

ГЕНОМИКА И ЭПИГЕНОМИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Доклады

Гиперметилированные гены микроРНК в карциноме яичника: наборы маркеров для диагностики и прогноза метастазирования

Э.А. Брага^{1,2}, В.И. Логинов^{1,2}, А.М. Бурденный¹,
И.В. Пронина¹, Е.А. Филиппова¹, Т.П. Казубская³,
Д.С. Ходырев⁴, Н.Е. Кушлинский³

¹ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», Москва;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

⁴ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, Москва

Карциному яичника отличает высокая частота летальных исходов, связанных с метастазированием. МикроРНК и метилирование относятся к важным эпигенетическим механизмам в патогенезе рака.

Цель исследования — изучение роли гиперметилированных генов микроРНК в патогенезе карциномы яичника и оценка их диагностического и прогностического потенциала.

С применением метилспецифичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и представительной выборки из 70 образцов рака яичника (РЯ) определены 14 генов микроРНК, гиперметилированных в большинстве образцов опухолей по сравнению с парными образцами гистологически неизменной ткани (48–57 % против 4–19 %; $p < 0,001$). Методом количественной ПЦР с применением специфических наборов (США) определены уровни экспрессии данных генов микроРНК и показана значимая корреляция изменений уровней метилирования и экспрессии, что подтвердило функциональную роль метилирования данных генов. С помощью ROC-анализа выбрана эффективная система из 4 маркеров для диагностики РЯ (*MIR-9-1*, *-124-3*, *-129-2*, *-107*), которая характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью — до 87–94 % при AUC = 0,92 — относительно условной нормы (парных образцов гистологически неизменной ткани)

и абсолютной нормы (18 образцов ткани яичника умерших от неонкологических заболеваний). Для обнаружения или подтверждения рака необходимо выявление метилирования не менее 1 гена из данного набора. Кроме того, идентифицированы 10 генов микроРНК (*MIR-124-2*, *-127*, *-125b-1*, *-129-2*, *-137*, *-193a*, *-203a*, *-34b/c*, *-130b*, *-1258*), метилирование которых значимо ($p < 0,001$) ассоциировано с метастазированием. Связь с метастазированием данных генов подтверждена при анализе 20 перитонеальных метастазов. С помощью ROC-анализа определены три наиболее оптимальные системы маркеров, включающие от 4 до 5 генов микроРНК, которые характеризуются высокой чувствительностью (94 %) и специфичностью (86 %) при AUC = 0,89–0,92. Метилирования любых трех генов из данных наборов достаточно для прогнозирования метастазирования у пациента с указанной точностью. Определение гиперметилированных генов микроРНК с диагностическим потенциалом и прогностическим значением в отношении метастазирования может найти применение в клинике для разработки неинвазивной диагностики и персонализированного лечения больных РЯ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-15-00654П).

Новые подходы к лечению и диагностике новообразований щитовидной железы

Л.Ф. Гуляева^{1,2}, В.В. Конончук¹, Т.С. Калинина¹,
С.П. Шевченко^{2,3}, Г.П. Черная^{2,3}

¹ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН», Новосибирск;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный университет», Новосибирск;

³ГБУЗ «Городская клиническая больница № 1», Новосибирск

В последние годы появились новые молекулярно-генетические подходы к исследованию заболеваний щитовидной железы (ЩЖ). Применяемая сейчас тонкоигольная биопсия не позволяет отличить фолликулярную аденому (ФА) от фолликулярного рака ЩЖ (ФРЩЖ).

Для решения данной задачи можно использовать данные об экспрессии микроРНК и их генов-мишеней. В нашем исследовании были подобраны микроРНК: miR-21, -221, -205, -31. Для данных микроРНК были подобраны *in silico* гены-мишени, среди которых были обнаружены эффективные биомаркеры для дифференцирования ФА и ФРЩЖ: *BMF* (в ФРЩЖ снижение в 4 раза, в ФА уровень не менялся), *ACAT1* (в ФА снижение в 3 раза, в ФРЩЖ не менялся) и *HTRA3* (в ФРЩЖ снижение в 14 раз, в ФА снижение в 9 раз).

Радиойодрезистентность (РЙР) высокодифференцированных типов рака щитовидной железы (РЩЖ) и ее ранний прогноз являются важнейшей задачей. В данном случае может использоваться обратный метод — для генов, ассоциированных с РЙР (*SLC5A5*, *SLC26A4*, *TSHR*), *in silico* подбираются микроРНК, для которых они являются мишенями. В нашем исследовании для подобранных микроРНК (miR-24, -221, -429) также *in silico* подбирались гены-мишени, ассоциированные с канцерогенезом. Для ФРЩЖ наблюдалось значимое повышение в резистентных образцах относительно нерезистентных — *PTEN* и *ITGA6*. Для папиллярного РЩЖ (ПРЩЖ) наблюдалось значимое снижение тех же генов. Результаты были подтверждены иммуногистохимическим (ИГХ) исследованием.

Известно, что примерно в 50 % случаев ПРЩЖ наблюдается наличие соматической мутации *V600E* в драйверном гене *BRAF*, а это приводит к более агрессивному течению заболевания и худшему прогнозу. В нашем исследовании мы связали наличие данной мутации с экспрессией интегриновых рецепторов. Значительное увеличение уровня экспрессии *ITGA3* (в 3,1 раза, $p = 0,0422$) наблюдалось в положительных образцах *BRAF-V600E*, что делает его потенциальным маркером.

Таким образом, применение молекулярно-генетических методов позволяет находить перспективные маркеры диагностики, прогноза и лечения РЩЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке интеграционного проекта № 0310-2018-0007.

Клетки нейробластом могут адаптироваться к ингибированию рецепторной тирозинкиназы KIT за счет действия факторов роста EPO и NGF

Т.Д. Лебедев, Э.Р. Вагапова, А.А. Буздин, П.М. Рубцов, П.В. Спирин, В.С. Прасолов

ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Нейробластомы являются одними из самых распространенных опухолей у детей, и на их долю приходится около 8 % всех педиатрических злокачественных заболеваний. Выживаемость больных с нейробластомой

в среднем составляет 40–50 %, однако прогноз может существенно различаться в зависимости от агрессивности опухоли. Рецепторная тирозинкиназа KIT является перспективной мишенью для терапии многих типов злокачественных заболеваний, в том числе нейробластом. Тем не менее ключевой проблемой применения таргетных препаратов для терапии нейробластом является способность злокачественных клеток адаптироваться к их действию. С помощью применения оригинальных биоинформатических алгоритмов мы выявили несколько ростовых факторов (EPO, NGF, IL6 и BDNF), которые могут спасти клетки нейробластом от подавления экспрессии гена *KIT*. Мы показали, что подавление экспрессии *KIT* с помощью shРНК или ингибирование KIT препаратом иматиниб приводит к активации экспрессии рецепторов эритропоэтина (EPOR) и фактора роста нервов (TrkA). Обработка клеток эритропоэтином (EPO) или фактором роста нервов (NGF) существенно повышает выживаемость клеток нейробластом за счет активации киназ ERK1/2. Ингибирование активности ERK1/2 не только блокирует действие EPO и NGF, но и существенно усиливает действие препарата иматиниб на клетки нейробластом. Мы также показали, что высокая экспрессия EPOR ассоциирована с неблагоприятным прогнозом у больных с нейробластомой, а также может служить маркером более высокой вероятности рецидива.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 17-04-01697) и РНФ (грант № 19-74-00120).

Соматический статус гена BRCA1 как предиктивный и прогностический маркер при назначении лечения больным раком молочной железы

М.М. Цыганов, А.М. Певзнер, М.К. Ибрагимова, Е.М. Слонимская, Н.В. Литвяков

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Установлено, что наличие герминальной мутации BRCA15382insC в 20-м экзоне сопряжено с высоким риском развития наследственного рака молочной железы (РМЖ) и РЯ. Далее установлено, что группы больных с наличием данной мутации особенно чувствительны к неоадьювантной химиотерапии (НХТ) с использованием препаратов платины и резистентны к таксанам. Можно предположить, что другие соматические изменения гена *BRCA1* в опухоли молочной железы, так же как и герминальная мутация, могут приводить к недостаточности системы репарации и, как следствие, к высокой чувствительности опухоли к лечению ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) — повреждающими агентами.

