

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.276.2:546.72].015.44

Селимова Л.М.¹, Калнина Л.Б.¹, Каплина Э.Н.², Носик Д.Н.¹

ВЛИЯНИЕ ФЕРРОВИРА НА ЭКСПРЕССИЮ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ АКТИВАЦИИ КЛЕТКАМИ НЕОПЛАСТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ МТ-4

¹«Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва;

²«Техномедсервис», 105318, Москва

Изучена иммуномодулирующая активность препарата "ферровир" в системе in vitro при использовании в качестве модели неопластической клеточной линии МТ-4. Ферровир снижал количество клеток, содержащих такие маркеры активации, как CD28⁺, CD38⁺, CD62L⁺, CD69⁺ и HLA-DR⁺. При инкубации клеток 24 ч в присутствии 500 мкг/мл препарата индексы снижения количества клеток (ИСЭ), экспрессирующих эти белки, составляли для белков CD28, CD38, CD62L и HLA-DR 1,9±0,4, 1,3±0,4, 1,2±0,4, 1,1±0,06 соответственно. При длительной инкубации клеток в присутствии ферровира наибольший эффект наблюдался после 7 дней инкубации, и ИСЭ для перечисленных выше белков составляли 3,2, 3,4, 6,2, 1,4 и 3,1 соответственно. Только для белка CD62L отмечено существенное снижение количества клеток, несущих этот маркер и на 11-й день культивирования клеток в присутствии ферровира (ИСЭ 3,89). Возможно, что благодаря такому действию ферровира может снижаться процесс распространения клеток, содержащих интегрированный патогенетический материал, по органам и тканям организма и замедляться генерализация инфекционного процесса. Полученные результаты указывают на то, что ферровир обладает иммуномодулирующей активностью in vitro, поскольку способен снижать активационный потенциал неопластической линии клеток МТ-4. Эти его свойства могут быть полезны при лечении различных видов рака, ВИЧ-инфекции и других заболеваний человека. Снижение уровня активации клеток иммунной системы также снижает риск развития оппортунистических инфекций.

Ключевые слова: ферровир; МТ-4-клетки; фенотипические маркеры CD4⁺, CD25⁺, CD28⁺, CD38⁺, CD62L⁺, CD69⁺, CD95⁺, HLA-DR⁺.

Для цитирования: Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Каплина Э.Н., Носик Д.Н. Влияние ферровира на экспрессию поверхностных маркеров активации клетками неопластической линии МТ-4. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (6): 355-359. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-355-359>

Selimova L.M.¹, Kalnina L.B.¹, Kaplina E.N.², Nosik D.N.¹

THE EFFECT OF FERROVIR ON TO EXPRESSION OF SURFACE MARKERS OF ACTIVATION BY CELLS NEOPLASTIC LINE MT-4

¹The D.I. Ivanovskii institute of virology of the N.F. Gamaleia Federal research center of epidemiology and microbiology of Minzdrav of Russia, 123098 Moscow, Russia

²The "Tekhnomedservis", 105318 Moscow, Russia

The immune-modulating activity of "Ferrovir" medication in system in vitro was analyzed using neoplastic cellular line MT-4 as a model. Ferrovir decreased number of cells containing such markers of activation as CD28⁺, CD38⁺, CD62L⁺, CD69⁺ and HLA-DR⁺. Under 24 hours incubation period of cells in presence of 500 mkg per ml of medication, indices of decreasing of number of cells expressing these proteins (IRE), for proteins CD28, CD38, CD62L and HLA-DR made up to 1,9 ± 0,4, 1,3 ± 0,4, 1,2 ± 0,4, 1,1 ± 0,06 correspondingly. At prolonged incubation of cells in presence of Ferrovir, the maximal effect was observed after 7 days of incubation and IRE for proteins mentioned above made up to 3,2, 3,4, 6,2, 1,4 and 3,1 correspondingly. Only for protein CD62L was marked a significant decreasing of number of cells bringing this marker and at 11th day of cells cultivation in presence of Ferrovir (IRE 3.89). It is possible that such an action of Ferrovir can decrease the process of spreading of cells containing integrated pathogenic material through organs and tissues of organism and slow down generalization of infectious process. The obtained results indicate that Ferrovir has an immune-modulating activity in vitro since it can decrease activating potential of neoplastic line of cells MT-4. These features can be useful in treatment of various type of cancer, HIV-infection and other human diseases. The decreasing of level of activation of cells of immune system also decreases risk of development of opportunistic infections.

