

Кемеровский научный центр СО РАН  
Отдел иммунологии рака  
Кемеровская государственная медицинская академия МЗ РФ  
Кемеровское городское общество иммунологов

# ***Иммунохимия канцерогенеза***

*доклады семинара*

Кемерово, 21 ноября 2000 г.

Кемерово – 2001

**Иммунохимия канцерогенеза:** доклады семинара, Кемерово, 21 ноября 2000 г. /  
Под ред. А.Н. Глушкова. – Кемерово, 2001. – 48 с.  
Рисунков 11, таблиц 3.

Отдел иммунологии рака Кемеровского научного центра СО РАН, Кемеровская государственная медицинская академия МЗ РФ и Кемеровское городское общество иммунологов провели первый семинар по проблемам иммунохимии канцерогенеза. В его работе приняли участие сотрудники СО РАН и СО РАМН, преподаватели вузов, практикующие врачи-иммунологи и онкологи, аспиранты, студенты. В настоящем сборнике опубликованы доклады, представленные на семинаре.

dc@kmr.kuzbass.net  
glushkov@ksma.kuzstu.ac.ru

© Отдел иммунологии рака КеМНЦ СО РАН, 2001

## Содержание

<b>Предисловие редактора</b>	5
<b>Социально-экономические аспекты заболеваемости злокачественными новообразованиями в Кузбассе</b> <i>Магарилл Ю.А., Окунев М.И., Ларин С.А.</i>	7
<b>Хромосомные нарушения у работников канцероопасного производства</b> <i>Дружнин В.Г., Минина В.И., Мокрушина Н.В.</i>	12
<b>Механизмы образования и функции антител при канцерогенезе</b> <i>Глушков А.Н.</i>	18
<b>Синтез конъюгатов канцероген-макроноситель для получения и анализа антител к канцерогенам</b> <i>Костянко М.В.</i>	23
<b>Антитела к канцерогенам в эксперименте</b> <i>Черно С.В.</i>	30
<b>Антитела к канцерогенам у человека</b> <i>Аносова Т.П., Аносов М.П.</i>	34
<b>Системный подход в исследовании генетических основ иммунопатологии раннего возраста</b> <i>Шабалдин А.В., Штейн М.А., Логинова Л.А.</i>	42

## Сокращения

АТ	—	Антитела
ААФ	—	Ацетиламинофлуорен
АГ	—	Антигены
БА	—	Бензантрацен
БАС	—	Блокирующая активность сыворотки
БП	—	Бенз[а]пирен
БСА	—	Бычий сывороточный альбумин
ДБА	—	Дибензантрацен
КГ	—	Канцерогены
ПАУ	—	Полициклические ароматические углеводороды
РЭА	—	Раково-эмбриональный антиген
СКЛ	—	Смешанная культура лимфоцитов
СХО	—	Сестринские хроматидные обмены
ФМБА	—	5-фтор-12-метил-бензантрацен
Х	—	Хризен
ХА	—	Хромосомные aberrации

## Предисловие редактора

Повсеместный непрерывный рост онкологической заболеваемости и смертности вызывает все большую тревогу. Особенно актуальной эта проблема становится для промышленно развитых регионов. Очевидно, что существующие ныне методы лечения рака (хирургический, химиотерапевтический и лучевой) исчерпали свои потенциальные возможности или близки к этому. Именно поэтому в последнее время интенсивно развивается принципиально новая стратегия лечения рака, затрагивающая молекулярные основы канцерогенеза. Успехи в области молекулярной биологии и химии нуклеиновых кислот, открытие онкогенов и антионкогенов привели к созданию методов генотерапии рака. Некоторые из них уже проходят клинические испытания. Проблемы генодиагностики и генотерапии в Сибирском отделении РАН решаются в Новосибирском институте биоорганической химии и в Институте цитологии и генетики. Однако не следует забывать о том, что эта стратегия направлена на восстановление нарушенного генома, на исправление мутаций. Необходимо понимать, что если мы не научимся защищать геном от повреждающих воздействий, никакие, даже самые эффективные методы восстановления нарушенного генома никак не повлияют на рост заболеваемости. В основу профилактики рака должна быть заложена стратегия защиты генома от канцерогенных (мутагенных) факторов. Одним из подходов к развитию этой стратегии является создание антиканцерогенных вакцин.