Цель исследования — изучить связи экспрессии и делеции гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с эффектом НХТ и исходом заболевания.

Материалы и методы. Обследованы 93 больных РМЖ (ПА—ПВ) с люминальным В-подтипом. В ретроспективную группу вошел 61 пациент. Больные получали 4–8 курсов НХТ по схемам FAC, CAH или монотерапию таксотером. В проспективную группу были включены 36 больных, которым в зависимости от CNA-статуса гена *BRCA1* назначалась персонализированная схема НХТ, либо СР (циклофосфан, цисплатин), либо монотерапия таксотером. Для анализа аберраций числа копий (CNA) проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах. Уровень экспрессии гена *BRCA1* оценивали при помощи ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Результаты. В ретроспективной группе было установлено, что частота CNA в общей группе сопряжена с эффектом НХТ ($p < 0,0001$). Кроме этого, было установлено, что наличие делеции гена *BRCA1* в опухоли молочной железы определяет хороший прогноз заболевания ($p = 0,01$). На основе полученных данных, а также данных литературы было проведено проспективное исследование. Если у пациентов наблюдались

низкий уровень экспрессии и делеция гена *BRCA1*, то такие больные получали НХТ с включением препаратов платины (СР), остальная группа пациентов получала таксотер в монорежиме. В результате проведения лечения у 78,6 % больных группы с НХТ по схеме СР наблюдался объективный ответ на НХТ (11/14 пациентов). Подобный результат был показан для пациентов 2-й группы (таксотер), полная и частичная регрессия регистрировалась у подавляющего количества больных (84,2 %, 19 из 22 больных). Важно отметить, что из больных, у которых назначалась химиотерапия (ХТ) с включением препаратов платины, был всего 1 пациент, у которого развилась метастатическая болезнь. Среди пациентов, пролеченных таксотером, гематогенные метастазы развились у 2 человек.

Заключение. Полученные первичные данные могут свидетельствовать о высокой предиктивной и прогностической значимости CNA-статуса и экспрессионного статуса гена *BRCA1*, но это требует дальнейшего исследования и проведения более широкомасштабных проспективных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-75-00027).

Постеры

Скрамблазы PLSCR1 и Xkr8 — новые потенциальные прогностические маркеры рака яичника

К. Гавриш¹, К.И. Кирсанов², М.Г. Якубовская²,
М.В. Богданов^{1,3}, Р.Г. Киямова¹

¹НИЛ «Биомаркер» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Республика Татарстан;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

³Отдел биохимии и молекулярной биологии, Медицинская школа МакГоверн, Хьюстон, США

Рак яичника — наиболее агрессивное онкологическое заболевание женской репродуктивной системы. Способствовать улучшению выживаемости больных РЯ может разработка персонализированных подходов терапии, основанных на использовании прогностических и предиктивных маркеров. Важными маркерами прогноза выживаемости и устойчивости опухолей к ХТ являются гены, вовлеченные в регуляцию апоптоза. Скрамблазы, в том числе PLSCR1 и Xkr8, вовлечены в регуляцию апоптоза путем переноса фосфолипидов между слоями мембраны в ответ на повреждение клеток.

Цель исследования — оценить способность скрамблаз PLSCR1 и Xkr8 предсказывать исход и прогрессирование РЯ.

Данные об общей и безрецидивной выживаемости больных РЯ и экспрессии генов *PLSCR1* и *Xkr8* на уровне РНК были взяты из исследования «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas). Анализ проводился в статистической среде R. Для определения оптимального порогового значения экспрессии исследуемых генов был проанализирован каждый перцентиль между нижним и верхним квартилями (от 25-го до 75-го перцентиля) в группе пациентов с РЯ ($n = 530$). Для статистической оценки различий в выживаемости пациентов с РЯ использовался *log-rank*-тест.

В результате исследования было установлено, что сниженная экспрессия гена *PLSCR1* (ниже 41-го перцентиля) ассоциирована с плохим прогнозом заболевания, а пониженная экспрессия гена *Xkr8* (ниже 54-го перцентиля) — с более высоким риском возникновения рецидивов у больных РЯ. Полученные результаты позволяют предполагать, что гены *PLSCR1* и *Xkr8* могут рассматриваться в качестве потенциальных прогностических маркеров РЯ.

Работа выполнена за счет субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Полнотранскриптомный анализ экспрессии генов в опухоли молочной железы с амплификацией длинного плеча 8-й хромосомы

М.К. Ибрагимова^{1,2}, М.М. Цыганов^{1,2}, Е.М. Слонимская^{1,3},
Н.В. Литвяков^{1,2}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

³ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Введение. Согласно базе www.progenetix.org по частоте встречаемости при опухолях всех изученных локализаций (177 типов опухолей) амплификация длинного плеча 8-й хромосомы, в частности 8q24, оказалась наиболее распространенной aberrацией числа копий (CNA) и встречалась более чем в 30 % всех образцов (Cai и соавт., 2012). Наиболее значимым геном в этом локусе по данным COSMIC является протоонкоген *c-Myc* (Jönsson и соавт., 2010), который участвует во многих сигнальных путях. В своей работе мы изучили изменение экспрессии всех 20 тыс. генов в зависимости от наличия амплификации длинного плеча 8-й хромосомы (с локусом 8q24), в процессе предоперационной ХТ и в зависимости от гематогенного метастазирования.

Материалы и методы. В исследование включены 60 больных РМЖ T1–4N0–2M0 (IIA–IIIB стадии) люминального В-подтипа с морфологически верифицированным диагнозом в возрасте 22–68 лет (средний возраст — $46,2 \pm 0,4$ года). Материалом для исследования служили парные образцы биопсийного материала до лечения и операционного материала для каждого из пациентов. Были выделены ДНК и РНК из исследуемого материала при помощи наборов QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия) и RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Германия) соответственно. Наличие амплификаций до лечения и после НХТ в 8q определялось с использованием микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, США). Экспрессию генов оценивали у 40 больных при помощи микроматрицы Clariom S Assays Human (Affymetrix, США) и определяли дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) в зависимости от наличия амплификации 8q, изменения в процессе НХТ, гематогенного метастазирования и эффекта НХТ.

Результаты. Частота амплификации 8q в опухоли до лечения составила 62 % (37/60 случаев). Из 37 больных амплификация 8q в резидуальной опухоли после

проведения НХТ сохранилась у 24 пациентов (65 %), кроме этого, еще у 3 пациентов амплификации 8q в опухоли возникли *de novo* под действием НХТ. Количество ДЭГ в опухоли до лечения у больных с наличием амплификации 8q и без нее составило 452 гена (211 Up-regulated, 241 Down-regulated). Топ-10 сигнальных путей по количеству ДЭГ: Olfactory receptor activity, miR-targeted genes in lymphocytes, miR-targeted genes in muscle cell, PI3K-Akt Signaling Pathway, VEGFA-VEGFR2 Signaling Pathway, EGF/EGFR Signaling Pathway, MAPK Signaling Pathway, Ciliary landscape, miR-targeted genes in leukocytes, Cell Cycle. После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с амплификацией 8q и без нее различались очень существенно, почти по 4 тыс. ДЭГ (3904). В топ-10 сигнальных путей попали Olfactory receptor activity, miR-targeted genes in lymphocytes, miR-targeted genes in muscle cell, PI3K-Akt Signaling Pathway, Nonalcoholic fatty liver disease, Cytoplasmic Ribosomal Proteins, miR-targeted genes in epithelium, 6 сигнальных путей были общими для опухолей до лечения и после НХТ, различающихся по наличию или отсутствию в них амплификации 8q.