Key words: Ferrovir; cells MT-4; phenotype markers CD4⁺, CD25⁺, CD28⁺, CD38⁺, CD62L⁺, CD69⁺, CD95⁺, HLA-DR⁺.

For citation: Selimova L.M., Kalnina L.B., Kaplina E.N., Nosik D.N. The effect of ferrovir on to expression of surface markers of activation by cells neoplastic line MT-4. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (6): 355-359. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-355-359>

For correspondence: Selimova L.M., doctor of biological sciences, leading researcher. e-mail: lselim@mail.ru.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 30.01.2017
Accepted 15.02.2017

Введение. Регуляция адаптивного иммунного ответа может осложняться развитием в организме хронической активации клеточного звена иммунитета. Хроническую

Для корреспонденции: Селимова Людмила Мидатовна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: lselim@mail.ru.

активацию наблюдают при злокачественных процессах, аутоиммунных расстройствах и некоторых инфекционных заболеваниях. Наиболее ярким примером развития иммунопатологических нарушений может служить ВИЧ-инфекция [1]. Комбинированная антиретровирусная терапия ВИЧ-инфекции стала очень эффективной.

Но даже успешная химиотерапия не восстанавливает в полном объеме функцию всех звеньев иммунной системы [2], в том числе CD4⁺ Т-лимфоцитов [3]. CD4⁺ Т-лимфоциты – существенный компонент регуляции врожденного и адаптивного иммунного ответа; в этих же клетках происходит репликация вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Активированный статус этих клеток при развитии ВИЧ-инфекции создает условия для персистенции ВИЧ в организме и повышает риск развития сопутствующих инфекций [4]. В связи с этим особое значение приобретает иммуномодулирующая терапия. Использование препаратов, обладающих иммуномодулирующей активностью, – важное направление в разработке эффективных схем лечения хронической активации иммунной системы, поэтому ведется интенсивный поиск препаратов, которые можно использовать в комплексной терапии в качестве дополнительных компонентов, снижающих активацию иммунных клеток, но при этом не препятствующих организации адекватного иммунного ответа.

В качестве иммуномодулирующих препаратов описаны различные вещества. Среди них можно отметить миноциклин. Он относится к группе полусинтетических антибиотиков тетрациклинового ряда, обладает анти-ВИЧ-активностью и снижает активацию клеток [5]. С 2000 г. активно изучают поливалентный иммуномодулятор фукоидан, являющийся сульфатированным монополисахаридом фукозы природного происхождения [6]. Показано, что карведилол (органическое гетероциклическое соединение) также снижает активацию клеток периферической крови *in vitro* [7].

В Российской Федерации уже давно используют иммуномодулирующий препарат "ферровир". Ферровир по химическому составу – натриевая соль двуспиральной дезоксирибонуклеиновой кислоты природного происхождения, модифицированная ионами железа. Он относится к фармакологической группе противовирусных препаратов с иммуномодулирующими свойствами, и его эффективность показана в отношении различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов, включая ВИЧ-1 [8, 9]. Часто для репликации вируса используют неопластическую клеточную линию МТ-4, представляющую собой CD4⁺ Т-лимфоциты человека, трансформированные Т-лимфотропным вирусом человека 1-го типа (ТЛВЧ-1) [10]. Механизм действия препарата неизвестен. Полагают, что его противовирусная активность не связана со специфическим действием на репликацию вируса. Можно предположить, что препарат способен снижать активацию МТ-4-клеток. Неопластическая клеточная линия МТ-4 для культивирования не требует экзогенных факторов роста и способна пассироваться длительное время *in vitro*. По фенотипическим характеристикам она относится к активированным клеткам. Ранее нами был показан высокий уровень экспрессии ею таких маркеров активации, как CD25⁺, CD28⁺, CD38⁺, CD62L⁺, CD69⁺, CD95⁺ и HLA-DR⁺ [11]. Все перечисленные свойства клеточной линии МТ-4 делают ее удобной моделью для изучения иммуномодулирующих свойств ферровира в качестве вещества, влияющего на экспрессию маркеров активации клетками иммунной системы.

