

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИГЕНСЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ВВЕДЕНИИ РАДИОАКТИВНО МЕЧЕННЫХ СУБСТРАТОВ К HSV1-ТК, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ НЕИНВАЗИВНОМ СКАНИРОВАНИИ

*НОСОВ М. А.^{1,2,4}, ANTON M.³, WEBER W.³, БАРАБАНОВА С. В.¹, WEKERLE H.²,
академик РАМН КОРНЕВА Е. А.¹, FLUEGEL A.²*

*¹ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург,*

*²Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried,
Germany,*

*³Universitätsklinik Freiburg,
Germany,*

*⁴Institute for Regenerative Medicine, Galway,
Ireland*

Носов М. А., Anton M., Weber W., Барабанова С. В., Wekerle H., Корнева Е. А., Fluegel A. Функциональная активность антигенсенсibilизированных лимфоцитов при введении радиоактивно меченных субстратов к HSV1-ТК, применяемых при неинвазивном сканировании // Мед. академ. журн. 2010. Т. 10. № 1. С. 24–30. ГУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН» Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, 12; Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried, 82152, Germany; Universitätsklinik Freiburg, Germany; Institute for Regenerative Medicine, Galway, Ireland.

Используя способность клеток, экспрессирующих ген тимидинкиназы вируса простого герпеса первого типа (HSV1-tk), специфически накапливать радиоактивно меченные аналоги ганцикловира (ГЦВ), исследована возможность неинвазивного отслеживания энцефалитогенных Т-клеток на преклинических этапах развития экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) и влияние накопления радиоактивных субстратов на функциональную активность Т-клеток. Несмотря на то, что гамма-камера оказалась недостаточно чувствительной для визуализации незначительных скоплений энцефалитогенных лимфоцитов, было продемонстрировано, что селезенка является основным органом аккумуляции Т-лимфоцитов на ранних стадиях развития ЭАЭ. Кроме того, обнаружен токсический эффект радиоактивно меченных аналогов ГЦВ по отношению к антигенсенсibilизированным Т-лимфоцитам, который выразился в ингибировании их пролиферации *in vitro* и, как следствие, в потере функциональной активности *in vivo*. Таким образом, результаты исследования демонстрируют, что неинвазивная визуализация клеток с применением радиоактивных субстратов, широко используемая в клинике и эксперименте, может приводить к ослаблению функциональной активности этих клеток и, соответственно, к снижению эффективности применяемой терапии или неправильной интерпретации полученных данных.

Ключевые слова: центральная нервная система, иммунная система, антигенсенсibilизированные лимфоциты, неинвазивное сканирование.

Nosov M. A., Anton M., Weber W., Barabanova S. V., Wekerle H., Korneva E. A., Fluegel A. The toxic effect of radioactive substrate of HSV1-TK on antigen specific T cells during noninvasive imaging // Med. Acad. Journ. 2010. Vol. 10. № 1. P. 24–30. Research Institute of Experimental Medicine of the RAMS, St. Petersburg, 197376; Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried, 82152, Germany; Universitätsklinik Freiburg, Germany; Institute for Regenerative Medicine, Galway, Ireland.

Using the ability of genetically modified herpes simplex virus thymidine kinase expressing cells to specifically accumulate radioactively labeled analogs of gancyclovir, we analyzed the distribution of encephalitogenic T cells during prodromal phase of transfer EAE and toxic effect of this accumulation on functional activity of T cells *in vitro* and *in vivo*. Though gamma scanning was not sensitive enough for detection of encephalitogenic T cells in organs with low concentration of them we confirmed that spleen is one of the most important organs for T cells during EAE development. Moreover, we have found a toxic effect of radioactively labeled analogs of GCV on effector T cells leading to inhibition of proliferation *in vitro* and significant attenuation of EAE symptoms *in vivo*. Thus, widely clinically and experimentally applying methods of noninvasive *in vivo* imaging of adaptive transferred T cells with application of radioactive substrate, as we have shown, can lead to attenuation of functional activity of these cells and accordingly to an inefficiency of therapy or wrong interpretation of the obtained data.

Key words: Central nervous system, immune system, antigen specific lymphocytes, noninvasive imaging.

Для корреспонденции: Носов М. А. 8-10-353-863286314; e-mail: mikhail.nosov@googlemail.com

ВВЕДЕНИЕ

Впервые система ген-зависимого клеточного самоубийства, основанная на экспрессии гена тимидинкиназы вируса простого герпеса первого типа (HSV1-tk) в комбинации с ганцикловиром (ГЦВ), была применена для удаления клеток, экспрессирующих HSV1-tk, более 20 лет назад [1]. В отличие от внутриклеточной тимидинкиназы, HSV1-tk способна трансформировать нетоксичный синтетический аналог тимидина (ганцикловир) в ГЦВ-монофосфат, фосфорилируемый клеточными киназами до токсичного ГЦВ-трифосфата. ГЦВ-трифосфат ошибочно распознается ДНК-зависимой ДНК-полимеразой как деоксигуанидин-трифосфат и встраивается во вновь синтезирующуюся цепь ДНК, что приводит к сбою в репликации с последующей клеточной гибелью, и делает систему клеточного самоубийства на основе HSV1-tk/ГЦВ пригодной для специфического удаления клеток, экспрессирующих HSV1-tk *in vivo* [2, 3]. Низкая токсичность субстрата HSV1-tk для организма и высокая избирательность легли в основу создания стратегии генной фермент-продраг опосредованной терапии рака (ГФПТ), включающей методы генной терапии для доставки активности HSV1-tk в опухолевые клетки и провокацию самоубийства последних системным введением ГЦВ [3].