Заключение. Изучен спектр ДЭГ и сигнальных путей, активированных и инактивированных в опухолях молочной железы до лечения и после НХТ, в зависимости от наличия амплификации длинного плеча 8-й хромосомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-15-01203).

Связь уровней экспрессии андрогенового рецептора и микроРНК, регулирующих экспрессию прогестеронового, андрогенового и эстрогенового рецепторов, с метастазированием в лимфатические узлы при различных подтипах рака молочной железы

Т.С. Калинина, В.В. Конончук

ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН», Новосибирск

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным онкологическим заболеванием среди женщин. Сложности в лечении РМЖ ассоциированы с возникновением метастазов уже на ранних стадиях, что приводит в дальнейшем к прогрессированию заболевания. С процессами канцерогенеза молочной железы связаны изменения в активности эстрогенового и прогестеронового рецепторов (ER и PgR). В последние годы также стало известно, что с прогрессированием РМЖ,

в частности с формированием метастазов, связаны изменения в экспрессии андрогенового рецептора (AR) и микроРНК. Поэтому для поиска маркеров метастазирования в настоящей работе было проведено исследование уровней экспрессии AR и микроРНК, для которых AR, ER или PgR подтверждены в качестве мишеней, в образцах злокачественных опухолей молочной железы.

Было выявлено, что уровень экспрессии AR и микроРНК-185, -205, -19b, -22, -222, -378, -181 различается для молекулярных подтипов РМЖ и зависит от экспрессии PgR, ER и HER2. Наши результаты показали, что возможность использования AR и микроРНК в качестве маркеров зависит от подтипа опухоли: снижение уровня экспрессии AR может служить маркером наличия метастазов в лимфатические узлы при HER2-позитивных подтипах РМЖ, а нарушение экспрессии микроРНК-205, микроРНК-185 — при люминальном В HER2-позитивном РМЖ. При данном подтипе РМЖ для случаев с метастазами характерен более высокий уровень микроРНК-205 и низкий уровень микроРНК-185 в опухолевых тканях по сравнению со случаями без метастазов. Более сильное снижение уровней микроРНК-378 и микроРНК-22 оказалось связано с метастазированием при люминальном А РМЖ. Снижение уровней микроРНК-185, -22 также ассоциировано с метастазами в лимфатические узлы при люминальном В HER2-негативном РМЖ. Таким образом, AR и микроРНК, ассоциированные с ER, PgR, AR, действительно могут выступать маркерами метастазирования при определенных подтипах РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-15-00319).

Таксономический состав микробного сообщества опухолей пищевода

О.В. Ковалева¹, В.В. Мочальникова¹, И.Б. Зборовская¹, А.А. Петренко¹, Д.Д. Ромашин², А.Н. Грачев¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²биологический факультет ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Введение. Рак пищевода находится на 6-м месте по смертности среди злокачественных опухолевых заболеваний. В отличие от многих других типов опухолей механизмы развития рака пищевода не сегодняшний день изучены слабо. Анализ микробного сообщества, ассоциированного со злокачественными опухолями пищевода, позволит выявить специфичные микроорганизмы и изучить их влияние на патогенез заболевания. Кроме этого, изучение микробиома опухолей пищевода позволит выявить микроорганизмы, являющиеся маркерами развития, прогноза и ответа на терапию данного онкологического заболевания.

Цель исследования — изучение таксономического состава микробиома опухолевой и условно нормальной ткани пищевода.

Материалы и методы. Образцы тканей рака пищевода, а также соответствующих морфологически нормальных тканей были получены от пациентов, оперированных в 2008–2014 гг. по поводу рака пищевода в НИИ КО НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина. Секвенирование гена *16S rRNA* проводилось на оборудовании ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внеклеточного симбиоза УрО РАН. Визуализация и анализ полученных результатов проводились с помощью открытого ресурса MicrobiomeAnalyst.

Результаты. Подавляющее количество бактерий пищевода относится к 6 типам: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria* и *Bacteroides*. Самое значимое отличие наблюдается для типа *Proteobacteria* (в условно нормальной ткани таких микроорганизмов содержится 25 %, в образцах опухолей — 2 %). При анализе альфа-разнообразия наблюдается тенденция к повышению индекса Шеннона в опухолях пищевода. Анализ бета-разнообразия не выявил значимых отличий между образцами. Самыми отличающимися родами оказались *Corynebacterium* и *Rothia* (наблюдается тенденция к повышению бактерий родов *Corynebacterium* и *Rothia* в опухолевой ткани пищевода).

Заключение. Проведенный анализ выявил различия микробных сообществ опухолей пищевода и условно нормальной ткани, однако для получения статистически значимых результатов необходимо увеличение выборки пациентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09069).

Поиск новых маркеров радиойодрезистентности

В.В. Конончук, Т.С. Калинина

ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН», Новосибирск

Рак щитовидной железы — самое распространенное эндокринное злокачественное новообразование. Наиболее распространенная форма РЩЖ — дифференцированный РЩЖ (ДРЩЖ), который возникает из фолликулярных клеток ЩЖ. Большинству пациентов с диагнозом ДРЩЖ показано оперативное лечение первичной опухоли, после которого назначается терапия радиоактивным йодом. Однако примерно у трети пациентов с метастатическим ДРЩЖ возникает резистентность к радионуклидной терапии. У этой группы пациентов 10-летняя выживаемость составляет всего 10 %, а средняя продолжительность жизни после выявления метастазов колеблется в диапазоне от 3 до 5 лет.

Цель исследования — поиск эффективных подходов к раннему прогнозированию радиойодрезистентности

(РЙР) дифференцированных злокачественных опухолей ЩЖ на основе измерения уровня экспрессии микроРНК и их генов-мишеней.

Работа проводилась с использованием клинического материала, полученного на базе VI онкологического отделения ГКБ № 1. Для поиска маркеров РЙР были отобраны гены, белковые продукты которых участвуют в обмене йода и синтезе тиреоидных гормонов: *SLC5A5*, *SLC26A4*, *TSHR*. Данные гены являются мишенями для miR-24, -221, -429. Для этих микроРНК были выбраны гены-мишени: *APAF1*, *PTEN*, *ITGA6*. Для оценки изменения уровней экспрессии микроРНК и их генов-мишеней применяли ПЦР в режиме реального времени, для оценки уровня и клеточной локализации белковых продуктов генов-мишеней проводилось ИГХ-исследование с флуоресцентной детекцией.

Было выявлено, что в качестве прогностических маркеров для раннего выявления РЙР могут выступать *PTEN* и *ITGA6*. Для фолликулярного РЩЖ наблюдалось значимое повышение в резистентных образцах относительно нерезистентных образцов уровня экспрессии *PTEN* — в 4,8 раза, *ITGA6* — в 9,1 раза. Для папиллярного РЩЖ наблюдалось значимое снижение в резистентных образцах относительно нерезистентных: *PTEN* — в 20 раз, *ITGA6* — в 3,1 раза. Результаты были подтверждены ИГХ. Таким образом, *PTEN* и *ITGA6* являются перспективными маркерами РЙР.

Исследование роли ядерных рецепторов (AR, ER, PGR) и регулирующих их микроРНК в патогенезе новообразований щитовидной железы

В.В. Конончук, С.Э. Субботина, Т.С. Калинина

ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН», Новосибирск

Рак щитовидной железы является наиболее распространенным из эндокринных злокачественных новообразований. Несмотря на то, что РЩЖ занимает относительно скромное место (1–2 %) в общей структуре злокачественных опухолей, проблемы его патогенеза чрезвычайно актуальны. Особенно в последние десятилетия в связи с тенденцией роста встречаемости этого заболевания. Прирост злокачественных новообразований ЩЖ на 100 тыс. населения с 2004 г. (4,32) по 2014 г. (5,07) составил 13,11 %, среднегодовой темп прироста — 1,22 %. РЩЖ значительно чаще встречается у женщин (соотношение женщины : мужчины — 5 : 1). Несмотря на это, новообразования ЩЖ не принято относить к гормонозависимым. Поэтому роль ядерных рецепторов (AR, ER, PGR) в патогенезе данных заболеваний является малоизученной.

