

других методов в молекулярно-генетической диагностике наследственных форм RB и на этой основе прогнозирование предрасположенности к опухоли в семье будут рассмотрены в следующем сообщении. Работа выполнена в рамках программы "Геном человека".

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сотникова Е.Н. Медико-генетическое консультирование и принципы формирования групп риска в детской онкологии: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1987.
2. Cavenee W.K. et al. // Nature. — 1983. — Vol. 305. — P. 779—784.
3. Horsthemke B., Barnert H.I., Greger V. et al. // Lancet. — 1987. — Vol. 1. — P. 511—512.
4. Lalande M. et al. // Cancer genet. cytogenet. — 1984. — Vol. 13. — P. 283—295.
5. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. — Gold Spring Harbor Lab, 1982.
6. Shields J.A. Diagnosis and management of intraocular tumors. — London, 1989.
7. Southern E. // J. Molec. Biol. — 1975. — N 98. — P. 503—527.

Поступила 18.01.93 / Submitted 18.01.93

© Коллектив авторов, 1994
УДК 616.24-006.6:577.15

Б.Е. Полоцкий, С.М. Ситдикова, Ф.В. Доненко,
З.О. Мачаладзе, Л.В. Мороз

ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗ В КЛЕТКАХ УДАЛЕННОЙ ОПУХОЛИ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

НИИ клинической онкологии

В настоящее время широко обсуждается вопрос о роли глутатион-S-трансфераз (GST) в обеспечении резистентности опухолевых клеток к цитостатикам. Показано, что активность этих ферментов возрастает при развитии устойчивости к доxorубину клеток лейкоза мышей P-388 в системе *in vivo* [1]. Аналогичные данные получены в системе *in vitro*: в клетках MCF-7

deletion without restoration of the gene functioning. Occurrence of a more extensive deletion in the segment 13q14.1—13q22 including the site 9D11 that "disguised" the loss of a gene "dose" was excluded by the cytogenetical analysis.

In one child with bilateral RB the cytogenetical deletion was confirmed by blot hybridization.

The deletion variants detected by cytogenetical and molecular genetical study in families of RB patients are presented in the table. The rate of familial deletion in the 19 families studied is rather high: 6/19 or 31%. Basing on results of our investigation we could make prognosis of the disease in some of the families. In all cases of deletion detection we made differential diagnosis of hereditary RB forms, distinguished persons with hereditary proneness to RB, evaluated the risk of disease repetition in members of every family, gave recommendations both for prenatal and early (including preclinical) tumor diagnosis, made up a register of persons with hereditary proneness to the disease.

RB occurrence in one of the parents and detection of a microdeletion in a child with RB determined a risk of 45—50% for further sibs because in this case the microdeletion is present in 50% of germ cells of the parent with RB. In cases of hereditary mutation (involvement of two or more sibs with both parents being normal) the risk for sequent sibs is also 45—50%. In cases of *de novo* mutations the risk for sequent sibs is similar to the populational risk, i.e. 5% [1].

By B. Horsthemke et al. [3], the rate of deletion in parents with hereditary disease is 20—30% (31% by our data). Employment of a larger set of probes may increase the portion of RB deletion variants, but the complex of mutations in the RB gene is hardly confined to deletions only.

Thus, detection of RB gene deletions should be a part of complex diagnosis of hereditary proneness to RB. Application of other methods of molecular genetical diagnosis of RB hereditary forms and prognosis of familial predisposition to the malignancy will be considered in the next report. The investigation is performed within the Human Genome program.

B.E. Polotsky, S.M. Sitdikova, F.V. Donenko,
Z.O. Machaladze, L.V. Moroz

EVALUATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY IN CELLS OF OPERATIVE SPECIMENS OF NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA

Research Institute of Clinical Oncology

The role of glutathione S-transferases (GST) in tumor cell resistance to cytostatics is currently under wide discussion. It is shown *in vivo* [1] that doxorubicin-resistant cells of murine leukemia P-388 demonstrate increased GST activity. Similarly, MCF-7 cells with multidrug resistance (MDR) show *in vitro* a 45-fold higher GST activity than their parental sensi-

Таблица 1

Table 1

Распределение больных с точки зрения распространенности и гистологической принадлежности опухоли
Distribution of cases with respect to cancer advance and histology

Распространенность опухоли	Гистологическая форма		Всего
	АК	ПК	
T1—4N0M0	6	8	14
T1—3N1—2M0	5	11	16
И т о г о... Overall	11	19	30
Disease advance	AC	SCC	Total
	Histology		

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: АК — аденокарцинома, ПК — плоскоклеточный рак.