Наряду с ГФПТ, система клеточного самоубийства на основе HSV1-tk/ГЦВ применяется в клинической клеточной терапии для удаления введенных клеток в случае возникновения нежелательных эффектов. Так, экспрессия HSV1-tk в аллогенных гематопоэтических клеточных трансплантатах, применяемых при терапии рака, лейкемии в частности, позволяет оперативно удалять из организма аллогенные клетки в случае возникновения реакции типа «трансплантат против хозяина» (GVHD) [4, 5, 6, 7]. В последнее время регуляторные Т-клетки широко используются для индукции толерантности к аллогенным трансплантатам и контроля за развитием аутоиммунных заболеваний. Потенциальный риск общей иммуносупрессии или массивной пролиферации минорной фракции аутореактивных Т-клеток при клеточной терапии с использованием регуляторных клеток и в этом случае может эффективно контролироваться с помощью системы HSV1-tk/ГЦВ [8, 9].

С другой стороны, способность клеток, экспрессирующих HSV1-tk, специфически аккумулировать радиоактивно меченные аналоги ГЦВ, позволяет отслеживать их локализацию и миграцию *in vivo* с помощью гамма-камеры или позитрон-эмиссионной томографии (ПЭТ) [10, 11, 12, 13]. В работах Zanzone и Koehne экспрессия HSV1-tk в лимфоцитах, сенсibilизированных к антигенам Эпштейн-Бар-ассоциированной лимфомы, применялась для выявления их локализации при клеточной терапии с исполь-

зованием введения радиоактивно меченных аналогов тимидина-2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabinofuransyl-5-iodo-uracil (FIAU)-[¹³¹I]FIAU и [¹²⁴I]FIAU с последующей детекцией гамма-камерой или ПЭТ [14, 15]. Специфическое накопление радиоактивных субстратов лимфоцитами, продуцирующими HSV1-tk, не вело к снижению иммунной цитотоксичности по отношению к клеткам лимфомы, вызванной вирусом Эпштейн-Бара, т. е. не влияло на функциональную активность Т-клеток. С другой стороны, полученные нами при изучении поведения и локализации антигенсенсibilизированных клеток результаты подтверждают существование токсического действия радиоактивно меченных аналогов ГЦВ на HSV1-tk, продуцирующих Т-лимфоциты. В данной работе мы сравнили две системы визуализации Т-клеток *in vivo* при помощи гамма-камеры, основанные на экспрессии HSV1-tk или гена, кодирующего белок – переносчик норепинефрина/норадреналина (hNET) [16]. Кроме того, удалось обнаружить дозозависимое токсическое действие радиоактивно меченного аналога ГЦВ – [¹²³I]FIAU на лимфоциты, экспрессирующие HSV1-tk *in vitro*, и значительную потерю функциональной активности Т-клеток *in vivo*. Полученные результаты представляют определенный интерес, поскольку радиоактивно меченные субстраты к HSV1-tk широко используются в экспериментах и клинике для неинвазивного контроля за вводимыми лимфоцитами при клеточной терапии, что, как мы показали, может приводить как к ослаблению, так и к изменению функциональной активности этих клеток и соответственно к снижению эффективности терапии или к риску развития побочных эффектов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Антигенсенсibilизированные лимфоциты, их генетическая модификация и индукция ЭАЭ. Методы получения антигенсенсibilизированных лимфоцитов и их генетическая модификация описаны в работе А. Fluegel [17]. Для трансдукции лимфоцитов были использованы вектора, созданные на основе ретровируса мышиных стволовых клеток pMSCVneo (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), экспрессирующих GFP, GFP-IRES-TK или GFP-IRES-NAT под LTR-промотером. ЭАЭ был индуцирован внутривенным введением активированных лимфоцитов (5×10^6 на крысу), после чего животных ежедневно осматривали для своевременного выявления клинических симптомов и взвешивали. Клинические симптомы определяли в соответствии со следующей шкалой: 0,5 – ослабление тонуса хвоста, 1 – паралич хвоста, 2 – нарушение походки, 3 – паралич задних конечностей, 4 – тетрапарез, 5 – смерть.

Крысы инбредной линии Lewis были получены из вивария Института биохимии им. Макса Планка

(Мартинсрид, Германия). Животные содержались в стандартных условиях: при постоянной температуре окружающей среды (+22 °C), 12-часовом световом дне и свободном доступе к воде и пище.