Учитывая имеющиеся данные о вовлеченности стероидных рецепторов и микроРНК в процессы

канцерогенеза, можно предположить, что в прогрессировании РЩЖ существенную роль могут играть микроРНК, регулируемые AR, ER и PgR, или микроРНК, регулирующие экспрессию этих рецепторов. Исследование экспрессии таких микроРНК позволит выявить как новые механизмы прогрессирования РЩЖ, так и маркеры данного заболевания с возможностью их использования в клиниках.

В исследовании проводилась работа с клиническим материалом, полученным на базе VI онкологического отделения ГКБ № 1 г. Новосибирска. С помощью ПЦР в режиме реального времени мы оценили изменение уровней экспрессии генов ядерных рецепторов (AR, ER и PgR) в образцах различных фенотипов РЩЖ, а также регулирующих их микроРНК (miR-19b, -22, -181a, -185, -193b, -205, -221, -222, -378).

Для фолликулярного РЩЖ выявлено значимое понижение уровня экспрессии генов всех исследуемых рецепторов. Для ПРЩЖ наблюдалось значимое повышение уровня экспрессии ER, для AR и PgR характерна смещенная картина.

Таким образом, из полученных данных можно предположить, что при ПРЩЖ более выражена связь исследуемых рецепторов с процессами канцерогенеза по сравнению с ФРЩЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-415-543010/19).

Влияние молекулярного подтипа плоскоклеточного рака пищевода на выживаемость больных

Д.С. Кутилин, О.И. Кит, А.Ю. Максимов, Е.Н. Колесников
ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Плоскоклеточный рак пищевода (ПРП) представляет собой группу гетерогенных опухолей с различным прогнозом, не зависящим от клинических сигнатур. В настоящее время выявлены различные молекулярные подтипы ПРП, отличающиеся в разных популяциях, однако подобные исследования не проводились на популяции юга России

Цель исследования — молекулярное типирование ПРП пациентов юга России, а также оценка общей выживаемости больных с учетом молекулярного подтипа опухоли.

Материалы и методы. Для исследования использовали срезы тканей из FFPE-блоков 124 пациентов с ПРП. Опухолевые и нормальные клетки выделяли с помощью лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом (Palm MicroBeam, Carl Zeiss). Для молекулярного типирования ПРП проводили определение относительной копийности (CNV) 8 генов (*CUL3*, *ATG7*, *SOX2*, *TP63*, *YAP1*, *VGLL4*, *CDK6*, *KDM6A*) методом количественной ПЦР в реальном времени

и 7 полиморфизмов (SNP) (*NFE2L2* (с.85G>A), *NOTCH1* (с.1379C>T), *NOTCH1* (с.1451G>T), *ZNF750* (с.414C>A), *ZNF750* (с.1621G>A), *SMARCA4* (р.Q758*, с.2272C>T), *KMT2D* (Q5170*, с.15508C>T)) методом прямого секвенирования по Сэнгеру. Оценку различий по CNV проводили с использованием критерия Манна—Уитни. Для кластерного анализа (Hierarchical Clustering, Euclidean distance) использовали Morpheus (Broad Institute). Выживаемость больных анализировали методом Каплана—Майера, для оценки различий выживаемости между группами использовали *log-rank*-тест.

Результаты. Кластерный анализ позволил выделить 3 группы образцов ПРП, отличающиеся по копийности генов ($p < 0,005$): в 1-й ($n = 39$) повышена копийность генов *SOX2*, *TP63*, *YAP1* и понижена копийность генов *CUL3*, *ATG7* и *VGLL4*, во 2-й ($n = 82$) повышена копийность *CDK6* и понижена копийность *KDM6A*, в 3-й ($n = 3$) понижена копийность *ATG7*. В образцах 1-й группы обнаружен полиморфизм с.85G>A в гене *NFE2L2*, 2-й группы — полиморфизмы с.1379C>T и с.1451G>T в *NOTCH1*, полиморфизмы с.414C>A и с.1621G>A в *ZNF750*, 3-й группы — полиморфизмы р.Q758* и Q5170* в *SMARCA4* и *KMT2D* соответственно. Таким образом, было дифференцировано 3 молекулярных подтипа ПРП: ESCC-1, -2 и -3. Более высокие показатели общей выживаемости наблюдались у пациентов при ESCC2 ($16,1 \pm 2,0$ мес), а самые низкие — при ESCC3 ($0,88 \pm 0,56$ мес), промежуточные значения выживаемости — при ESCC1 ($4,60 \pm 0,74$ мес). Различия между группами были статистически значимыми ($p = 0,00001$).

Заключение. На основании дифференциальных отличий по SNP и CNV генов было верифицировано 3 молекулярных подтипа ПРП, отличающихся по общей выживаемости больных.

Перестройки *KMT2a* с включением фрагментов интронов в мРНК: описание трех случаев

С.А. Лебедева¹, Е.А. Зеркаленкова¹, А.Ю. Комков^{1,2},
Н.М. Тимофеева¹, О.И. Солдаткина¹, И.И. Калинина¹,
М.А. Масчан¹, А.А. Масчан¹, Г.А. Новичкова¹,
Ю.В. Ольшанская¹

¹ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Введение. Перестройки гена *KMT2A* (lysine methyltransferase 2A, ранее — *MLL*), локализованного в регионе 11q23.3, ассоциированы с развитием острого лейкоза (ОЛ) преимущественно у детей. Данные перестройки могут служить удобным маркером для дальнейшего мониторинга минимальной остаточной болезни (МОБ).

Одним из частых методов, применяемых для контроля МОБ, является ОТ-ПЦР. Однако в некоторых случаях детекция перестроек *KMT2A* методом ОТ-ПЦР может быть затруднена.

Материалы и методы. В данной работе мы приводим 3 случая ОЛ с перестройками 11q23.3 у девочек. Всем пациенткам проводили стандартное кариотипирование методом G-banding и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием ДНК-зонда на разрыв *KMT2A*, а также ДНК-зондов к 4 частым транслокациям *KMT2A*. Природу партнера гена *KMT2A* определяли мультиплексной ОТ-ПЦР на 8 наиболее частых генах-партнерах, а также якорной мультиплексной ПЦР с последующим секвенированием нового поколения (NGS).

Результаты. У всех пациенток была найдена перестройка 11q23.3 в кариотипе, перестройка *KMT2A* была подтверждена методом FISH. У двух пациенток было обнаружено вовлечение в перестройку частых генов-партнеров *MLLT3* и *ELL*. В то же время мультиплексная ОТ-ПЦР продемонстрировала отрицательные результаты во всех 3 случаях.

Дальнейшие исследования методом якорной мультиплексной ПЦР показали, что у данных пациенток в матричной РНК (мРНК) наблюдалось включение фрагментов интронов одного из перестраивающихся генов. Химерные транскрипты имели следующий состав: *KMT2A* экз. 9 + *KMT2A* интр. 9 (часть) + *MLLT3* экз. 7 (часть) + *MLLT3* экз. 8 у пациентки с острым миелоидным лейкозом М5а, *KMT2A* экз. 14 (part) + *ELL* интр. 4 (часть) + *ELL* экз. 5 у пациентки с недифференцированным ОЛ. Нами также был описан случай ОЛ с редким вариантом перестройки *KMT2A* (химерный транскрипт *KMT2A-GAS7*) с включением фрагмента интрона гена *GAS7* в мРНК.

Включение фрагментов интронов в мРНК обусловлено такой особенностью механизма транслокации, как образование химерного экзона. Как правило, хромосомные транслокации происходят в интронах перестраивающихся генов, однако в описанных случаях рекомбинация произошла между экзоном и интроном перестраивающихся генов. Это привело к потере одного из канонических сплайс-сайтов и экзонизации фрагмента интрона.