Note. Here and in tables 2,3: AC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma.

с фенотипом множественной лекарственной резистентности (МЛР) активность GST в 45 раз выше, чем в клетках исходной чувствительной линии [12]. Увеличение активности GST отмечено не только в клетках с фенотипом МЛР, но и в опухолевых клетках, резистентных к алкиляторам [6]. На возможное участие глутатиона и глутатионзависимых ферментов в обеспечении резистентности опухолей к цитостатикам указывают эксперименты с сульфоксимином бутионина (BSO, ингибитор этой ферментной системы), применение которого приводит к уменьшению и даже отмене устойчивости клеток к противоопухолевым препаратам [9, 11].

По мнению некоторых авторов, выявление повышенного уровня активности GST в клетках опухолей онкологических больных может быть одним из тестов, прогнозирующих устойчивость данной опухоли к химиотерапии [3, 10, 12].

В настоящем исследовании была проведена оценка уровня активности GST в клетках удаленной опухоли больных с различными гистологическими вариантами немелкоклеточного рака легкого. Известно, что немелкоклеточный рак легкого мало чувствителен к химиотерапии и основным методом его лечения является хирургический.

Материалы и методы. Оперировано 30 больных аденогенным (11) и плоскоклеточным (19) раком легкого с распространенностью опухоли, соответствующей T1—4N0—2M0 (табл. 1).

Метастазы во внутригрудные лимфоузлы или их отсутствие в обеих группах отмечались с равной частотой. У 11 больных выявлена аденокарцинома (у 6 женщин из 7) и у 19 плоскоклеточный рак (у 3 низкодифференцированный). В 16 наблюдениях отмечен периферический и в 14 — центральный рак легкого. Объем операции — резекция легкого (12) или пневмонэктомия (18) определялся распространенностью процесса. У 3 пациентов операция носила паллиативный характер. Операционный материал непосредственно после удаления замораживали в жидком азоте и хранили при температуре —70°C. В качестве контроля использовали нормальную близлежащую ткань легкого. Исследуемые образцы гомогенизировали в трех объемах 0,1M Na, К-фосфатного буфера (pH 7,0) и центрифугировали при 10 000 g в течение 20 мин. Определение активности GST проводили в полученном супернатанте с использованием в качестве

Таблица 2

Table 2

Уровень активности GST в клетках опухоли и нормальной ткани у больных раком легкого
GST activity in the tumor and in the normal tissue of cancer patients