Обработка лимфоцитов ганцикловиром и радиоактивными субстратами in vitro. Использовали ГЦВ производства Рош (Roche, Манхейм, Германия), коммерческое название Цимовен (Cymoven®). Для обработки *in vitro* использовали ГЦВ в концентрации 1 мкг/мл. Радиоактивно меченные субстраты [¹²³I]FIAU, 9-[4-fluoro-3-(hydroxymethyl)butyl]guanine-[¹⁸F]FHBG и metajodobenzylguanidin-[¹²³I]MIBG были получены из Института радиационной медицины Изар Клиники (Мюнхен, Германия). Клетки инкубировали в течение 1 ч при +37 °C и 5% CO₂ в присутствии 0.25, 2.5, 12.5 или 25 μCi субстрата, отмывали и рестимулировали через 24 ч. Аккумулированную клетками радиоактивность определяли как процент от добавленной в культуру.

Анализ функциональной активности лимфоцитов. Функциональную активность лимфоцитов определяли по степени активации клеток в ответ на присутствие антигена. Для этого клетки инкубировали с 10 мкг/мл MBP и 10⁷/мл облученных тимоцитов в течение 2 дней. Степень активации оценивали по уровню пролиферации путем подсчета клеток на FACS-Calibur (Becton Dickinson, Хайдельберг, Германия) или по включению [³H]-тимидина.

Гамма-камера. На 1-й или 3-й день после введения энцефалитогенных лимфоцитов животные получали внутривенно по 250 μCi [¹²³I]FIAU или [¹²³I]MIBG. Через 2 или 20 ч животных наркотизировали, используя внутримышечное введение смеси Фентанил : Домитор : Дормикум (Fentanyl : Domitor : Dormicum – 0.06 мг/кг : 0.2 мг/кг : 2.5 мг/кг веса), и сканировали на гамма-камере (Сименс, Германия). После сканирования крысам вводили внутрибрюшинно смесь Антиседан : Аноксат : Нарканти (Antisedan : Anoxat : Narcanti – 0.8 мг/кг : 0.25 мг/кг : 0.15 мг/кг). Все животные после введения радиоактивного субстрата содержались в специальном виварии Института радиационной медицины (Мюнхен, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

T-лимфоциты, сенсibilизированные к основному белку миелина. В данной работе были использованы CD4⁺ T-лимфоциты, сенсibilизированные к основному белку миелина (MBP) и экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (GFP) (T_{MBP-GFP}), GFP с тимидинкиназой вируса простого герпеса (T_{MBP-GFP} TK) и GFP с белком – переносчиком норепенефрина/норадреналина (T_{MBP-GFP} hNAT). Гены были доставлены в T-лимфоциты с помощью рекомбинантных ретровирусов, кодирующих GFP под LTR-промотером и

GFP-TK или GFP-NAT в бидистронной кассете под тем же промотером. Селекцию клеток по антигенной специфичности осуществляли путем нескольких последовательных стимуляций антигеном в присутствии антигенпрезентирующих клеток с циклическостью в 7 дней [17]. Для обозначения пролиферирующих лимфоцитов на 2-й день после стимуляции и не активированных, слабо пролиферирующих на 5–6-й день после рестимуляции мы соответственно используем термины «активированные» и «ожидающие» клетки. Функциональная активность HSV1-tk в T-клетках подтверждена в эксперименте по индукции клеточной гибели ганцикловиром *in vitro*. Обработка ГЦВ-ом не является токсичной для T_{MBP-GFP}, но ведет к гибели 80% T_{MBP-GFP} ТК-клеток уже через 24 ч после начала обработки (рис. 1А).

Специфическое накопление радиоактивного субстрата T-клетками, экспрессирующими HSV1-tk. Показано, что по сравнению с клетками, не экспрессирующими HSV1-tk, T_{MBP-GFP} ТК аккумулируют в 12 раз больше [¹²³I]FIAU, но не [¹⁸F]FHBG (рис. 1Б). Причем активно пролиферирующие, «активированные», клетки накапливают субстрат в большем объеме по сравнению с «ожидающими», медленно делящимися. [¹²³I]FIAU аккумулируется T-клетками в зависимости от его количества в инкубационной среде (рис. 1В). Кроме того, клетки, экспрессирующие HSV1-tk, способны сохранять связанный субстрат, а соответственно и радиоактивность более 24 ч. Данные нормализованы к уровню пролиферации клеток, определенному по связыванию [³H]тимидина (рис. 1Г).

Специфическое накопление радиоактивного субстрата ведет к повреждению функций T-клеток in vitro. Для определения влияния радиоактивного субстрата на способность клеток активироваться инкубировали T_{MBP-GFP} и T_{MBP-GFP} ТК с 25 μCi [¹²³I]FIAU или [¹⁸F]FHBG в течение 1 ч с последующей стимуляцией специфическим антигеном. Степень активации определяли по уровню пролиферации клеток на 2-й день после стимуляции. Так, T_{MBP-GFP} ТК после инкубации с [¹²³I]FIAU не отвечали пролиферацией на действие специфического антигена, в отличие от контрольных клеток, не экспрессирующих HSV1-tk. Применение [¹⁸F]FHBG не оказало ингибирующего эффекта на интенсивность активации T-клеток в ответ на введение специфического антигена в культуру, что соответствует результатам исследований аккумуляции [¹⁸F]FHBG и подтверждает, что повреждения клеток возникают только при специфическом накоплении радиоактивного субстрата (рис. 2А). Следует подчеркнуть, что ингибирование пролиферации T_{MBP-GFP} ТК радиоактивным субстратом [¹²³I]FIAU носит дозозависимый характер и обнаруживается при минимальной интенсивности в 0.25 μCi (рис. 2Б).