Удлинение продукта ПЦР привело к необходимости либо изменять протокол ПЦР (добавочная элонгация в случае пациентки с *KMT2A-MLLT3*), либо проводить подбор пациент-специфических праймеров для валидации и последующей детекции МОБ.

Заключение. Перестройки гена *KMT2A* представляют собой весьма гетерогенную группу. Такое генетическое разнообразие может затруднять определение МОБ в процессе терапии. При *KMT2A*-позитивных ОЛ дискордантные результаты цитогенетических и молекулярно-генетических методов исследования могут быть обусловлены включением фрагментов интронов в мРНК химерных транскриптов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-29-06052).

Анализ aberrаций числа копий ДНК генов NF-κB семейства в опухолях молочной железы: связь с эффектом предоперационной химиотерапии и прогнозом заболевания

А.М. Певзнер, М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова,
Н.В. Литвяков

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Семейство NF-κB/Rel включает в себя гены *Rel* (*c-Rel*), *RelA* (*p65*), *RelB*, *NF-κB1* и *NF-κB2*. Основная функция данного семейства заключается в быстром перепрограммировании экспрессии большого набора генов. Кроме этого, *NF-κB1* вовлечен в ингибирование апоптоза, стимуляцию ангиогенеза, метастазирование, повышение выживаемости клеток и пролиферативную активность. ДНК-повреждающие агенты запускают атипичный путь активации NF-κB, повышая жизнеспособность опухолевых клеток. Интересным представляется исследование CNA-статуса данных генов и влияния хромосомных aberrаций на эффективность лечения и прогноза у больных РМЖ.

Цель исследования — оценка предиктивной и прогностической значимости делеций и амплификаций генов семейства NF-κB.

Материалы и методы. Обследован 81 больной РМЖ (IIA—IIIB) с люминальным B-подтипом. Больные получали 2–8 курсов НХТ по схемам FAC, CAH или монотерапию таксотером. Далее проводились операция и адъювантная ХТ. Для анализа CNA выполняли микроматричный анализ на ДНК-чипах.

Результаты. Наибольшая частота хромосомных aberrаций (28/81 пациент) наблюдалась в гене *NF-κB2*, в то время как ген *RelB* был меньше всего подвергнут хромосомным изменениям (11/81 пациент). При изучении связи CNA исследуемых генов с эффектом НХТ в общей группе больных не было показано статистически значимых различий. Однако у пациентов с объективным ответом на таксотер наличие нормального состояния гена *RelA* отмечается в 76 % (19/25) случаев, а в группе с плохим ответом на НХТ нормальное состояние гена отмечается только в 29 % (2/7) случаев ($p = 0,03$). Аналогичный результат бы показан для гена *RelB* — 92 % (23/25) пациентов с объективным ответом против 4/7 случаев в группе со стабилизацией ($p = 0,04$). Оценка прогностической значимости показала, что на уровне тенденции нормальное состояние гена *RelA* ($p = 0,08$) и делеция *c-Rel* ($p = 0,1$) связаны с более высокими показателями безметастатической выживаемости больных РМЖ.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о возможной предиктивной и прогностической значимости исследуемых генов. Несмотря на широкие исследования семейства генов NF-κB/Rel, их клиническая значимость до конца остается неясной, что, несомненно,

требует дальнейших, более масштабных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 19-75-00027).

Ассоциация аномального метилирования и экспрессии группы генов и микроРНК с показателями прогрессирования и иммуногистохимического статуса рака молочной железы

Е.А. Филиппова¹, И.В. Пронина¹, А.М. Бурденный¹,
Т.П. Казубская², С.С. Лукина³, А.В. Смирнова³,
В.И. Логинов^{1,4}, Э.А. Брага^{1,4}

¹ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

³ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России, Москва;

⁴ФГБНУ «Медико-генетический научный центр
им. акад. Н.П. Бочкова», Москва

Ранее нами была выявлена значимая корреляция между уровнями метилирования и экспрессии для группы белоккодирующих генов и потенциально регуляторных микроРНК в клинических образцах РМЖ, что подтвердило функциональную роль aberrантного метилирования в регуляции генов (Prонина и соавт., *Gene* 2016, 2017). Данное исследование направлено на определение связи между наблюдаемыми изменениями метилирования и экспрессии группы апоптоз-ассоциированных белоккодирующих генов и регуляторных микроРНК с клинико-морфологическими показателями прогрессирования РМЖ и показателями ИГХ-статуса опухоли (экспрессия ER, PR, Her2/neu, Ki67).

Показано значимое увеличение уровня метилирования белоккодирующих генов (*RASSF1A*, *DAPK1*, *BIM*, *BAX*, *APAF1A*, *BCL2*) и микроРНК (*MIR-124-1*, *-127*, *-129-2*) на III–IV стадиях по сравнению с I–II ($p < 0,05$); *RASSF1A*, *DAPK1*, *BIM*, *BAX*, *APAF1A* и *MIR-127* — с увеличением размера опухоли (T1/T2 против T3/T4, $p < 0,05$); *RASSF1A*, *BIM*, *BAX* и *MIR-124a-1/3*, *-125b-1*, *-127* — с наличием метастазов (N0M0 против NxMx, $p < 0,05$); *MIR-124a-2* — со снижением степени дифференцировки (G_1/G_2 против G_3/G_4 , $p = 0,01$). Установлено статистически значимое увеличение уровня метилирования генов *BIM* и *BAX* ($p = 0,01$, FDR = 0,05 и $p = 0,04$, FDR = 0,1, критерий Манна–Уитни для независимых выборок) в опухолях, не чувствительных к гормонотерапии (с потерей рецептора прогестерона, PgR⁻), а также при промежуточном и высоком уровне экспрессии антигена Ki67 ($p = 0,04$, критерий Краскела–Уоллиса для независимых выборок). Обнаружено значимое снижение уровня экспрессии miR-148a-3p

при наличии метастазов (N0M0 против NxMx, $p = 0,02$). Выявлено значимое снижение уровня экспрессии *DAPK1* при отрицательном Her2/neu (Her2neu⁻ против Her2neu⁺, $p = 0,012$), снижение уровня miR-375 в опухолях, не экспрессирующих прогестероновый рецептор (PgR⁻), а также увеличение уровня экспрессии miR-375 в опухолях с высоким уровнем экспрессии антигена Ki67.

Таким образом, выявлены гены и микроРНК, аномальное метилирование и/или экспрессия которых ассоциированы с клинико-морфологическими показателями прогрессирования РМЖ и/или с показателями ИГХ-статуса опухоли, а именно гормональной зависимости (Her2/neu и PR) и пролиферации (Ki67). Эти данные важны для понимания механизмов генеза РМЖ и могут быть использованы для оценки уровня прогрессирования рака и в дифференциальной диагностике подтипов РМЖ.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 0520-2019-0030 и проекта РФФИ № 18-315-00311 мол-а.

Однонуклеотидные полиморфизмы и экспрессия печенъ-специфических генов в нормальной и опухолевой ткани при гепатоцеллюлярной карциноме

П.А. Хесина^{1,2}, Э.М. Радкевич^{1,2}, Н.А. Дьякова¹,
Н.Л. Лазаревич^{1,2}, О.М. Кривцова¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Факторами риска развития гепатоцеллюлярной карциномы (ГК) наряду с инфекцией вирусами гепатита В и С являются неалкогольная жировая дистрофия, алкогольная болезнь печени, диабет, дефицит альфа-1-антитрипсина, гемохроматоз, порфирия и др. (Лазаревич и соавт., 2016).