Группа больных	Уровень активности GST в опухоли	Уровень активности GST в нормальной ткани	p	Гисто- логиче- ская форма
	нмоль/мин на 1 мг белка			
1-я (n=13)	98,6±6,8	24,1±1,5	<0,001	ПК/SCC
	103,6±1,3	77,1±8,6	<0,05	ПК/SCC
	115,1±1,5	88,2±7,1	<0,05	ПК/SCC
	147,1±10,1	72,7±2,3	<0,002	ПК/SCC
	190,9±9,1	34,9±1,9	<0,001	ПК/SCC
	267,7±15,3	77,0±5,6	<0,001	ПК/SCC
	406,8±18,2	78,8±6,9	<0,001	ПК/SCC
	1127,5±108,5	44,7±2,8	<0,001	ПК/SCC
	55,3±4,8	33,1±5,1	<0,05	АК/АС
	94,3±6,5	21,6±1,9	<0,001	АК/АС
2-я (n=8)	102,5±21,8	24,5±2,2	<0,05	АК/АС
	120,9±4,1	42,4±1,7	<0,001	АК/АС
	219,1±18,2	86,3±24,1	<0,05	АК/АС
	12,8±0,9	103,8±2,1	<0,001	ПК/SCC
	39,0±3,0	51,6±2,1	<0,05	ПК/SCC
	39,2±3,6	70,9±6,9	<0,02	ПК/SCC
	57,0±5,4	104,0±11,4	<0,05	ПК/SCC
	58,0±4,5	174,5±4,5	<0,001	ПК/SCC
	136,1±4,9	174,6±10,5	<0,05	ПК/SCC
	68,7±6,6	140,0±3,3	<0,001	АК/АС
3-я (n=9)	166,2±9,3	236,1±16,3	<0,05	АК/АС
	24,2±4,9	16,5±1,7	>0,1	ПК/SCC
	81,3±10,8	80,6±3,7	>0,5	ПК/SCC
	86,5±11,5	117,3±10,3	>0,1	ПК/SCC
	98,2±4,7	148,2±19,6	>0,05	ПК/SCC
	102,3±34,9	33,6±2,6	>0,1	ПК/SCC
	23,3±2,4	25,8±1,1	>0,5	АК/АС
	163,8±7,9	145,0±9,5	>0,5	АК/АС
	182,3±18,6	133,0±10,8	>0,05	АК/АС
	487,8±51,9	544,0±54,0	>0,5	АК/АС
Patient group	nmol/min per mg protein		p	Histo- logy
	GST activity in the tumor	GST activity in the normal tissue		

tive lines [12]. Besides MDR cells GST activity is elevated in alkylator-refractory tumors [6]. The potential contribution of glutathione and glutathione-dependent enzymes to development of tumor resistance to cytostatics is also supported by experiments with butionine sulfoximine (BSO, an inhibitor of this enzyme system) which reduces or removes completely cellular resistance to antitumor drugs [9, 11].

There is an opinion than determination of GST activity in cancer patients may be a test for prognosis of response to chemotherapy [3, 10, 12].

In our investigation we evaluated GST activity in operative specimens of non-small cell lung cancer of various histologies. As known non-small cell lung cancer is poorly responsive to chemotherapy, and

субстрата 1 мкМ раствора 1-хлор-2, 4-динитробензола [5]. В каждом образце проводили не менее трех измерений, используя различные концентрации белка образца в пробе. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда [4]. Статистическую обработку данных выполняли методом Фишера—Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Дальнейшее сравнение лабораторных и клинических данных проводили с учетом гистологической формы и распространенности опухоли.

Результаты и обсуждение. Сравнительная оценка уровня активности GST в опухоли и нормальной легочной ткани позволила выделить в целом три группы больных: 1-я — с повышенным уровнем активности этого фермента в опухоли; 2-я — с пониженным; 3-я — группа, в которой активность GST опухоли и контроля была одинакова (табл. 2).

Полученные результаты показывают, что достоверное увеличение уровня активности GST в опухоли по сравнению с нормальной тканью легкого наблюдается у 13 (43,3%) из 30 исследованных. Пониженный уровень активности GST в опухоли по сравнению с контролем отмечен у 8 (26,6%), без изменения — у 9 (30,0%) больных.

Распределение полученных данных в зависимости от распространенности и гистологической формы опухоли приведено в табл. 3.

Из 11 аденокарцином у 5 (45,4%) и из 19 плоскоклеточных новообразований у 8 (42,1%), т.е. одинаково часто, отмечается повышение уровня активности GST в опухолевой ткани. Снижение активности этого фермента выявлено у 2 (18,2%) и 6 (31,6%) больных, а отсутствие изменения активности GST по отношению к нормальной легочной ткани — у 4 (36,4%) и 5 (26,3%) больных соответственно. Зависимости активности GST в опухоли от ее распространенности не получено.