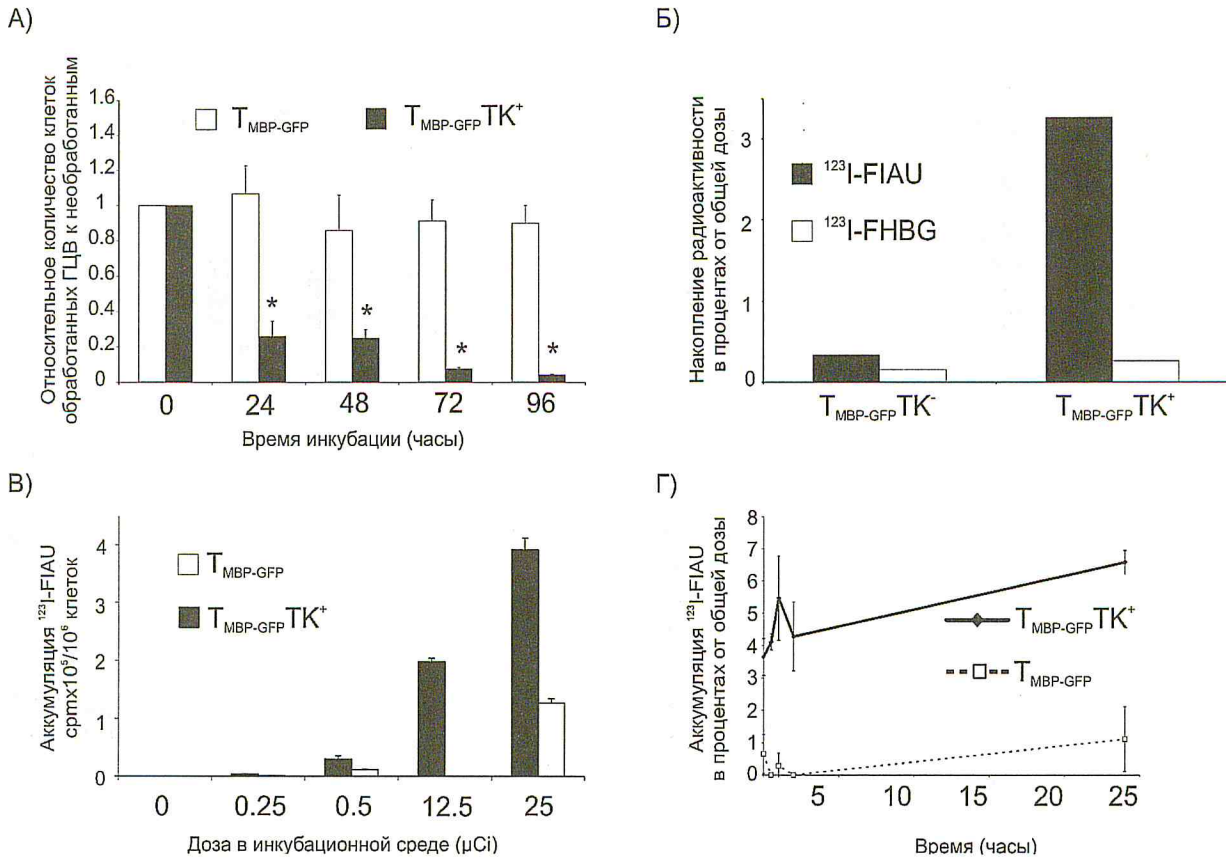


Рис. 1. Специфические свойства энцефалитогенных Т-лимфоцитов, экспрессирующих HSV1-tk:

А – отношение количества $T_{MBP-GFP}$ или $T_{MBP-GFP} TK^+$ -клеток в отсутствии ГЦВ к количеству клеток, обработанных ГЦВ (1 мкг/мл), при разных сроках инкубации; Б – специфическое накопление $[^{123}I]FIAU$ или $[^{123}I]FHBG$ $T_{MBP-GFP} TK^+$ -клетками за 1 ч при 37 °С, выраженное в процентах дозы радиоактивности, аккумулированной клетками, к дозе, добавленной в инкубационную среду; В – накопление $T_{MBP-GFP} TK^+$ -клетками радиоактивного субстрата в зависимости от его количества в инкубационной среде (в српх $10^5/10^6$ клеток); Г – динамика сохранения $T_{MBP-GFP} TK^+$ -клетками радиоактивного субстрата $[^{123}I]FIAU$, аккумулированного за 1 ч при 37 °С, в процентах к его количеству, добавленному в инкубационную среду (* $p \leq 0.05$)

Ингибирование пролиферации Т-клеток возникает в ответ на аккумулированную радиоактивность, а не на присутствие химической составляющей, поскольку количество используемого в реакции FIAU в несколько раз меньше эффективной концентрации и не может привести к индукции самоубийства, которое наблюдается в системе HSV1-TK/ГЦВ.