Материал и методы. Клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% сыворотки эмбриона коровы, 2мМ L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37°C. Клетки пересевали через 3–4 дня, плотность при пересеве состав-

ляла 2,5 · 10⁵ кл/мл. Для изучения влияния ферровира на экспрессию маркеров активации через 3 дня после пересева клеток в культуральную жидкость вносили препарат до конечной концентрации 500 мкг/мл на 24 ч (ферровир, «Техномедсервис», Россия) либо проводили длительную инкубацию клеток в присутствии указанной концентрации ферровира. Для анализа наружных фенотипических маркеров клетки окрашивали следующими моноклональными антителами фирмы Beckman Coulter (США): CD4 (PE или PC5), CD25 (PE), CD28 (PC5), CD38 (PC5), CD62L (PE), CD69 (PC5), CD95 (PE), HLA-DR (PE). Суспензию клеток предварительно отмывали три раза в 0,01 М фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7,2) путем центрифугирования при 800 об/мин в течение 6 мин и суспендировали в том же растворе при концентрации 2 · 10⁶ кл/мл. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре EPICS XL (Beckman Coulter, США). Полученные гистограммы были обработаны с использованием программы Kalusa (Beckman Coulter, США).

Индекс снижения количества клеток, экспрессирующих маркер активации (ИСЭ), вычисляли по формуле:

$$\frac{\% \text{ клеток, экспрессирующих маркер активации без препарата}}{\% \text{ клеток, экспрессирующих маркер активации в присутствии препарата}}$$

Статистический анализ данных проводили с использованием программы BioStat 2009 (AnalystSoft). Уровень значимости (α) был равен 0,05.

Результаты и обсуждение. Ранее при изучении анти-ВИЧ активности было показано, что оптимальной противовирусной концентрацией ферровира, не оказывающей цитопатического эффекта на клетки МТ-4, является 500 мкг/мл [9]. Поэтому с использованием этой концентрации было проведено предварительное изучение влияния ферровира на экспрессию маркеров активации. Клетки через 3 дня после пересева инкубировали в присутствии препарата в течение 24 ч и затем определяли количество клеток, несущих отдельный фенотипический маркер. Оказалось, что ИСЭ таких белков, как CD25, CD69 и CD95, практически не изменялся. Хорошо выраженный эффект наблюдали в случае с белками CD28, CD38 и CD62L (1,9±0,4, 1,3±0,4 и 1,2±0,4 соответственно) и незначительный – для белка HLA-DR (1,1±0,06). В разных опытах во всех случаях наибольшее снижение ИСЭ наблюдали для белка CD28, в то время как для белков CD38 и CD62L в некоторых опытах этот показатель был незначительным. На основании этих данных можно заключить, что ферровир способен снижать экспрессию отдельных маркеров активации клетками МТ-4 при концентрации 500 мкг/мл. В следующей серии опытов мы изучили этот эффект с использованием более низких концентраций препарата на примере трех белков, показавших максимальное, среднее и минимальное снижение, это белки CD28, CD38 и HLA-DR. Результаты представлены в табл. 1, из которой видно, что снижение экспрессии изученной группы маркеров в клеточной популяции наблюдается только при концентрации ферровира 500 мкг/мл. При этом наибольшее снижение наблюдали для белка CD28 и существенно меньшее, для CD38 и HLA-DR. Из таблицы также видно, что при меньшей в 5 раз концентрации наблюдается незначительное снижение, а при 20 мкг/мл влияния препарата не обнаруживается.

Полученные результаты показывают, что в изучен-

Таблица 1

Индекс снижения экспрессии маркеров активации клетками МТ-4 в присутствии различных концентраций ферровируса*

Маркер	Концентрация ферровируса, мкг/мл		
	20	100	500
CD4 ⁺ CD28 ⁺	1±0,6	1,014±0,1	2,3±0,6
CD4 ⁺ CD38 ⁺	1,02±0,025	1,035±0,22	1,15±0,25
CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	1±0,06	1±0,06	1,1±0,06

Примечание. * – средние значения и стандартные отклонения.