В настоящее время над созданием анти-КГ вакцин за рубежом работают 2 лаборатории, во Франции и в США, и перспективы создания анти-КГ вакцин за рубежом достаточно высоки. Вместе с тем, пока еще нет четких признаков того, что французские и американские ученые перешли от фазы экспериментальных исследований к клинической апробации своих препаратов. Общий недостаток зарубежных исследований – отсутствие системности, теоретической проработки проблемы. Основные закономерности образования антител к канцерогенам у человека не исследуются, не учитывается возможность стимуляции канцерогенеза под действием вакцин, и поэтому даже не ставится задача по разработке системы показаний/противопоказаний для применения вакцин.

Разработкой данной проблемы в нашей стране занимается Отдел иммунологии рака Кемеровского научного центра СО РАН. В 1999г. это направление исследований было серьезно поддержано Объединенным ученым советом по биологическим наукам СО РАН. С 2000г. принят к реализации интеграционный проект СО РАН «Новые материалы для ранней иммунодиагностики и профилактики рака». Научно-методическое руководство этих исследований осуществляется Новосибирским институтом биоорганической химии СО РАН. В них принимает участие Кемеровская государственная медицинская академия МЗ РФ. Основные исследования проводятся на базе Кемеровского областного клинического онкологического диспансера и Центральной городской детской клинической больницы

## **Социально-экономические аспекты заболеваемости злокачественными новообразованиями в Кузбассе**

*Магарилл Ю.А, Окунев М.И., Ларин С.А.*

*Кемеровская государственная медицинская академия*

*Кемеровский областной клинический онкологический диспансер*

*Кемеровский научный центр СО РАН*

Злокачественные новообразования являются одной из основных причин смерти и инвалидизации населения, в том числе его трудоспособной части.

В России наблюдается ежегодное и неуклонное увеличение числа больных с впервые установленным диагнозом злокачественного новообразования. Так в 1999 году диагноз злокачественного новообразования впервые установлен 441438 больным, что соответствует регистрации, в среднем, 50,4 случаев в час, показатель заболеваемости составил 208,7 на 100 тыс. населения (среднегодовой темп прироста 0,5%).

В Кемеровской области число больных с впервые в жизни установленным диагнозом злокачественного новообразования увеличилось за 10 истекших лет на 11,8% и составило в 1999 году абсолютное число 8493 или 282,4 на 100 тыс. населения.

Динамика заболеваемости и смертности представлена на рис.1. Структура заболеваемости по Кузбассу за последние годы не изменилась:

- на первом месте рак легких - 49,4 на 100 тыс. населения;
- на втором месте рак желудка - 32,4 на 100 тыс. населения;
- на третьем месте рак молочной железы - 29,3 на 100 тыс. населения.

Рак молочной железы в структуре заболеваемости женского населения много лет занимает первое место. В ряде населенных пунктов заболеваемость превышает областной показатель: Яшкинский район - 36,9; Новокузнецк - 38,6 на 100 тыс. населения.

Последнее время, начиная с 1995г., наблюдается рост числа больных, у которых выявляется рак щитовидной железы. При среднем областном показателе 6,9 на 100 тыс. населения есть районы, где катастрофически растет количество больных раком щитовидной железы: г. Кемерово -11,8г. Ленинск-Кузнецкий - 13,8 Беловский район - 14,5 на 100 тыс.

Проблемной локализацией у лиц мужского населения становится рак предстательной железы. За 10 лет заболеваемость увеличилась с 3 на 100 тыс. в 1989г. до 7,6 в 1999г.