В результате анализа данных транскриптомного секвенирования 45 пар образцов неопухолевой ткани печени и ГК, не ассоциированной с HBV и HCV, среди пациентов с ГК были выявлены носители известных и потенциально патогенных однонуклеотидных герминативных вариантов в печенъ-специфических генах. Так, ассоциированный с развитием гемохроматоза вариант rs1799945 в гене *HFE* был обнаружен в гетерозиготном состоянии у 22 % пациентов выборки; в половине случаев содержащий его аллель экспрессировался на более высоком уровне по сравнению с референсным. У 1 из пациентов был выявлен патогенный аллель в гене *ALAD*, связанный с развитием острой порфирии, у 2 — аллели генов *CYP7B1* и *LDLR*, ассоциированные с развитием аутоиммунного гепатита, у 1 — аллель гена *ACADM*,

при наличии которого в некоторых случаях, по данным OMIM, может развиваться стеатоз печени.

Кроме того, среди печень-специфических генов были выявлены подгруппы генов, часто проявляющих аллель-специфическую экспрессию в неопухолевой ткани печени и ГК, а также преимущественно в ГК. К таким генам относятся: *ADH4*, участвующий в метаболизме этанола и ретинола, *APOC4*, участвующий в метаболизме липопротеинов, который расположен в дифференциально метилированном районе и часто гиперметилирован у японских и американских пациентов с неалкогольной жировой дистрофией печени (Hotta K. и соавт., 2018), *SERPINA1*, кодирующий α_1 -антитрипсин, *SERPINA6*, кодирующий кортикостероид-связывающий белок, связанный с воспалением, развитием устойчивости к инсулину и ожирением, и др. В отношении этих генов среди выявленных однонуклеотидных полиморфизмов был проведен поиск тканеспецифичных дисрегуляторных вариантов по базе данных консорциума GTEx, а также на основе ранее полученных нами данных об аллель-специфической экспрессии — сопоставлены вариативность уровней экспрессии этих генов в печени здоровых индивидов по сравнению с ГК и прилежащей неопухолевой тканью печени для идентификации пациентов с функционально значимыми дисрегуляторными полиморфизмами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-34-00816).

Различные механизмы регуляции экспрессии эстрогеновых рецепторов α и β фитоэстрогенами генистеином и апигенином в клетках рака молочной железы

Е.А. Шестакова, А.М. Щербаков, Т.А. Богущ

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Фитоэстрогены, вещества растительного происхождения, вызывают эстрогенные и антиэстрогенные эффекты благодаря своему структурному сходству с 17β -эстрадиолом (E2). По сравнению с E2 фитоэстрогены имеют меньшее сродство к эстрогеновым рецепторам α и β (ЭР α и ЭР β). Фитоэстрогены проявляют большее сродство к ЭР β , чем к ЭР α , что предполагает различные механизмы регуляции ЭР α и ЭР β фитоэстрогенами и объясняет тканеспецифичность их действия.

С целью изучения механизмов регуляции экспрессии ЭР α и ЭР β фитоэстрогенами проанализированы эффекты 2 фитоэстрогенов с различной структурой, изофлавона генистеина и флавона апигенина, на экспрессию ЭР α и ЭР β в клетках гормонозависимого РМЖ линии MCF7.

Материалы и методы. Клетки РМЖ линии MCF7 инкубировали с генистеином и апигенином. Для количественной оценки экспрессии ЭР α и ЭР β применяли иммуофлуоресцентный метод, ассоциированный с проточной цитофлуориметрией. Использовали антитела, специфичные к ЭР α и ЭР β , вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом DyLight 650, и проточный цитофлуориметр Navios. Параметры экспрессии маркеров (интенсивность и уровень) определяли с использованием программы FlowJo и статистического метода Колмогорова—Смирнова.

Результаты. 1. Генистеин в концентрации 15 и 30 мкМ уменьшал интенсивность экспрессии ЭР α в 2,5 и 4,6 раза соответственно, при этом апигенин в тех же концентрациях снижал интенсивность экспрессии ЭР α в 3,1 и 4,0 раза соответственно. 2. Генистеин и апигенин в концентрации 15 и 30 мкМ вызывали также изменения в уровне экспрессии ЭР α (уменьшение уровня экспрессии маркера в 1,5; 1,6 раза и в 1,3; 1,5 раза соответственно). 3. При инкубации с генистеином в концентрациях 7,5, 15, 30 мкМ интенсивность экспрессии ЭР β увеличивалась в 1,6; 1,3; 1,7 раза соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации генистеина до 60 мкМ не приводило к изменениям интенсивности экспрессии ЭР β . При воздействии генистеина в таких же концентрациях интенсивность экспрессии ЭР α , напротив, уменьшалась в 1,4; 1,3; 1,4 и 1,9 раза соответственно. 4. Инкубация с генистеином не вызывала значительных изменений уровня экспрессии ЭР β .

Заключение. Полученные данные показали, что фитоэстроген генистеин оказывал различные эффекты на экспрессию двух маркеров пролиферации клеток, ЭР α и ЭР β . Генистеин стимулировал экспрессию ЭР β , при этом уменьшая экспрессию ЭР α в клетках РМЖ линии MCF7. Апигенин также уменьшал экспрессию ЭР α в клетках этой линии. Полученные результаты позволяют предположить несколько механизмов функционирования исследованных фитоэстрогенов, включая эпигенетическую регуляцию экспрессии генов, а также ассоциированную с транскрипцией протеасом-зависимую деградацию рецептора, и открывают перспективы их дальнейшего изучения в клетках РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09017).

Тезисы

Анализ длины теломер у больных аденокарциномой легкого

М.Л. Баканова¹, Ф.О. Смагулова², В.И. Минина^{1,3},
Я.А. Савченко¹, В.А. Титов⁴, В.Г. Дружинин³

¹ФГБУН «Институт экологии человека СО РАН», Кемерово;

²Research Institute for Environmental and Occupational Health
Irset — Inserm, Ренн, Франция;

³ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»,
Кемерово;

⁴ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», Кемерово

Рак легкого является наиболее распространенной формой рака во всем мире, одним из основных гистологических типов которого является аденокарцинома. Изучение наследственной предрасположенности к формированию рака легкого стало в последние годы предметом широкомасштабных исследований. Активно обсуждается роль длины теломер в лейкоцитах в связи с возраст-зависимыми заболеваниями и повышением риска рака. Показано, что размер теломер определяется как генетическими (унаследованный диапазон), так и средовыми факторами (воспаление, окислительный стресс и др.). Результаты исследований длины теломер у больных различными формами рака пока противоречивы.

Цель исследования — анализ относительной длины теломер у больных аденокарциномой.

Биологический материал (кровь) забирался в 1-й день обращения в онкологический диспансер — до начала любых диагностических или лечебных мероприятий. По результатам диагностики позднее было отобрано 17 человек с диагнозом аденокарциномы (средний возраст — 61 год). В качестве группы сравнения (контроль) были обследованы 17 жителей той же местности (Кемеровская область), близкого возраста (средний возраст — 60 лет), не имеющих хронических заболеваний и признаков онкопатологии.

Длина теломерных участков ДНК оценивалась при помощи количественной ПЦР с детекцией результата в режиме реального времени с флуоресцентным красителем SYBR Green на амплификаторе CFX384 Real-Time System (Bio-Rad, США). В качестве референсного гена был использован ген *RPLPO*.

В результате проведенного исследования было установлено, что относительная длина теломер в клетках крови больных аденокарциномой статистически значимо больше, чем у здоровых индивидов ($25,85 \pm 3,48$ против $13,32 \pm 1,42$; $p = 0,001$). Наибольшие различия с контролем наблюдались у больных аденокарциномой, имеющих метастазы в отдаленные органы ($30,36 \pm 6,61$; $p = 0,010371$). Это согласуется с результатами недавних исследований,

согласно которым в клетках крови у больных солидными опухолями может наблюдаться как укорочение, так и удлинение теломер (McNally и соавт., 2019). Таким образом, полученные предварительные данные демонстрируют ярко выраженную взаимосвязь между аденокарциномой и длиной теломер и иллюстрируют широко описанный Telomere Length Paradox. Дальнейшее увеличение объема выборки, дифференциация групп в зависимости от множества потенциальных конфаундеров позволят лучше понять специфику выявленной взаимосвязи.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания № ГЗ 0352-2019-0011.

