

Введение. Целью многих исследований является регистрация интересующих клеточных белков. Многие годы эту задачу с успехом позволяет реализовать метод проточной цитофлуориметрии. Вместе с тем проточная цитометрия дает возможность детектировать антигены либо на наружной поверхности клетки, либо внутри нее после пермеабилзации. Однако даже регистрация соответствующего протеина внутри клетки не позволяет судить о его распределении по клеточным компартментам. Для решения вопроса о точной внутриклеточной локализации белка применяют вестерн-блоттинг и иммуноцитохимическое исследование, но данные методики являются полуколичественными и трудно сопоставимы с результатами проточной цитометрии. Поэтому возникает необходимость расширить возможности проточной цитометрии, а именно — разделить сигналы от различных компартментов клетки. Такая возможность даст экспериментаторам более тонкий инструмент оценки клеточной реакции на то или иное воздействие.

Цель исследования — оценка количественного содержания рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1-го типа (VEGFR1) в интактных ядрах методом непрямой реакции иммунофлуоресценции с помощью проточной цитофлуориметрии.

Материалы и методы. Изучали белок VEGFR1. Контрольной для данного протеина была выбрана клеточная линия эпидермоидной карциномы человека A431. В целях идентификации VEGFR1 использовали следующие первичные и вторичные антитела: мышинные анти-VEGFR1 #MAB321 (R&D Systems) и козы антимышинные поликлональные IgG: FITC #STAR70 (AbD Serotec). Для контроля отсутствия цитозольной примеси в ядерном экстракте в качестве первичных применяли кроличьи антитела к β -актину #4970L (Cell Signaling Technology), а вторичных — козы антикроличьи IgG: Alexa Fluor 488 #A-11008 (Invitrogen). Интактность ядер оценивали, анализируя мазки из полученной суспензии, окрашенные азуром и гематоксилином по Майеру.

Результаты. Полученные данные подтвердили, что разработанный нами метод экстракции, очистки и стабилизации ядер подходит для их исследования на проточном цитофлуориметре. Антигены VEGFR1, расположенные на наружной ядерной мембране, оказались доступными для связывания со специфическими антителами (4,9 %). После пермеабилзации кариолеммы метанолом VEGFR1 регистрировался и внутри ядра (18,4 %). В обоих случаях доля ядер, неспецифически связавшихся с вторичными антителами, не превышала 0,1 %. Чистота ядерной фракции по критерию отсутствия цитоплазматического белка β -актина составляла более 99 %. Эти данные были подтверждены результатами микроскопического исследования окрашенных препаратов. При точном соблюдении условий результаты ряда независимых экспериментов хорошо воспроизводились.

Заключение. Разработанный нами метод экстракции, очистки и стабилизации ядер пригоден для идентификации ядерных белков на проточном цитофлуориметре.

Б.С. Федоров, М.А. Фадеев, А.Б. Еремеев, Н.П. Коновалова, С.А. Гончарова, Т.А. Раевская, Д.В. Мищенко
ГИБРИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В КАЧЕСТВЕ ХЕМОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В КОМБИНИРОВАННОЙ ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
ФГБУН ИПХФ РАН, Черноголовка, Московская область

Введение. Особый интерес представляют попытки снижения побочных эффектов противоопухолевых химиопрепаратов посредством использования в комбинированной химиотерапии малотоксичных хемосенсибилизаторов. Однако выявление таких хемосенсибилизаторов носит случайный характер и не поддается систематизации и выявлению классов веществ с такими свойствами. В этой связи поиск новых низкотоксичных противоопухолевых или адьювантных средств, которые бы могли резко понизить терапевтические дозы цитостатиков с сохранением терапевтических характеристик, является важнейшей задачей проводимых исследований в области онкологии.

Цель исследования — осуществить синтез, изучить противоопухолевое действие и возможность использования оксиамидов дикарбоновых кислот в качестве адьювантных средств (или хемосенсибилизаторов) в комбинированной цитостатической терапии раковых опухолей в сочетании с цитостатиками.

Материалы и методы. Работа выполнена на мышах-самцах линии BDF₁ массой тела 22–24 г. Содержание животных и эксперименты осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием лабораторных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). В качестве критериев эффективности были использованы количество выживших животных по истечении 60 сут наблюдения после начала терапии, средняя продолжительность жизни (СПЖ) и увеличение СПЖ. Степень ингибирования роста опухоли определяли по торможению ее роста. Рассчитывали также индекс ингибирования метастазов, который позволяет оценить степень метастатического поражения.

Результаты. Использование в комбинированной цитостатической терапии гидроксидов щавелевой, винной и малеиновой кислот в сочетании с цисплатином или циклофосфамидом обеспечивают 100 % выживаемость лейкозных животных, а также полное ингибирование процессов метастазирования при экспериментальных меланоме В16 и карциноме легких Льюис. Следовательно, можно предположить, что нами получены таргетные препараты, которые способны дезактивировать гистондеацетилазу — фермент, участвующий в синтезе ДНК опухолевых клеток. В продолжение этих работ нами синтезированы гибридные соединения на основе дикарбоновых кислот и аминокислот, некоторые из них обеспечивают 50 % выживаемость животных, увеличение СПЖ оставшихся животных составляет 200 %.

Заключение. Таким образом, поиск новых биогенных хемосенсибилизаторов (таргетных препаратов) является многообещающей стратегией в экспериментальной химиотерапии злокачественных новообразований.