Одним из основных параметров, определяющих прогноз онкологического заболевания - это степень распространенности опухолевого процесса на момент диагностики. При некоторых локализациях процент ранней диагностики крайне низкий. В России в 1999 году злокачественные новообразования в I-II стадиях опухолевого процесса диагностированы в 37,9% случаев.

По Кузбассу в I-II стадиях в 1999 году выявлено: рак легких - 33,8%; рак желудка 25,6%; рак толстой кишки - 25,1%. Выявление заболевания в ранних стадиях - это реальная возможность адекватной, радикальной помощи больным.

## **Хромосомные нарушения у работников канцероопасного производства**

*Дружинин В.Г., Минина В.И., Мокрушина Н.В.*

*Кемеровский государственный университет*

Промышленное получение каменноугольного кокса сопряжено с загрязнением окружающей среды рядом химических соединений, многие из которых относятся к мутагенным и канцерогенным факторам [8,9]. В этих условиях у работников коксохимического производства можно ожидать наличие генотоксических эффектов, выходящих за рамки спонтанного мутационного процесса.

Мутагенез на хромосомном уровне принято изучать цитогенетическими методами, предусматривающими анализ частот хромосомных aberrаций (ХА) и сестринских хроматидных обменов (СХО) в лимфоцитах периферической крови [1,2,11]. Считается, что использование этих тестов наиболее приемлемо в методическом отношении для оценки генетической опасности профессиональных вредностей [3].

В данной работе представлены результаты цитогенетического обследования рабочих Кемеровского коксохимического завода, впервые введенного в эксплуатацию еще в 1924г. Это предприятие является одним из основных источников промышленного загрязнения в г. Кемерово, т.к. расположено в непосредственной близости от жилых кварталов [7].

**М а т е р и а л и м е т о д и к и.** Исследование проведено у 34 работников завода (цеха улавливания коксового газа №1 и №2, коксовый цех, специальный цех ремонта котельного оборудования (СЦРКО), ВОХР, мед-сан. часть). В изучаемую группу вошли лица в возрасте от 19 до 60 лет (средний возраст - 39,9 лет) со стажем работы на данном предприятии от 1 до 33 лет (средний стаж - 11,9 лет). В качестве контроля (Контроль I) были изучены цитогенетические показатели у 35 здоровых доноров, жителей г. Кемерово, не контактирующих профессионально с производственными вредностями. Возраст в данной группе варьировал в пределах 16 - 60 лет, составляя в среднем 28,5 лет. Другая контрольная группа (Контроль II) была сформирована из 30 детей-подростков (средний возраст - 15 лет), проживающих в непосредственной близости (1,5 - 2 км) от территории промплощадки коксохимического завода.

Состояние здоровья оценивали устным анкетированием обследуемых в сочетании с анализом индивидуальных медицинских карт. Одновременно учитывали наличие вредных привычек (курение).

Генотоксические эффекты изучали с помощью методов учета хромосомных aberrаций и сестринских хроматидных обменов в лимфоцитах периферической крови. Лимфоциты культивировали в присутствии фитогемагглютинаина по стандартному полумикрометоду в течение 48-ми и 72-х часов. После зашифровки препаратов проводили анализ в среднем 100 клеток (ХА) и 25 клеток (СХО) от каждого обследованного. Учитывали одиночные и парные фрагменты, а также aberrации обменного типа. Пробелы

## Механизмы образования и функции антител при канцерогенезе

Глушков А.Н.

*Кемеровский научный центр СО РАН*

За миллионы лет эволюции живая природа выработала универсальные механизмы защиты от природных низкомолекулярных химических соединений - ксенобиотиков, таких как мутагены, токсины, канцерогены (КГ). С появлением на эволюционной лестнице иммунной системы эти механизмы усложнились, причем такое усложнение не всегда сопровождается повышением эффективности. Иммунологам и онкологам хорошо известен феномен иммунологического усиления опухолевого роста, когда иммунитет не препятствует, а наоборот активно способствует появлению и прогрессии опухолей. Механизмы этого явления сейчас постепенно раскрываются. Однако, роль антител (АТ) - центральных молекул иммунной системы в усилении опухолевого роста остается неясной. Особенно загадочной остается функция АТ к КГ.