ном диапазоне концентраций ферровируса зависимости подавления экспрессии маркеров активации от дозы не наблюдалось. Можно предположить, что это связано с особенностью взаимодействия препарата с клетками, свойствами препарата и клеточной линии. Возможно, процесс проникновения ферровируса в клетки малоэффективен и его действие проявляется только при увеличенной концентрации. Присутствующие в составе препарата ионы железа должны улучшать адсорбцию ферровируса на плазматической мембране клеток, имеющей отрицательный заряд [12]. К сожалению, нам неизвестны особенности строения препарата и поэтому можно делать только общие предположения, основанные на данных литературы. Проникновение ферровируса как низкополимерной ДНК через плазматическую мембрану может происходить в процессе адсорбции на плазматической мембране клетки с участием специфических рецепторов и последующим эндоцитозом при участии клатрина [13]. В дальнейшем этот материал попадает в эндосомально-лизосомальную систему, где происходит его переработка [14]. При этом могут активироваться различные биологические реакции с участием ферментов, в частности трансфераз, и белковых комплексов. Активация Т-клеток регулируется балансом фосфорелияции и дефосфорелияции и контролируется киназами и фосфатазами. Если препарат обладает антиокислительными свойствами, происходит активация белковых факторов, участвующих в передаче сигналов, приводящих к снижению активности факторов транскрипции. В результате активируются механизмы, регулирующие транскрипцию генов, ответственных за синтез изучаемых в данном исследовании маркеров активации. Каждый из них имеет свои особенности регуляции транскрипции, трансляции, созревания и транспорта на плазматическую мембрану клетки, и эти механизмы накладываются на биологические ритмы отдельных клеток в популяции линии МТ-4. Возможно, присутствующие в культуральной жидкости биологически активные вещества могут снижать действие препарата или разрушать его. Нельзя исключить, что для более выраженного эффекта необходимо длительное присутствие препарата в культуре клеток. Поэтому в следующей серии опытов клетки культивировали с ферровирусом в течение 11 дней. Пересев клеток проводили через 4 дня, сохраняя исходную концентрацию препарата 500 мкг/мл. На 3-й день после посева определяли количество клеток, содержащих наружные маркеры активации. Ранее нами показано, что в это время обнаруживается наибольший процент клеток, экспрессирующих изучаемые белки [11]. Результаты представлены в табл. 2. Кроме основного фенотипического маркера CD4⁺, МТ-4-клетки содержат также и другой маркер CD25⁺, являющийся α- цепью рецептора

Т-клеточного фактора роста ИЛ-2 [15]. Этот белок экспрессируется трансформированными ТЛВЧ-1-клетками в больших количествах [16], и МТ-4-клетки принято обозначать как популяцию CD4⁺CD25⁺. Как видно из табл. 2, в течение всего срока пассирования снижения количества клеток, экспрессирующих белок CD25, не было. Для белков CD28 и CD38 наблюдалось снижение количества клеток, экспрессирующих эти белки, уже после инкубации в течение 24 ч с ферровирусом. На 7-й день инкубации оно достигло существенного максимума. Незначительное уменьшение количества клеток, экспрессирующих белок CD62L, обнаруживалось на 4-й день культивирования в присутствии ферровируса, на 7-й день оно было наибольшим. Снижение доли клеток, экспрессирующих белок HLA-DR, причем существенное, и белок CD69, наблюдалось только на 7-й день. Таким образом, максимальное снижение доли клеток, экспрессирующих все перечисленные маркеры активации, выявлено на 7-й день. На 11-й день культивирования клеток в присутствии ферровируса, за исключением белка CD62L, снижение количества клеток с указанными маркерами уже не обнаруживалось. Возможно, что наблюдаемое на 7-й день культивирования снижение уровня экспрессии отдельных маркеров активации может быть критичным для сохранения жизнеспособности клеточной линии. Показано, что CD28 регулирует экспрессию CD25 и повышает его стабильность [17]. CD38 относится к многофункциональным белкам и на мембране лимфоцитов выполняет функцию эктоэнзима. В некоторых случаях его активация сопровождается интернализацией в цитоплазму клетки или высвобождением в растворимой форме в окружающую среду. Полностью его роль и механизмы действия пока неизвестны, не обнаружены и его лиганды. Взаимодействие на мембране клетки CD38 с антителами к нему усиливает пролиферацию клеток, предотвращая апоптоз, усиливает синтез цитокинов, активацию киназ и фосфорелияцию отдельных белков [18]. Полагают, что CD69 регулирует циркуляцию клеток при хронических воспалениях, снижает иммунные ответы путем изменения уровня секреции плейотропного цитокина, называемого трансформирующим фактором роста (TGF-β1) [19]. Точная роль этого белка неясна, поскольку неизвестны его лиганды. HLA-DR – это основной маркер активации иммунных клеток, который был обнаружен одним из первых в CD4⁺-клетках у пациентов с Т-клеточным лейкозом, ассоциированным с ТЛВЧ-1-инфекцией [20]. На 7-й день культивирования МТ-4-клеток с ферровирусом наблюдалось незначительное снижение экспрессии белка CD95. Считается, что CD95 играет большую роль в регуляции иммунной системы, управляя гомеостазом, периодом полужизни клеток и скоростью обновления клеточной популяции. Его активация может служить костимулирующим сигналом для пролиферации клеток и продукции цитокинов либо сигналом развития апоптоза. Показано, что проапоптотическая активность этого белка может подавляться различными механизмами с участием протеинкиназ [21]. МТ-4-клетки имеют свои особенности регуляции на молекулярно-биологическом уровне, и проапоптотическая активность этого белка в них, вероятно, подавлена. Количество клеток, экспрессирующих CD95 на разных сроках культивирования в течение 24 ч, как правило, составляло в наших исследованиях 95–100% и не зависело от присутствия ферровируса. Возможно, наблюдаемое снижение его экспрессии на 7-й день культивирования в