Повреждающий эффект in vivo. Используемые в работе активированные MBP-сенсibilизированные лимфоциты обладают энцефалитогенной активностью и при введении вызывают воспаление в ЦНС с выраженными клиническими симптомами – параличами конечностей (на модели ЭАЭ, вызываемого адаптивным переносом сенсibilизированных Т-клеток). Клинические симптомы ЭАЭ наблюдаются с 3–4-го дня после введения активированных T_{MBP} -клеток и выражаются вначале в нарушении двигательной активности, затем в параличе хвоста, задних и передних конечностей. Клинические симптомы сопровождаются потерей веса, что является дополнительной характеристикой этого заболевания. Удаление энцефалитогенных $T_{MBP-GFP} TK^+$ -лимфоци-

тов, вызвавших ЭАЭ, трехкратным введением ГЦВ (ежедневно, внутривенно с момента инъекции клеток, 20 мг/кг веса) снижало тяжесть заболевания, но не предотвращало его полностью (рис. 2Д). Наряду с этим, однократного введения $[^{123}I]FIAU$ с активностью 250 μCi через день после введения $T_{MBP-GFP} TK^+$ было достаточно для существенного снижения клинических симптомов (рис. 2Г). Таким образом, радиоактивный субстрат оказался эффективнее ганцикловира *in vivo*, даже при низкой концентрации его химической составляющей. $[^{123}I]FIAU$, как и ГЦВ, не оказывали влияния на тяжесть протекания ЭАЭ, вызванного введением Т-клеток, не экспрессирующих HSV1-TK (рис. 2А, В).

Отслеживание энцефалитогенных клеток in vivo. Проведено сравнение эффективности применения двух систем, основанных на анализе способности клеток, экспрессирующих HSV1-tk или hNET, специфически аккумулировать радиоактивно меченные субстраты $[^{123}I]FIAU$ или $[^{123}I]MIBG$ соответственно, для выявления локализации энцефалитогенных лимфоцитов *in vivo* при развитии ЭАЭ. Для устранения

