ribas, L.H. Butterfield, I.A. Glaspy et al. // *Clin. Oncol.* – 2003. – Vol.21. – P.2415-2432.
141. Ribas A. Genetic immunotherapy for cancer. / A. Ribas, L.H. Butterfield, J.S. Economou. // *Oncologist.* – 2000. – Vol.5. – P.87-98.
142. Rosenberg S.A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. / S.A. Rosenberg. // *Nature.* – 2001. – Vol.411. – P.380-384.
143. Rous P. Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states. A study of the tar tumours of rabbits. / P. Rous, J.Y. Kidd. // *J. Exp. Med.* – 1941. – Vol.73. – P.365-389.
144. Seder R.A. DNA vaccines: immunology application and optimisation. / R.A. Seder, S. Gurunatban. // *Annu. Rev. Immunol.* – 2000. – Vol.18. – P.927-974.
145. Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. / D. Sidransky. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2002. – Vol.2. – P.210-219.
146. Sikora K. Gene therapy for cancer. / K. Sikora. // *Trends Biotechnol.* – 1993. – Vol.11, N.5. – P.197-201.
147. Singh S.K. Identification of human brain tumour initiating cells. / S.K. Singh, C. Hawkins C., Y.D. Clarke et al. // *Nature.* – 2004. – Vol.432. – P.396-401.
148. Scholer H.R. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. / H.R. Scholer, S. Ruppert, N. Suzuki et al. // *Nature.* – 1990. – Vol.344, N.6265. – P.435-439.
149. Sporn M.B. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. / M.B. Sporn, G.J. Todaro. // *N. Engl. J. Med.* – 1980. – Vol.303. – P.878-880.
150. Tai Mei-Hui. Oct-4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. / Mei-Hui Tai, Chia-Cheng Chang, L.K. Olson, J.E. Trosko. // *Carcinogenesis.* – 2005. – Vol.26. – P.495-502.

151. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. // Curr. Opin. Cell. Biol. – 1993. – N.5. – P.806-811.
152. Thorne S.H. Synergistic antitumor effect of immune cell-viral biotherapy. / S.H. Thorne, R.S. Negrin, C.H. Contag. // Science. – 2006. – Vol.311. – P.1780-1784.
153. Ulmer J.B. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. / J.B. Ulmer, J.J. Donnelly, S.E. Parker et al. // Science. – 1993. – Vol.259. – P.1745-1749.
154. Watson J.D. Origin of concatemeric T7 DNA. / J.D. Watson. // Nat. New Biol. – 1972. – Vol.239(94). – P.197-201.
155. Weinberg R.A. Oncogenes of spontaneous and chemically induced tumors. / R.A. Weinberg. // Advan. Cancer Res. – 1982. – Vol.36. – P.149-152.
156. Zahng J.Y. Apoptosis-based anticancer drugs. / J.Y. Zahng. // Nat. Rev. Drug Discov. – 2002. – Vol.1, N.2. – P.101-102.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. Геном нормальной соматической клетки.....	13
1.1. ДНК – молекула жизни: открытие структуры и функции, значение открытия.....	13
1.2. Раскрытие «секрета жизни» – значение для медицины и онкологии	23
1.3. Открытие строения генома человека – значение для медицины и онкологии.....	32
Глава 2. Протеом нормальной соматической клетки.....	43
2.1. Протеом клетки – значение для медицины, ранней диагностики раковой клетки и излечения рака.....	43
2.2. Сигнальный пептид Г. Блобеля, управляющий транспортом белков и их локализацией внутри клетки, – значение для онкологии.....	52
2.3. «Убиквитин-опосредованное расщепление» «ненужных» белков в клетке – значение для онкологии.....	56
Глава 3. Нормальная соматическая клетка.....	66
3.1. Смертность нормальной соматической клетки: молекулярные причины.....	66
3.2. Передача сигнала извне для деления нормальной клетки.....	74
Глава 4. Раковая соматическая клетка.....	80
4.1. Бессмертие раковой соматической клетки: молекулярные причины	80
4.2. Нарушения в передаче сигнала к делению в раковой клетке: новые мишени для уничтожения раковой клетки.....	85
Глава 5. Клеточный цикл. Молекулы-регуляторы клеточного цикла открывают пути к диагностике и уничтожению раковых клеток.....	95
Глава 6. Канцерогенез.....	109
6.1. Канцерогенез из стволовой клетки ткани: молекулярные причины	109
6.2. Что такое предрак?.....	120
6.3. Инвазия раковых клеток: молекулярные причины и пути предотвращения.....	130

6.4. Метастазирование раковых клеток: молекулярные причины и пути предотвращения.....	142
6.5. Ангиогенез и лимфангиогенез и их ингибирование для подавления пролиферации раковых клеток первичного рака и метастазов.....	154
6.6. Участие гемопоэтических клеток костного мозга в процессе метастазирования: новые мишени диагностики метастазов раковых клеток и их уничтожения.....	163
Глава 7. Методы для ранней диагностики раковых клеток.....	172
7.1. ПЦР-ММК – метод ранней диагностики раковых клеток.....	172
7.2. Биочип или микроматрица – устройство для ранней диагностики раковых клеток, слежения за лечением рака и контроля излечения.....	187
7.3. ДНК-чип для диагностики раковых клеток первичной опухоли и микрометастазов по плазме крови пациента.....	196
7.4. Белковый чип для диагностики раковых клеток первичной опухоли и микрометастазов по сыворотке крови пациента.....	203
Глава 8. Методы уничтожения раковых клеток.....	210
8.1. «Малые интерферирующие РНК» – «выключатели» гена и средство для ингибирования пролиферации раковых клеток.....	210
8.2. Апоптоз и пути его применения для уничтожения раковых клеток.....	215
8.3. Вирусы – естественное средство для уничтожения раковой клетки любого типа.....	228
8.4. Стволовые клетки – естественное средство поиска и уничтожения раковых клеток.....	241
Глава 9. Иммунная система защищает внутреннюю среду организма от экзогенных и эндогенных антигенов.....	249
9.1. Как Т-лимфоциты узнают антигены на раковых клетках и уничтожают их носителей.....	249
9.2. Моноклональные Т-клеточные рецепторы (м ТКР) – основа к созданию нового класса «препарата-уничтожителя» раковых клеток....	259
Глава 10. Иммуноterapia – лечение от рака в XXI веке.....	266

10.1. Вакцины – основное средство поиска и уничтожения раковых клеток.....	266
10.2. Вакцина на основе дендритных клеток для поиска и уничтожения раковых клеток.....	273
10.3. ДНК-вакцина – новый способ поиска и уничтожения раковых клеток.....	281
10.4. Вакцина на основе «гена tag 7» для уничтожения раковых клеток и профилактики их возникновения.....	288
10.5.РНК-вакцина-новый способ поиска и уничтожения раковых клеток.....	297
10.6. Ксеновакцина – метод профилактики возникновения раковых клеток и их уничтожения.....	305
Глава 11. Реверсия раковых клеток.....	318
11.1. Индукция реверсии раковых клеток – путь их ликвидации.....	318
Заключение.....	330
Список литературы.....	343