Таблица 2

Индекс снижения экспрессии маркеров активации при длительном культивировании клеток МТ-4 в присутствии ферровируса

Маркер	Время культивирования, 24 ч, 4, 7, 11 дней	Среднее значение±σ
CD4 ⁺ CD25 ⁺	1, 0,99, 1, 0,99	0,99±0,0045
CD4 ⁺ CD28 ⁺	1,62, 1,18, 3,2, 1,04	1,76±0,99
CD4 ⁺ CD38 ⁺	1,8, 1,47, 3,4, 1,06	1,9±1,01
CD4 ⁺ CD62L ⁺	0,9, 1,16, 6,18, 3,887	3,035±2,5
CD4 ⁺ CD69 ⁺	1, 0,99, 1,42, 0,99	1,1±0,21
CD4 ⁺ CD95 ⁺	1, 1, 1,1, 0,99	1,02±0,05
CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	1, 1, 3,06, 0,95	1,5±1,04

присутствии препарата является критическим для жизнеспособности клеточной линии МТ-4, как и уменьшение количества клеток, экспрессирующих белки CD28, CD38, CD69, HLA-DR. Поэтому на 11-й день культивирования в присутствии ферровируса снижения доли клеток, несущих перечисленные выше белки, по сравнению с контрольными, не наблюдалось. Скорее всего это следствие действия компенсаторных механизмов.

Остановимся на особенностях динамики снижения экспрессии белка CD62L. Этот белок (L-селектин) обеспечивает инфильтрацию активированных Т-лимфоцитов в различные органы и ткани, где с их участием могут развиваться многие биологические процессы, в том числе и патологические [22]. Как видно из табл. 2, существенное снижение количества клеток, несущих CD62L, в отличие от других белков наблюдалось и на 11-й день культивирования в присутствии ферровируса. Возможно, что уровень синтеза этого компонента не принципиален для жизнеспособности клеточной линии. Наблюдаемое длительное снижение уровня экспрессии этого белка в популяции служит важным показателем. Благодаря такому действию ферровируса может снижаться процесс распространения клеток, содержащих интегрированный патогенетический материал, по различным органам и тканям. Как следствие может снижаться скорость генерализации инфекционного процесса. Нельзя исключить, что это его свойство будет полезно при лечении различных видов рака, ВИЧ-инфекции и других заболеваний человека. Снижение уровня активации клеток иммунной системы к тому же снижает риск развития оппортунистических инфекций.

Заключение. Полученные результаты указывают на то, что ферровирус способен снижать уровень активации неопластической клеточной линии МТ-4. И этим его свойством скорее всего можно объяснить его анти-ВИЧ активность. Нельзя исключить, что ферровирус влияет на экспрессию и других белков, снижая их апоптотическую активность. Показано, что подавление механизмов апоптоза в клетках при заражении ВИЧ-1 снижает уровень репликации вируса [23]. Вероятно, сходные механизмы участвуют в снижении активности вируса в МТ-4-клетках в присутствии ферровируса. Препарат может приводить к изменению экспрессии отдельных белков и маркеров активации и таким образом снижать репликативную активность ВИЧ-1.