Для того, чтобы наглядно представить себе место и роль АТ в химическом канцерогенезе обратимся к следующей схеме (рис.1). На этой схеме обозначены хорошо изученные звенья канцерогенеза: биотрансформация КГ в ферментных системах, образование аддуктов КГ с макромолекулами, мутации в протоонкогенах и синтез белков с измененной структурой, трансформация клетки и нарушение межклеточных взаимодействий и, наконец, автономный опухолевый рост. При этом установлено, что формирование аддуктов КГ с макромолекулами организма и синтез онкобелков с измененной структурой приводит к образованию АТ соответственно к КГ и онкобелкам. Априорно считается, что такие АТ выполняют защитные функции. АТ к КГ препятствуют проникновению КГ в организм, а АТ к онкобелкам осуществляют противоопухолевое цитолитическое действие. Однако, некоторые экспериментальные данные говорят о том, что и те и другие АТ способны стимулировать индукцию и прогрессию опухолей. Возникает закономерный вопрос: каким образом осуществляется такое стимулирующее действие АТ? Кроме того, установлено, что образование аддуктов КГ с ДНК и белком не всегда сопровождается синтезом АТ к КГ. Причина этого явления не известна. И, наконец, не известно, влияют ли АТ к КГ на образование АТ к онкобелкам? Эти вопросы имеют не только сугубо академический интерес, но и важное практическое значение. От их решения во многом зависит создание новых методов ранней иммунодиагностики, профилактики и терапии рака и других заболеваний, вызываемых КГ окружающей среды.

В поисках ответов на поставленные вопросы нами сделано следующее. Совместно с Кемеровским государственным университетом и Новосибирским институтом органической химии СО РАН были синтезированы поливалентные белковые конъюгаты КГ группы ПАУ с заданными свойствами: водорастворимость, хорошая сорбируемость на пластик, стандартное молярное соотношение гаптен-носитель. Совместно с Новосибирским институтом биоорганической химии СО РАН были синтезированы моновалентные конъюгаты ПАУ с радиомеченными олигонуклеотидами. Такой широкий спектр конъюгатов с близкими по химической структуре гаптенами открывает большие перспективы по получению и исследованию АТ с учетом их специфичности, аффинности и изотипической принадлежности.



## Синтез конъюгатов канцероген-макроноситель для получения и анализа антител к канцерогенам

Костянко М.В., Глушков А.Н.

Кемеровский государственный университет

Кемеровский научный центр СО РАН

Любые исследования АТ к КГ или создание анти-КГ вакцин начинается с синтеза конъюгатов интересующего КГ с макроносителем. Мы начали свою работу с КГ группы ПАУ, как самых распространенных и изученных в мире и особо значимых для Кузбасса. Есть все основания полагать, что основные принципы получения и анализа АТ к ПАУ будут применимы и для других групп КГ. Очевидное отсутствие иммуногенных свойств у ПАУ, подразумевает необходимость получения конъюгатов этих соединений с высокомолекулярными носителями для проведения иммунохимических исследований.