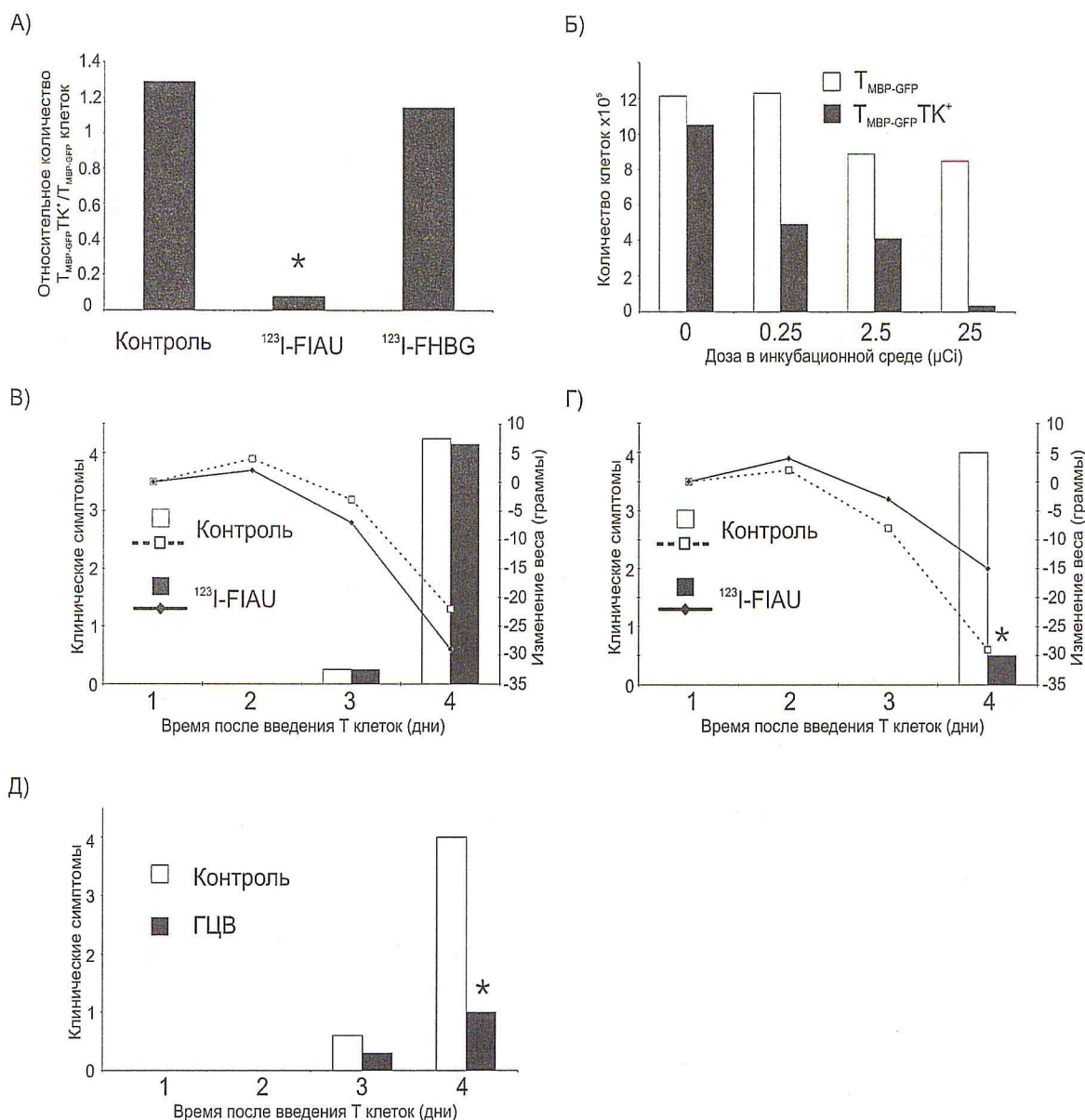


Рис. 2. Действие накопленного клетками радиоактивного субстрата на их функциональную активность in vitro и in vivo: А – блокирование пролиферации $T_{MBP-GFP} TK^+$ -клеток специфическим субстратом тимидинкиназы in vitro. По оси абсцисс – отношение количества $T_{MBP-GFP} TK^+$ к $T_{MBP-GFP}$ ТК-клеток, инкубированных 1 ч в присутствии [^{123}I]FIAU или [^{123}I]MIBG на 2-й день после стимуляции специфическим антигеном; Б – дозозависимое изменение количества $T_{MBP-GFP}$ или $T_{MBP-GFP} TK^+$ ТК-клеток, инкубированных в отсутствие [^{123}I]FIAU или с 0,25; 2,5 или 25 μCi [^{123}I]FIAU; В – клинические симптомы развития ЭАЭ (показаны столбцами) и динамика изменения веса животных (показана линиями), вызванные адоптивным переносом $T_{MBP-GFP}$ ТК при введении физиологического раствора или [^{123}I]FIAU (250 μCi); Г – ослабление клинических симптомов ЭАЭ при ежедневном введении ГЦВ (20 мг/кг). Контроль – введение физиологического раствора. (* $p < 0.01$ по сравнению с контрольной группой)

неспецифического накопления йода (^{123}I) щитовидной железой животные получали перорально и с питьевой водой раствор перхлората натрия (Irenat Torfen). [^{123}I]FIAU с активностью 250 μCi вводили внутривенно через 1 (рис. 3А) или 3 дня (рис. 3Б) после инъекции $T_{MBP-GFP}$ и $T_{MBP-GFP} TK^+$ ТК. Сканирование анестезированных животных проводили в гамма-камере (Siemens) спустя 2 ч после введения радиоактивного субстрата. Обнаружено массовое скопление $T_{MBP-GFP} TK^+$ ТК в селезенке (показаны стрелкой) крыс че-

рез 1 и 3 дня после введения [^{123}I]FIAU (рис. 3Б). У животных, получивших инъекцию $T_{MBP-GFP}$, показано статистическое распределение радиоактивности в организме с неспецифическими очагами в щитовидной железе и мочевом пузыре (показаны линиями). Была оценена и чувствительность метода неинвазивного изучения распределения клеток, основанного на средстве белка – переносчика норепенефрина/норадреналина (hNET) к субстрату [^{123}I]MIBG. В данном случае крысы получали внутривенно инъекцию

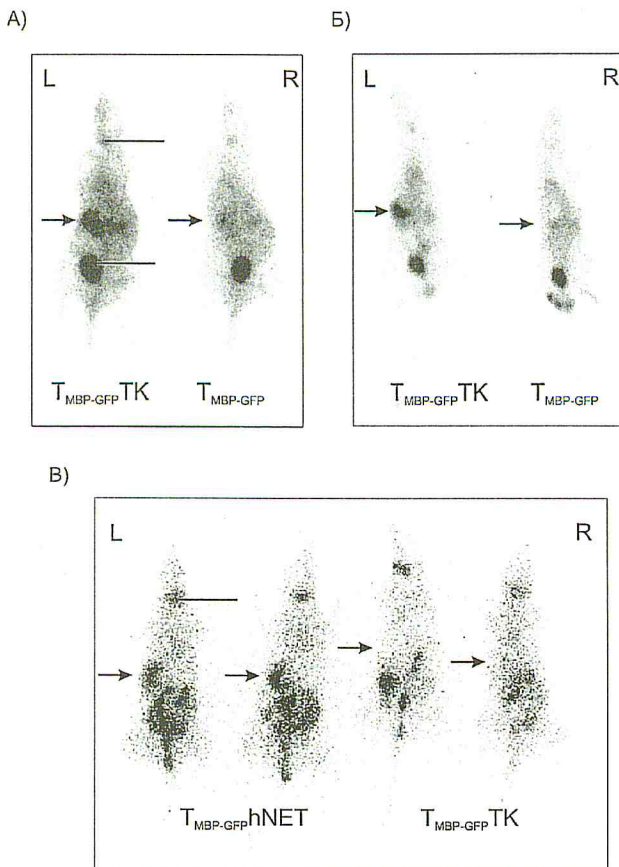


Рис. 3. А, Б. – результаты гамма-сканирования животных спустя 2 ч после введения $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$ (250 μCi), осуществленного через 1 (А) или 3 (Б) дня после адоптивного переноса $\text{T}_{\text{MBP-GFP}}$ или $\text{T}_{\text{MBP-GFP TK}}$; В – результаты гамма-сканирования животных спустя 2 ч после введения $[^{123}\text{I}]\text{MIBG}$ (250 μCi), осуществленного на 3-й день после адоптивного переноса $\text{T}_{\text{MBP-GFP hNET}}$ или $\text{T}_{\text{MBP-GFP TK}}$. Стрелками показана область локализации селезенки, линиями – мочевого пузыря и щитовидной железы