На основании полученных результатов можно заключить, что в присутствии 500 мкг/мл ферровируса снижается количество клеток неопластической линии МТ-4,

экспрессирующих на плазматической мембране такие белки как CD28, CD38, CD62L, CD69 и HLA-DR, используемые для характеристики уровня активации клеток иммунной системы. Полученные результаты указывают на то, что ферровирус обладает иммуномодулирующей активностью в системе *in vitro* при использовании в качестве модели неопластической клеточной линии МТ-4.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (pp. 1–7, 10, 12–23
см. REFERENCES)

8. Носик Д.Н., Каплина Э.Н. *Ферровирус: опыт применения в экспериментальной и лечебной практике*. М.: Научная книга; 2005.
9. Носик Д.Н., Носик Н.Н., Каплина Э.Н., Калнина Л.Б., Киселева И.А., Кондрашина Н.Г. и др. Активность препарата «Ферровирус» в отношении РНК- и ДНК-содержащих вирусов. *Вопросы вирусологии*. 2002; 3: 21–3.
11. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. Поверхностные маркеры неопластической клеточной линии МТ-4 и перспективы ее использования в качестве модели для изучения активности иммуномодулирующих препаратов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 12: 822–5.

REFERENCES

1. Appay V., Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J. Pathol.* 2008; 214: 231–41.
2. Robbins G.K., Spritzler J.G., Chan E.S., Asmuth D.M., Gandhi R.T., Rodriguez B.A. et al. Incomplete reconstitution of T cell subsets on combination antiretroviral therapy in the AIDS Clinical Trials Group protocol 384. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 350–61.
3. Kelley C.F., Kitchen C.M., Hunt P.W., Rodriguez B., Hecht F.M., Kitahata M. et al. Incomplete peripheral CD4⁺ cell count restoration in HIV-infected patients receiving long-term antiretroviral treatment. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 787–94.
4. Deeks S.G., Phillips A.N. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing and non-AIDS related morbidity. *Br. Med. J.* 2009; 338a: 3172.
5. Szeto G.L., Brice A.K., Yang H.C., Barber S.A., Siliciano R.F., Clements J.E. Minocycline attenuates HIV infection and reactivation by suppressing cellular activation in human CD4⁺ T cells. *J. Infect. Dis.* 2010; 201: 1132–40.
6. Fitton J.H. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Mar. Drugs*. 2011; 9 (10): 1731–60.
7. Yang S.P., Ho L.J., Lin Y.L., Cheng S.M., Tsao T.P., Chang D.M. et al. Carvedilol, a new antioxidative b-blocker, blocks in vitro human peripheral blood T cell activation by downregulating NF-κB activity. *Cardiovasc. Res.* 2003; 59: 776–87.
8. Носик Д.Н., Каплина Э.Н. *Ферровирус: Опыт применения в экспериментальной и лечебной практике* [Ферровирус: опыт применения в экспериментальной и лечебной практике]. Москва: Scientific book; 2005. (in Russian)
9. Носик Д.Н., Носик Н.Н., Каплина Э.Н., Калнина Л.Б., Киселева И.А., Кондрашина Н.Г. et al. Activity of “Ferrovir” preparation towards RNA and DNA viruses. *Voprosy virusologii*. 2002; 3: 21–3. (in Russian)
10. Pauwels R., De Clercq E., Desmyter J., Balzarini J., Goubau P., Herdewijn P. et al. Sensitive and rapid assay on MT-4 cells for detection of antiviral compounds against the AIDS virus. *Journal of virological methods*. 1987; 16: 171–85.
11. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. The superficial markers of neoplastic cell line MT-4 and perspectives of its application as a model for studying activity of immune modulating preparations. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 12: 822–5. (in Russian)