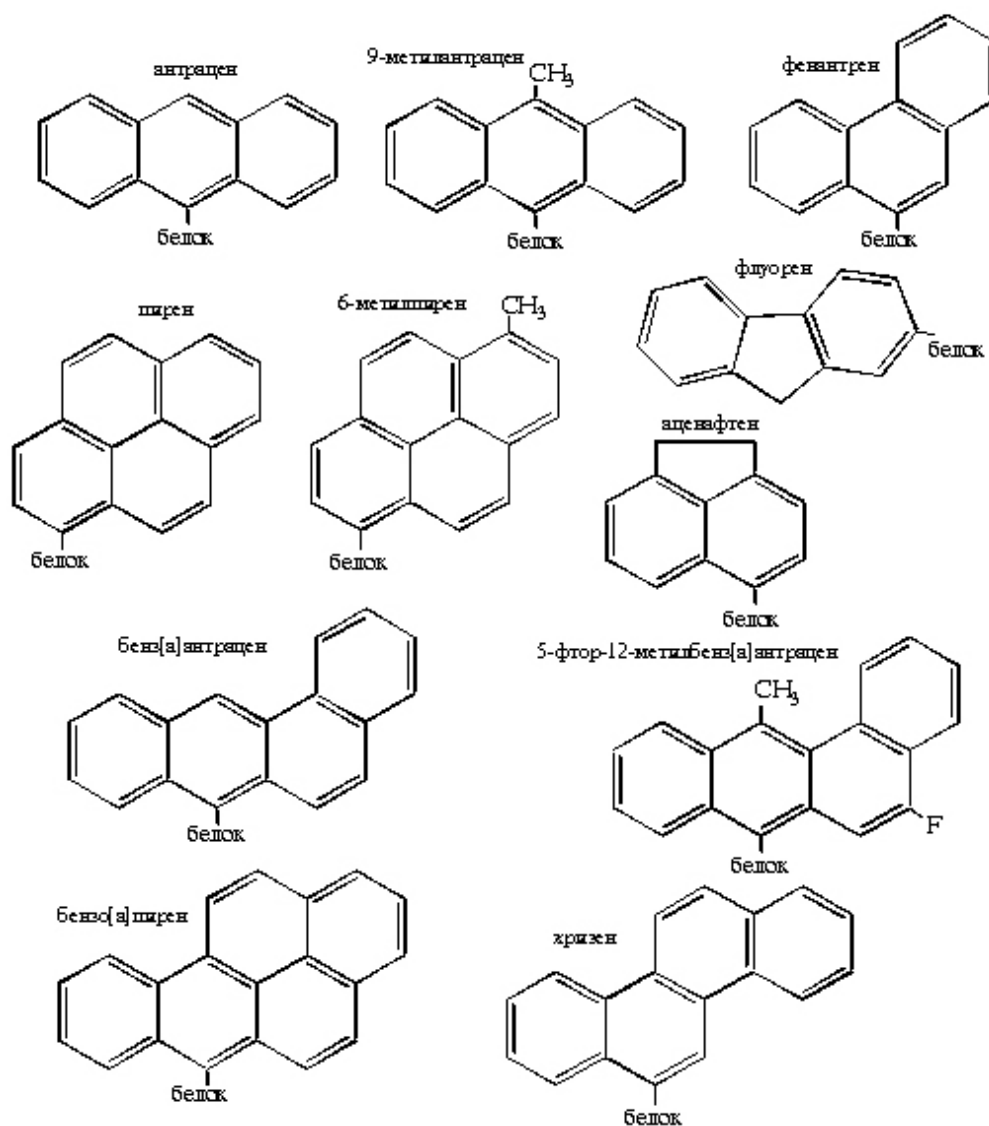


Рис.1. Конъюгаты белков с ПАУ



## Антитела к канцерогенам в эксперименте

Черно С.В.

Кемеровский научный центр СО РАН

Впервые влияние иммунизации канцерогенами на течение последующего опухолевого процесса было рассмотрено Creech H. и Franks W. (1937, 1939). Они использовали конъюгат ДБА-белок и модель ДБА-индуцированного канцерогенеза у мышей. В одной серии экспериментов было отмечено укорочение латентного периода развития опухолей у иммунизированных животных до полутора раз против контрольных. В другой серии опытов было обнаружено снижение частоты развития опухолей в опытной иммунизированной группе по сравнению с контрольной. Уже по результатам этих первых экспериментов можно сделать три важных вывода. Во-первых, иммунизация животного конъюгатом канцероген-носитель может сказаться как положительно, так и отрицательно на развитии последующего опухолевого процесса. Во-вторых, поскольку такая иммунизация может приводить к угнетению канцерогенеза, это свойство можно попытаться использовать для его профилактики. В-третьих, АТ, индуцированные одним КГ, проявили способность к связыванию с другими КГ этой же химической группы.