250 μCi $[^{123}\text{I}]\text{MIBG}$ на 3-й день после введения $\text{T}_{\text{MBP-GFP NAT}}$. Сканирование в гамма-камере, проведенное через 2 ч после введения радиоактивного трейсера, не выявило специфической локализации Т-клеток, в то время как сканирование, проведенное через 20 ч, позволило обнаружить аккумулированную клетками радиоактивность в селезенке, как и при использовании $\text{T}_{\text{MBP-GFP TK}}$ (рис. 3В). Негативным контролем в данном случае послужило введение Т-клеток, экспрессирующих HSV1-tk и соответственно не способных аккумулировать $[^{123}\text{I}]\text{MIBG}$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, проанализировано действие радиоактивно меченных субстратов на антигенсенситивизированные Т-лимфоциты при неинвазивном определении их локализации. $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$ имеет большее сродство к HSV1-tk, чем $[^{18}\text{F}]\text{FHBG}$, который,

в свою очередь, является необходимым субстратом для мутированной тимидинкиназы HSV1-sr39tk [18, 19]. В соответствии с этим, используемые нами лимфоциты накапливали преимущественно $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$, поскольку экспрессировали HSV1-tk дикого типа, и именно $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$ имел выраженное супрессивное влияние на интенсивность процесса пролиферации лимфоцитов в ответ на присутствие антигена (рис. 1Б и 2А). Соответственно, справедливо заключить, что специфическое накопление радиоактивного субстрата в клетке, а не присутствие радиоактивности в культуральной среде, ведет к повреждающему эффекту. Следует заметить, что проявляющаяся токсичность $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$ по отношению к $\text{T}_{\text{MBP-GFP-TK}}$ может быть объяснена непосредственным повреждающим действием присутствующего в ядре изотопа, а не блокированием транскрипции вследствие встраивания трифосфата FIAU во вновь синтезирующуюся цепь ДНК, как это происходит в случае обработки ГЦВ-ом, поскольку концентрация химической составляющей FIAU в десятки раз ниже требуемой для проявления токсического эффекта.

Как показали Коehne с соавт. [14], аккумуляция радиоактивного субстрата не ведет к значительному изменению функциональной активности Т-клеток, в то время как в проведенных экспериментах наблюдали значительное токсическое действие $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$ на $\text{T}_{\text{MBP-GFP TK}}$ -лимфоциты (рис. 2). Дело в том, что в экспериментах Коehne изучали изменение цитотоксической активности Т-клеток, сенситивизированных к антигенам Эпштейн-Бар-ассоциированной лимфомы, после коинкубации их с радиоактивным субстратом. В настоящей работе показано ингибирование пролиферативной активности $\text{T}_{\text{MBP-GFP TK}}$ в ответ на действие антигена, чего не требуется для проявления цитотоксичности [14]. Определение повреждающего эффекта $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$ *in vivo* на модели адаптивного ЭАЭ позволило продемонстрировать, что в преclinical фазе заболевания введенные T_{MBP} -лимфоциты до миграции в ЦНС активно пролиферируют в периферических органах и крови, что коррелирует с данными, полученными при сравнении их количества в различных органах на разных стадиях развития заболевания [20]. Введение радиоактивного субстрата приводит к значительному ослаблению клинических проявлений. У животных, получивших инъекцию $\text{T}_{\text{MBP-GFP TK}}$ и $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$, наблюдалось только незначительное ослабление тонуса хвоста. У крыс контрольных групп, которые получили инъекции $\text{T}_{\text{MBP-GFP}}$ или $\text{T}_{\text{MBP-GFP}}$ и $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$, развивается тетрапарез, что соответствует 4-му уровню клинических проявлений. Значительное ослабление тяжести заболевания при введении $\text{T}_{\text{MBP-GFP TK}}$ и $[^{123}\text{I}]\text{FIAU}$ может быть объяснено ингибирующим эффектом радиоактивного субстрата на пролиферацию $\text{T}_{\text{MBP-GFP-TK}}$, что и соответствует результатам, полученным *in vitro*.

Способность клеток, экспрессирующих HSV1-tk, накапливать радиоактивно меченные субстраты делает возможным их обнаружение *in vivo* сканированием в гамма-камере или на позитрон-эмиссионном томографе. Несмотря на то, что гамма-сканирование показало обнадеживающие результаты в отслеживании клеток, сенсibilизированных к опухолевым антигенам, данный подход оказался не достаточно чувствительным для изучения распределения энцефалитогенных клеток *in vivo*. Это объясняется большей концентрацией Т-клеток в небольшом объеме опухоли по сравнению с концентрацией Т_{МВР} в органах животного, например в селезенке или крови.