Применение технологии таргетного секвенирования для идентификации новых мутаций при наследственном раке яичников

Я.В. Валова^{1,2}, Э.Ф. Муллагалеева¹, Э.Т. Мингажева¹,
А.Х. Нурғалиева¹, Д.С. Прокофьева¹, Р.Р. Фаисханова³,
Э.К. Хуснутдинова^{1,4}

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»,
Уфа;

²ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека»,
Уфа;

³ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический
диспансер», Уфа;

⁴ОСП ФГБНУ УФИЦ РАН «Институт биохимии и генетики»,
Уфа

Во многих странах, включая Россию, РЯ занимает 6-е ранговое место среди злокачественных новообразований у женщин всех возрастных групп. Несмотря на достигнутые успехи в диагностике карциномы яичников, около 75 % ее выявляется на поздних стадиях, когда общая 5-летняя выживаемость не превышает 40 %. В связи с этим разработка и усовершенствование методов ранней диагностики РЯ являются одной из приоритетных задач онкогинекологии.

Наследственный РЯ охватывает до 24 % случаев РЯ и включает критические пути репарации ДНК, которые представляют собой уникальные онкогенные мишени для новых методов лечения. Наиболее известными молекулярными маркерами РЯ и РМЖ на сегодняшний день являются герминальные мутации в генах *BRCA1/2*. Однако для лучшего понимания механизмов, лежащих в основе развития злокачественных новообразований яичников, а также для разработки новых подходов к ранней диагностике и персонализации лечения необходимо проводить поиск новых молекулярных маркеров данной формы онкопатологии. На сегодняшний день

одними из современных методов для решения подобных задач являются технологии секвенирования нового поколения (NGS), обладающие возможностью массового параллельного анализа миллионов ДНК-матриц.

Цель исследования — поиск новых генетических маркеров, ассоциированных с риском развития наследственного РЯ, с помощью технологии таргетного NGS-секвенирования.

В качестве материала исследования были использованы образцы ДНК, выделенные из венозной крови больных наследственными формами РЯ ($n = 48$). Поиск мутаций проводился посредством высокопроизводительного таргетного секвенирования на платформе Illumina MiSeq. При этом целевому обогащению с использованием кастомной панели праймеров AmpliSeq подвергались белоккодирующие и прилегающие к ним UTR-регионы для 21 известного гена-кандидата РЯ: *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *STK11*, *TP53*. При отборе потенциальных маркеров учитывались тип мутации, популяционная частота, а также наличие сведений о патогенности.

В результате биоинформатического анализа было выявлено в среднем 170 изменений нуклеотидной последовательности на один образец. Нами были отобраны 9 вариантов, являющихся потенциально патогенными, из которых 1 ранее не был описан в литературе, 14 вариантов с противоречивой интерпретацией патогенности и 24 неизвестных варианта. Впервые выявленные варианты будут подтверждены прямым секвенированием по Сэнгеру. Дальнейшие исследования на расширенных выборках больных РЯ и здоровых доноров из Республики Башкортостан будут способствовать установлению частот встречаемости отобранных вариантов и позволят проанализировать их участие в патогенезе наследственного РЯ.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО.

Работа выполнена в рамках гранта Республики Башкортостан от 05.02.2019 № УТ-28 и проекта РФФИ № 18-29-09129 для государственной поддержки молодых ученых; при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по проекту № 2019-0587.

Распространенность BRCA-ассоциированного рака молочной железы в г. Москве

А.В. Висковатых

ФГБУ «ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА», Москва

Введение. Рак молочной железы на протяжении многих лет сохраняет 1-е место в структуре онкологических заболеваний среди женщин и составляет 21 %

от общего числа впервые выявленных случаев злокачественных опухолей. С момента открытия генов *BRCA* наибольшее внимание исследователей привлекают наследственный рак, его распространенность, профилактика, диагностика, лечение. Часто встречающиеся в литературе данные о распространенности РМЖ являются разнородными, в некоторой степени противоречивыми, отсутствует объективная оценка этого показателя на территории России или в каком-либо ее регионе.

Цель исследования — оценка распространенности *BRCA*-ассоциированного РМЖ и вероятности возникновения sporadического РМЖ в г. Москве среди женщин.

Материалы и методы. Исследование основывается на анализе публикаций различными авторами результатов генетических исследований по выявлению мутаций в генах *BRCA* и применении байесовского подхода. Проведен поиск источников в базе данных E-library в период с 2010 по март 2019 г. с использованием следующих ключевых слов: «рак молочной железы»/breast cancer, «наследственный рак молочной железы»/hereditary breast cancer, «*BRCA1*» и «*BRCA2*», «генетическое исследование при раке молочной железы»/genetic research in breast cancer, «распространенность *BRCA* рака молочной железы»/prevalence of *BRCA* breast cancer, «метод Байеса»/Bayes method. Для анализа отобраны 13 оригинальных исследовательских работ и 8 обзоров литературы по изучению наследственного РМЖ на территории России, Республики Беларусь и Украины.

Результаты. Распространенность *BRCA1*-ассоциированного РМЖ в Москве составляет около 0,037 % в женской популяции и 3,45 % среди женщин с диагнозом РМЖ. Общепопуляционная распространенность наиболее часто встречающихся мутаций гена *BRCA1* (мутации 5382insC, 185delAG, 300T>G, 2080delA, 3819delGTAAA, 4153delA) среди женского населения по г. Москве составляет около 0,05 %, соответственно, около 0,1 % — среди всего населения. Вероятность возникновения sporadического РМЖ в женской популяции без каких-либо генных доминантных мутаций, ассоциированных с РМЖ, составляет около 1 %. В рамках данной модели установлено, что около 98,5 % женского населения г. Москвы не имеют каких-либо мутаций в геноме, приводящих к РМЖ.

Заключение. Впервые для анализа распространенности мутаций в генах, ассоциированных с РМЖ, применен байесовский метод. Полученные данные о распространенности мутаций в *BRCA1* среди когорты женщин с диагнозом РМЖ хорошо согласуются с аналогичными данными, полученными на территории Белгородского (3,2 %), Сибирского (3,5 %) регионов и Гродненской области Республики Беларусь (3,8 %). Говорить о распространенности РМЖ можно лишь в контексте распространенности конкретных мутаций, определенных методов исследования и конкретной популяции.

Аберрантная копияность генетических локусов сигнального каскада EGFR в опухолевых тканях толстой кишки с диким типом генов *KRAS* и *NRAS*

Д.И. Водолажский¹, Г.В. Гудков^{1,2}, Е.Ф. Филиппов²,
Л.Г. Дряева³, Д.В. Крутенко¹

¹ГБУЗ «Детская городская клиническая больница
г. Краснодара», Краснодар;

²кафедра клинической иммунологии, аллергологии и лабора-
торной диагностики ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Кубанский
государственный медицинский университет»
Минздрава России, Краснодар;

³ГБУЗ «Краевая клиническая больница №2», Краснодар

Исследование молекулярно-генетического статуса компонентов сигнального пути EGFR имеет важное значение при терапии онкологических заболеваний. Изменение количества копий генов (CNV), проявляемое в виде гиперфункции этих генов, может служить причиной развития онкологических заболеваний. Для многих видов злокачественных опухолей характерно более высокое число копий онкогена, что ассоциируется с их большей агрессивностью. Аналогичные эффекты аберрантного количества копий других генов сигнального пути EGFR могут существенно изменить эффективность терапевтических подходов при лечении онкологических заболеваний: ХТ, таргетной или радиационной терапии. В рамках решения этой задачи было проведено сравнительное исследование CNV генов сигнального каскада EGFR у пациентов мужского и женского пола, имеющих злокачественные опухоли толстой кишки и характеризующихся отсутствием активирующих мутаций в генах *KRAS* и *NRAS*. Пациенты данной группы представляли особый интерес в связи с тем, что отсутствие активирующих мутаций в этих генах является предиктивным показателем для проведения таргетной терапии опухолей.