В дальнейшем зависимость канцерогенеза от иммунизации КГ была неоднократно подтверждена разными группами исследователей.

По данным Peck R., Peck E. (1971), вводивших крысам 2-антриламин после иммунизации конъюгатом 2-антриламина с альбумином сыворотки лошади в соотношении 41/1, у иммунизированных животных пальпируемые опухоли развивались вдвое реже, чем у контрольных. У нескольких крыс по утверждению авторов было даже отмечено регрессирование образовавшихся пальпируемых опухолей, подтвержденное патологоанатомически. В опытной группе наблюдалось также увеличение латентного периода.

Curtis G. et al. (1978) по результатам своих экспериментов с введением БП мышам пришли к выводу, что БП индуцирует образование АТ как при подкожном введении, так и при нанесении на кожу. Приобретение иммуногенности низкомолекулярным КГ по мнению авторов происходит за счет его связывания с белками. Интересно, что у животных с опухолями наблюдались более высокие титры АТ по сравнению с мышами без опухолей. Было отмечено также большее количество опухолей у иммунизированных животных. Иными словами, иммунная реакция на КГ может в некоторых ситуациях не угнетать, а наоборот, стимулировать возникновение опухолей.

Tompa A., Curtis G. et al. (1979) исследовали влияние АТ к БП на цитотоксическую и мутагенную активность БП *in vitro*. В экспериментах наблюдалось значительное угнетение мутагенного и цитотоксического действия БП и его метаболитов в присутствии АТ. Авторы считают, что уровень АТ *in vivo*, являясь достаточным для ежедневного связывания микрограммов поступающих извне КГ, не способен инактивировать большие

## **Антитела к канцерогенам у человека**

*Аносова Т.П., Аносов М.П.*

**Кемеровский научный центр СО РАН**

Антитела к канцерогенам у человека начали изучаться совсем недавно и всего лишь в нескольких лабораториях мира. Ученые, проводящие эти исследования, придерживаются подчас разных точек зрения на роль АТ в канцерогенезе, ставят перед собой разные цели и, может быть, поэтому получают противоречивые результаты. Обобщение всего имеющегося материала позволяет уже сейчас составить определенные представления об иммунном ответе на КГ у человека в естественных условиях. Нативные КГ, попадая в организм человека, модифицируются в диолэпоксидные производные, которые связываются с ДНК, и уже на эти аддукты в организме человека образуются АТ. Следует, однако, отметить одно немаловажное обстоятельство. У здоровых лиц пока изучаются АТ к аддуктам метаболитов КГ с ДНК, а у больных злокачественными опухолями - АТ к КГ.

Наибольший вклад в изучение АТ к аддуктам КГ с ДНК внесли Harris С.С. и его сотрудники. Именно они впервые разработали метод иммуноферментного анализа АТ человека к аддуктам метаболитов КГ с ДНК. В 1985г. Harris С.С. с сотр. обследовали 41 рабочего коксохимического производства с длительной и выраженной экспозицией к полициклическим ароматическим углеводородам (ПАУ). Контролем служили некурящие лабораторные служащие. У четверти обследованных были обнаружены АТ к аддуктам бенз(а)пирен-диолэпоксид-ДНК (БПДЭ-ДНК). Не было выявлено никакой корреляции между наличием или отсутствием аддуктов и наличием или отсутствием, а также титром АТ. Во всех случаях АТ принадлежали к классу IgG и только в 2-х из них дополнительно выявили АТ класса М. Не было установлено связи между наличием АТ и курением. В контрольной группе АТ обнаружены не были. Ни в этой работе, ни в последующих не удалось выявить АТ к аддуктам ПАУ ДЭ-белок. Кроме того, нативные ПАУ в растворе не конкурировали с иммобилизованной модифицированной ДНК за связывание с АТ. Это явилось свидетельством взаимодействия АТ с новым эпитопом на ДНК, но не с самим БПДЭ. Параллельно выполненные исследования показали, что некоторые образцы человеческой сыворотки и сыворотки кролика, иммунизированного БПДЭ-ДНК, перекрестно реагируют с аддуктом хризен-диолэпоксид-ДНК (ХДЭ-ДНК). Это свидетельствовало о конформационном подобии новых детерминант на ДНК, образованных диол-эпоксидами разных ПАУ. Авторы пришли к выводу, что анализ аддуктов БПДЭ-ДНК и АТ к ним могут служить маркерами экспозиции к ПАУ, но появление АТ в большей мере зависит от индивидуальных особенностей адсорбции, транспорта и метаболизма ПАУ и активности репарации ДНК. Почему при наличии аддуктов не всегда образуются АТ, и что служит индуктором синтеза АТ в отсутствии аддуктов - эти вопросы тоже не были изучены.