Таким образом, гамма-сканирование позволяет определять локализацию энцефалитогенных клеток только в тех органах, в которых они представлены в максимальной концентрации. При аккумуляции радиоактивно меченных аналогов ГЦВ проявляется токсичное действие последних на антигенспецифические Т-лимфоциты, что выражается в ингибировании процесса их пролиферации.

Литература

- Moolten F.L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy // *Cancer Res.* 1986. (Oct.). Vol. 46 (10). P. 5276–5281.
- Ilsley D.D., Lee S.H., Miller W.H., Kuchta R.D. Acyclic guanosine analogs inhibit DNA polymerases alpha, delta, and epsilon with very different potencies and have unique mechanisms of action // *Biochemistry.* 1995 (Feb 28). Vol. 34 (8). P. 2504–2510.
- Fillat C., Carrió M., Cascante A., Sangro B. Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene / Ganciclovir system: fifteen years of application // *Cur. Gene Ther.* 2003 (Feb.). Vol. 3 (1). P. 13–26. (Rev.)
- Kolb H.J., Schmid C., Barrett A.J., Schendel D.J. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras // *Blood.* 2004 (Feb 1). Vol. 103 (3). P. 767–776; Epub. 2003 (Sep 4). (Rev.)
- Kolb H.J., Mittermüller J., Clemm C. et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients // *Blood.* 1990 (Dec 15). Vol. 76 (12). P. 2462–2465.
- Ciceri F., Bonini C., Gallo-Stampino C., Bordignon C. Modulation of GvHD by suicide-gene transduced donor T lymphocytes: clinical applications in mismatched transplantation // *Cytotherapy.* 2005. Vol. 7 (2). P. 144–149. (Rev.)
- Painter R.G., Lanson N.A. Jr., Jin Z., Park F., Wang G. Conditional expression of a suicide gene by the telomere reverse transcriptase promoter for potential post-therapeutic deletion of tumorigenesis // *Cancer Sci.* 2005 (Sep). Vol. 96 (9). P. 607–613.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J. et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance // *Immunol. Rev.* 2001 (Aug). Vol. 182. P. 18–32. (Rev.)
- Cohen J.L., Boyer O., Klatzmann D. Would suicide gene therapy solve the ‘T-cell dilemma’ of allogeneic bone marrow transplantation? // *Immunol. Today.* 1999 (Apr). Vol. 20 (4). P. 172–176. (Rev.)
- Tjuvajev J.G., Stockhammer G., Desai R. et al. Imaging the expression of transfected genes *in vivo* // *Cancer Res.* 1995 (Dec 15). Vol. 55 (24). P. 6126–6132.
- Tjuvajev J.G., Finn R., Watanabe K. et al. Noninvasive imaging of herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression: a potential method for monitoring clinical gene therapy // *Cancer Res.* 1996 (Sep 15). Vol. 56 (18). P. 4087–4095.
- Tjuvajev J.G., Avril N, Oku T. et al. Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography // *Cancer Res.* 1998 (Oct 1). Vol. 58 (19). P. 4333–4341.
- Larson S.M., Tjuvajev J., Blasberg R. Triumph over mischance: a role for nuclear medicine in gene therapy // *J. Nucl. Med.* 1997 (Aug). Vol. 38 (8). P. 1230–1233. (Rev.)
- Koehne G., Doubrovin M., Doubrovina E. et al. Serial *in vivo* imaging of the targeted migration of human HSV-TK-transduced antigen-specific lymphocytes // *Nat. Biotechnol.* 2003 (Apr). Vol. 21 (4). P. 405–413; Epub. 2003 (Mar 24).
- Zanzonico P., Koehne G., Gallardo H.F. et al. [131I] FIAU labeling of genetically transduced, tumor-reactive lymphocytes: cell-level dosimetry and dose-dependent toxicity // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2006 (Sep). Vol. 33 (9). P. 988–997; Epub. 2006 (Apr 11).
- Doubrovin M.M., Doubrovina E.S. et al. *In vivo* imaging and quantitation of adoptively transferred human antigen-specific T cells transduced to express a human norepinephrine transporter gene // *Cancer Res.* 2007 (Dec 15). Vol. 67 (24). P. 11959–11969.
- Flügel A., Willem M., Berkowicz T., Wekerle H. Gene transfer into CD4+ T lymphocytes: green fluorescent protein-engineered, encephalitogenic T cells illuminate brain autoimmune responses // *Nat. Med.* 1999 (Jul). Vol. 5 (7). P. 843–847.
- Alauddin M.M., Conti P.S. Synthesis and preliminary evaluation of 9-(4-[18F]-fluoro-3-hydroxymethylbutyl)guanine ([18F]FHBG): a new potential imaging agent for viral infection and gene therapy using PET // *Nucl. Med. Biol.* 1998 (Apr). Vol. 25 (3). P. 175–180.
- Gambhir S.S., Bauer E., Black M.E. et al. A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000 (Mar 14). Vol. 97 (6). P. 2785–2790.
- Odoardi F., Kawakami N., Li Z. et al. Instant effect of soluble antigen on effector T cells in peripheral immune organs during immunotherapy of autoimmune encephalomyelitis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007 (Jan 16). Vol. 104 (3). P. 920–925; Epub. 2007 (Jan 9).