12. Oral O., Cıkım T., Zuvin M., Unal O., Yagci-Acar H., Gozuacik D. et al. Effect of varying magnetic fields on targeted gene delivery of nucleic acid-based molecules. *Ann. Biomed. Eng.* 2015; 43 (11): 2816–26.
13. Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles.* 2014; 3: 1–14.
14. Doherty G.J., McMahon H.T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 2009; 78: 857–902.
15. Hattori T., Uchiyama T., Toibana T., Takatsuki K., Uchino H. Surface phenotype of Japanese adult T-cell leukemia cells characterized by monoclonal antibodies. *Blood.* 1981; 58: 645–7.
16. Waldmann T.A. The role of the multichain IL-2 receptor complex in the control of normal and malignant T-cell proliferation. *Environ Health Perspect.* 1987; 75: 11–5.
17. Ledbetter J.A., Imboden J.B., Schieven G.L., Grosmaire L.S., Rabinovitch P.S., Lindsten T. et al. CD28 ligation in T-cell activation: evidence for two signal transduction pathways. *Blood.* 1990; 75 (7): 1531–9.
18. Mehta K., Shahid U., Malavasi F. Human CD38, a cell surface protein with multiple functions. *FASEB J.* 1996; 10 (12): 1408–17.
19. Sancho D., Gomez M., Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005; 26: 136–40.
20. Freedman A.S., Nadler L.M. Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 1991; 5: 871–89.
21. Brint E., O'Callaghan G., Houston A. Life in the Fas lane: differential outcomes of Fas signaling. *Cell Mol. Life Sci.* 2013; 70 (21): 4085–99.
22. Tatewaki M., Yamaguchi K., Matsuoka M., Ishii T., Miyasaka M., Mori S. et al. Constitutive overexpression of the L-selectin gene in fresh leukemic cells of adult T-cell leukemia that can be transactivated by human T-cell lymphotropic virus type 1 tax. *Blood.* 1995; 86 (8): 3109–17.
23. Wang X., Ragupathy V., Zhao J., Hewlett I. Molecules from apoptotic pathways modulate HIV-1 replication in Jurkat cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011; 414 (1): 20–4.

Поступила 30.01.17

Принята к печати 15.02.17

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.348-006.04:577.21.08

Бутрович Г.М.^{1,2}, Мирлина Е.Д.^{1,2}, Вербенко В.Н.^{1,2}, Хабарова И.Г.³, Вострюхина О.А.^{1,2}

РАЗРАБОТКА ПЦР-ДИАГНОСТИКИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НА ОСНОВЕ ЦЕЛОСТНОСТИ ДНК, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ФЕКАЛИЙ ПАЦИЕНТА

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» ФГБУ «ПИАФ», 188300, Ленинградская обл., г. Гатчина;

²ФГБОУ ПО «СПбГПУ», 195251, Санкт-Петербург;

³ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург

Представлена разработка процедуры диагностики колоректального рака (КРР) на основе анализа целостности фекальной ДНК. Образцы стула были отобраны у 91 человека, из них 60 с КРР, 24 здоровых добровольца (контрольная группа) и 7 больных с доброкачественными опухолями. Для оценки целостности геномной ДНК методом ПЦР-анализа использовали два протяженных фрагмента – участки генов TP53 и MLH1. В стуле 47 пациентов с КРР выявлены протяженные фрагменты ДНК, в то время как при анализе ДНК из стула людей контрольной группы обнаруживали лишь короткие фрагменты ДНК размером менее 200 н. п.

Разработан метод неинвазивной ПЦР-диагностики КРР, чувствительность и специфичность которого составили соответственно 78 и 100% ($p < 0,0001$). Чувствительность метода не имеет значимых различий для пациентов с разными стадиями заболевания, что позволяет использовать его для ранней диагностики КРР.

Ключевые слова: молекулярно-генетические методы; колоректальный рак; полимеразная цепная реакция; протяженные фрагменты ДНК.

Для цитирования: Бутрович Г.М., Мирлина Е.Д., Вербенко В.Н., Хабарова И.Г., Вострюхина О.А. Разработка ПЦР-диагностики колоректального рака на основе целостности ДНК, выделенной из фекалий пациента. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (6): 359-362. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-359-362>

Butrovich G.M.^{1,2}, Mirulina E.D.^{1,2}, Verbenko V.N.^{1,2}, Habarova I.G.³, Vostryuhina O.A.^{1,2}

THE DEVELOPMENT OF POLYMERASE CHAIN REACTION DIAGNOSTIC OF COLORECTAL CANCER BASED ON DNA INTEGRITY SEPARATED FROM FECES OF PATIENT

¹The National research center "The Kurchatovskii" Institute" of the B.P. Konstantinov St. Petersburg Nuclear Physics Institute, 188300, Gatchina, Russia

²The Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 195251 St. Petersburg, Russia

³The I.P. Pavlov first Sankt-Pereburgskii state medical university of Minzdrav of Russia, 197022 St. Petersburg, Russia

The article presents procedure of diagnostic of colorectal cancer on the basis of analysis of integrity of fecal DNA. The samples of stool were picked out in 91 patients and out of them: 60 patients with colorectal cancer, 24 healthy volunteers (control group) and

Для корреспонденции: Вострюхина Ольга Альбертовна, канд. хим. наук, доц., ст. науч. сотр. отд-ния молекулярной и радиационной биологии ФГБУ «ПИАФ»; e-mail: oavostr@bpc.spbstu.ru