В следующих работах 1987-88г.г. Weston A., Newman M.J. с сотр. обследовали около 100 человек, профессионально не контактирующих с ПАУ.

## **Системный подход в исследовании генетических основ иммунопатологии раннего возраста**

*Шабалдин А.В., Штейн М.А., Логинова Л.А.*

**Кемеровский научный центр СО РАН**

В этиологии и патогенезе неинфекционных заболеваний велика роль генетических факторов. Иммунопатология - наиболее яркий пример. На рис.1 показаны основные клинические группы иммунопатологии.

### **1. ИММУНОДЕФИЦИТНЫЕ СОСТОЯНИЯ (ВТОРИЧНЫЕ, РЕДКО ПЕРВИЧНЫЕ). ОСНОВНЫЕ СИНДРОМЫ:**

**- ИНФЕКЦИОННЫЙ,**

**- ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ,**

**- ОНКОЛОГИЯ,**

**- НАРУШЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ У ЖЕНЩИНЫ (ПРИВЫЧНОЕ НЕВЫНАШИВАНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ, ВРОЖДЕННЫЕ ПОРОКИ РАЗВИТИЯ ПЛОДА, ЗАМЕРШИЕ БЕРЕМЕННОСТИ, ПУЗЫРНЫЕ ЗАНОСЫ).**

### **2. АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

### **3. АУТОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

### **4. ИЗОИММУННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ НОВОРОЖДЕННЫХ, КАК ПРОЯВЛЕНИЕ ИЗОИММУННОЙ ПАТОЛОГИИ РАННЕГО ОНТОГЕНЕЗА.**

### **5. ИММУНОПАРЕЗЫ:**

**- ОТСУТСТВИЕ СЕРОКОНВЕРСИИ НА ВВОДИМЫЙ ИЛИ ЭКЗОГЕННЫЙ АНТИГЕН,**

**- ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ**

**Рис.1. Основные клинические группы иммунопатологии**

Это иммунодефицитные состояния, аллергические заболевания, ауто- и изо- иммунные заболевания, а также иммунопарезы. В раннем онтогенезе (пренатальный и ранний постнатальный период) манифестируют прежде всего **иммунодефицитные состояния**, которые в период беременности проявляются привычным невынашиванием беременности, врожденными пороками развития, бесплодием, пузырными заносами. После рождения - это рецидивирующие пре- и постнатальные инфекции. **Аллергические заболевания** дебютируют в период раннего детства и проявляются прежде всего аллергией на белки коровьего молока. Примером **изоиммунной патологии раннего онтогенеза** является гемолитическая болезнь новорожденных, возникающая при иммунном конфликте между матерью и плодом по групповым антигенам. Характерным

Отпечатано редакционно-издательским отделом  
Кемеровской государственной медицинской академии

650029, Кемерово,  
ул. Ворошилова, 22а.  
Тел./факс. +7(3842)734856;  
**epd@ksma.kuzstu.ac.ru**



Подписано в печать 18.04.2001.  
Гарнитура таймс. Тираж 100 экз.  
Усл. печ. листов 2,67.

Технические редакторы: С.В. Черно, О.В. Богданова  
Лицензия ЛР №21244 от 22.09.97