Необходимо отметить, что уровень активности GST как в опухоли, так и в нормальной ткани легкого колеблется в широких пределах. По нашему мнению, различия в активности GST в нормальной ткани легкого могут объясняться тем, что это фермент детоксикации и поэтому различные ксеногенные воздействия (курение, лекарства, употребление алкоголя и т.д.) изменяют его активность. Нельзя также исключить и

Таблица 3

Уровень активности GST в опухоли в зависимости от распространенности и гистологической формы
GST activity with respect to cancer advance and histology

Группа больных	Распространенность опухоли				Всего
	T1—4N0M0		T1—4N1—2M0		
	АК	ПК	АК	ПК	
1-я	3	4	2	4	13
2-я	2	3	—	3	8
3-я	1	2	3	3	9
Итого: Overall	6	9	5	10	30
Patient group	AC	SCC	AC	SCC	Total
	T1—4NOMO		T1—4N1—2MO		
	Disease advance				

surgery is the main treatment modality.

Materials and Methods. Surgery was performed in 30 patients with adenogenic (11) and squamous cell (19) lung carcinoma (table 1).

The two groups were well balanced with respect to the presence of intrathoracal lymph node metastases. There were 11 adenocarcinomas (6/7 women) and 19 squamous cell carcinomas (3 poorly differentiated) with peripheral (16) and central (14) lesion localization. The surgery consisted of lung resection (12) or pneumonectomy (18) depending upon disease advance. In 3 cases the surgery was palliative. Operative specimens were frozen in liquid nitrogen immediately after removal and stored at -70°C . Normal adjacent lung tissue specimens were used as control. The specimens were homogenized in three volumes of 0.1 M Na, K-phosphate buffer (pH 7.0) and centrifuged at 10,000 g for 20 min. GST activity was assessed in the supernatant using 1 μM 1-chloro-2,4-dinitrobenzol solution as a substrate [5]. Three or more measurements were performed for each specimen at different concentrations of protein in the samples. The protein concentration was determined by Bradford's technique. The statistical analysis of the data was performed using the Fisher-Student t -test. The differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Further comparison of the laboratory and clinical data was performed with respect to cancer histology and advance.

Results and Discussion. By GST activity in the tumor and normal lung tissue the cases were stratified into groups with increased (group 1), decreased (group 2) GST activity in the tumor and with equal activity of the enzyme in the tumor and control (group 3) (table 2).

A statistically significant GST elevation in the tumor as compared to normal lung tissue was detected in 13 (43.3%) patients. A decrease in GST activity in the tumor was found in 8 (26.6%) and no difference from the control in 9 (30.0%) cases.

These data are presented in table 3 with respect to cancer histology and advance.

Elevation of GST activity was detected in 5 (45.4%) of the 11 adenocarcinomas and in 8 (42.1%) of the 19 squamous cell carcinomas, i.e. at an equal rate. Reduced GST activity was found in 2 (18.2%) and 6 (31.6%), and no difference in 4 (36.4%) and 5 (26.3%) cases, respectively. There was no correlation between GST activity in the tumor and disease advance.

Of note is a wide variability of GST activity both in the tumor and normal lung tissue. In our opinion the difference in GST activity in the normal lung tissue may be accounted for by the fact that the enzyme detoxifies many xenogens, therefore smoking, drug therapy, alcohol drinking, etc. may change its activity. There can also be some individual peculiarities in the enzyme activity which may influence initial sensitivity of the tumor and normal tissue to chemotherapy.

Thus, in spite of the common poor response of non-small cell lung carcinoma to chemotherapy elevation in

индивидуальные особенности в активности этого фермента, что может играть значительную роль в исходной чувствительности опухоли и нормальной ткани к химиотерапии.

Анализ полученных данных позволяет говорить о том, что, несмотря на исходную низкую чувствительность к химиотерапии немелкоклеточных форм рака легкого, повышение уровня активности GST в опухоли по сравнению с нормальной тканью легкого отмечено только примерно у 50% обследуемых больных независимо от гистологического варианта и стадии заболевания. Кроме того, ранее было показано отсутствие экспрессии *mdr1*-гена в клетках опухолей легкого, устойчивых к цитостатикам [7, 8]. Поэтому можно предположить существование и других механизмов резистентности опухолей легкого к химиотерапии [2].

Представляется необходимым проводить индивидуальную оценку уровня активности GST у больных раком легкого, так как повышение этого показателя в опухоли по сравнению с нормальной тканью является прогностическим признаком устойчивости опухолевых клеток к цитостатикам. Вероятно, последующее лекарственное лечение таких больных целесообразно комбинировать с препаратами, ингибирующими активность этой ферментной системы, что требует дальнейшего изучения.

GST activity in cancer cells as compared to normal lung tissue was detected in 50% of the patients only irrespective of cancer histology and advance. Besides, it was discovered previously that cytostatic-refractory lung cancer cells do not show expression of the gene *mdr1* [7, 8]. Therefore, there can be a variety of mechanisms of lung cancer resistance to chemotherapy [2].

It seems reasonable to test lung cancer patients for GST activity, because elevation of the enzyme in the tumor as compared to the normal tissue is a prognostic factor of tumor cell resistance to cytostatics. Chemotherapy of such patients may be combined with inhibitors of this enzyme system. This problem requires further study.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Доненко Ф.В., Кабиева А.О., Боровкова Н.Б., Мороз Л.В. // Бюл. exper. биол. — 1991. — № 8. — С. 188—190.
2. Доненко Ф.В., Ситдикова С.М., Мороз Л.В. // Вopr. онкол. — 1991. — № 7—8. — С. 780—788.
3. Benard J., Bourhis J., Rion G. // Anticancer Res. — 1990. — Vol. 10, N 54. — P. 1297—1302.
4. Bradford M.M. // Analyt. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248.
5. Habig W.H., Jakoby W.B. // Meth. Enzymol. — 1981. — Vol. 77. — P. 398.
6. Hall A., Cattani A.R., Proctor S.J. // Leukemia Res. — 1989. — Vol. 13, N 5. — P. 351—356.
7. Hong W.K., Shin D.M. // Anticancer Res. — 1992. — Vol. 12, N 2. — P. 367—370.
8. Lai S.L., Goldstein M.M., Gottesman I. et al. // J. nat. Cancer Inst. — 1989. — Vol. 81, N 15. — P. 1144—1150.
9. Lee F.J.F., Sciandra J., Siemann D.W. // Biochem. Pharmacol. — 1989. — Vol. 38. — P. 3697—3705.
10. Nakagawa K., Saijo N., Tsuchida S. et al. // J. Biol. Chem. — 1990. — Vol. 265, N 8. — P. 4296—4301.
11. Smith M.T., Evans C.G., Doane-Setzer P. et al. // Cancer Res. — 1989. — Vol. 49, N 10. — P. 2621—2625.
12. Tsuruo T. // Jap. J. Cancer Res (Gann). — 1988. — Vol. 79. — P. 285—296.

Поступила 17.11.92. / Submitted 17.11.92

© Коллектив авторов, 1994
УДК 616.31-006.6-085

В.Л. Любаев, В.А. Горбунова, Г.С. Рыспаева

РАЗРАБОТКА ПОКАЗАНИЙ К РАЗЛИЧНЫМ МЕТОДАМ ЛЕЧЕНИЯ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДЛИТЕЛЬНОЙ ИНФУЗИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПЛАТИДИАМОМ И 5-ФТОРУРАЦИЛОМ

НИИ клинической онкологии

За последние годы накоплен опыт лечения плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости рта комбинацией препаратов платины (платидиамом) и 5-фторурацила в виде длительной внутривенной инфузионной химиотерапии по схеме: платидиам 100 мг/м²

V.L. Lubayev, V.A. Gorbunova, G.S. Ryspayeva

DEVELOPMENT OF INDICATIONS TO VARIOUS REGIMENS OF TREATMENT FOR SQUAMOUS CELL CANCER OF ORAL MUCOSA USING CONTINUOUS INFUSION THERAPY WITH PLATIDIAM AND 5-FLUOROURACIL

Research Institute of Clinical Oncology

Over the last years there is experience in treatment for squamous cell cancer of oral mucosa with a combination of platinum complexes (platidium) and 5-fluorouracil as continuous intravenous infusion of platidium 100 mg/m²/d over 5 h on day 1 and 5-fluorouracil