В данное исследование включен материал, полученный от 14 пациентов (мужчины и женщины), имевших злокачественные опухоли (аденокарцинома) толстого кишечника, проходивших плановое лечение в ГБУЗ «Краевая клиническая больница №2» Минздрава Краснодарского края (г. Краснодар). Полученные образцы ДНК проходили молекулярно-генетический скрининг на предмет отсутствия активирующих соматических мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* методом ПЦР в реальном времени.

Методом Droplet Digital ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, США) проводили оценку относительной копияности генов *EGFR*, *MAPK1*, *MAPK3*, *AP3B1*, *AKT2*, *KRAS*, *NRAS*, *HRAS*, *BRAF*, *cRAF* и *aRAF*. В качестве референсных генов использовали гены *ACTB* и *EIF2C1*. Расчет изменения относительной копияности

в опухолевой ткани дифференцированно для пациентов мужского и женского пола производили в сравнении с аналогичными показателями операционных биоптатов условно здоровых тканей (линия резекции).

Результаты нашего исследования наглядно продемонстрировали отсутствие значимых изменений показателей копияности между условно здоровой и опухолевой тканями у пациентов мужского пола, имеющих статус WT RAS. У пациенток женского пола, имеющих статус опухолевой ткани WT RAS, наблюдалось выраженное увеличение копияности генетических локусов *MAPK3*, *AP3B1*, *KRAS*, *NRAS* и *bRAF*. Не исключена пониженная эффективность применения таргетных препаратов для пациентов, имеющих повышенные показатели CNV (гиперфункция) для этих генетических локусов.

Результаты демонстрируют гендерные различия в показателях CNV опухолевых тканей и могут иметь прогностическое значение при планировании таргетной терапии злокачественных новообразований.

Циркулирующая длинная некодирующая РНК MALAT1 как потенциальный биомаркер при раке яичников

С.О. Генинг^{1,2}, Д.Р. Долгова¹, Т.В. Абакумова¹,
И.И. Антонова^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»,
Ульяновск;

²ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер»,
Ульяновск

MALAT1 был одной из первых длинных некодирующих РНК (lncRNA), ассоциированных с опухолями (Heery R., 2017). При этом ее гиперэкспрессия в опухолевой ткани повышает риск метастазирования при аденокарциноме легкого (Li P., 2003). Показана роль MALAT1 в активации эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) при раке мочевого пузыря, шейки матки (РШМ), поджелудочной железы (Hirata H., 2015; Yinq L., 2012). Влияние MALAT1 на EMT при РМЖ спорно (Xu S., 2015). На клеточной культуре РЯ нокдаун MALAT1 уменьшал пролиферацию, инвазию и способность к росту без подложки (Gordon M.A., 2019).

Цель исследования — оценить уровень свободно циркулирующей lncRNA MALAT1 в качестве потенциального биомаркера при РЯ. В плазме крови 34 больных с верифицированным РЯ на III–IV стадии по FIGO до начала лечения и после 3 курсов НХТ по схеме «паклитаксел + цисплатин» выделяли свободно циркулирующую РНК с использованием магнитных частиц SileksMagNA-Direct. Уровень нормализованной экспрессии lncRNA MALAT1 оценивали методом количественной ПЦР. Для статистического анализа использовали критерий ANOVA (Statistica 13.0).

Установлено, что уровень MALAT1 достоверно выше в плазме больных РЯ на III и IV клинических стадиях в отличие от группы контроля (пациенты с доброкачественными опухолями яичников) — $0,914 \pm 0,193$ против $0,520 \pm 0,105$ ($p = 0,022$).

После 3 курсов НХТ экспрессия lncRNA MALAT1 в плазме больных возрастала. Показана зависимость уровня MALAT1 от возраста пациенток с РЯ: в группе больных РЯ старше 50 лет экспрессия ниже, чем у больных младше 50 лет ($p = 0,014$). Причем после проведения 3 курсов НХТ значения экспрессии MALAT1 значительно повышались именно в группе пациенток младше 50 лет. Уровень MALAT1 в плазме не был связан с сывороточным уровнем СА-125 до и после ХТ. В группе платинорефрактерных больных РЯ (прогрессирование на фоне ХТ или сразу после ее завершения) выявлялись более высокие значения lncRNA MALAT1 в сравнении с платиночувствительными пациентами — $1,396 \pm 0,340$ против $0,635 \pm 0,223$ ($p = 0,014$). Таким образом, lncRNA MALAT1 плазмы может рассматриваться как потенциальный биомаркер при РЯ, и исходно высокий уровень MALAT1 в плазме крови ассоциирован с неблагоприятным прогнозом НХТ при РЯ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-315-90011).

Поиск химерных транскриптов у пациентов с острым миелоидным лейкозом при нормальном кариотипе опухолевых клеток

Л.Г. Гукасян¹, Г.С. Краснов¹, О.В. Муравенко¹,
Л.В. Байдун², Т.В. Наседкина^{1,3}

¹ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

²РДКБ ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

³ЛРНЦ «Русское поле» ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Введение. Острый миелоидный лейкоз с нормальным кариотипом (ОМЛ-НК) является высокогетерогенной группой ОМЛ, характеризующейся отсутствием цитогенетических aberrаций при проведении стандартного кариотипирования. ОМЛ-НК представляет 20–25 % всех случаев ОМЛ у детей и относится в основном к подгруппе среднего риска, тогда как течение заболевания и клинический исход могут значительно варьировать у разных пациентов. Гетерогенность группы ОМЛ-НК может быть объяснена наличием криптических хромосомных перестроек, приводящих к образованию химерных транскриптов или драйверных соматических мутаций. Выявление генетических нарушений, ассоциированных с лейкемогенезом при ОМЛ-НК, может улучшить стратификацию пациентов и выбор терапии.

Цель исследования — оценить возможности анализа транскриптома (RNA-seq) как надежного подхода для идентификации повторяющихся криптических хромосомных перестроек, приводящих к слиянию генов, и клинически значимых мутаций при ОМЛ-НК у детей в одном исследовании.

Материалы и методы. В исследование были включены 11 случаев ОМЛ-НК у детей (средний возраст — 8,5 года). РНК выделяли из образцов костного мозга, взятых при диагностике, библиотеки для секвенирования готовили с использованием набора TruSeq RNA Library Prep Kit v2. Парно-концевое секвенирование кДНК (150bpх2) проводили с использованием платформы Illumina NextSeq500. Идентификация химерных транскриптов была выполнена с помощью программы STAR-Fusion. Профилирование мутаций проводили с использованием GATK HaplotypeCaller после маркирования дубликатов и повторной калибровки. Профили экспрессии генов были оценены с помощью featureCounts (пакет subread), а затем проанализированы с помощью edgeR. Наличие химерных транскриптов подтверждали с помощью ОТ-ПЦР и секвенирования по Сэнгеру.

Результаты. В общей сложности мы обнаружили 18 случаев слияния генов в 11 случаях ОМЛ-НК. Были идентифицированы 2 варианта слияния генов, приводящих к образованию химерных белков, а именно MYB-GATA1 ($n = 1$) и NUP98-NSD1 ($n = 3$). Также были обнаружены другие варианты химерных транскриптов, в частности AC005258.1-DAZAP1, ZNF292-PNRC1, EEF1A1-HBB, MALRD1-PLXDC2, ATP11A-ING1, но их роль в развитии заболевания требует дальнейшего изучения. Кроме того, у 5 пациентов (45 %) мы обнаружили химерный транскрипт PCAT18-KCTD1. Известно, что длинная некодирующая РНК PCAT18 сверхэкспрессируется при других формах рака, что свидетельствует о ее участии в онкогенезе. Шесть из 11 образцов содержали 1 из связанных с раком мутаций KRAS p.G13D ($n = 2$), NRAS p.G12D ($n = 1$), NRAS p.G13D ($n = 1$), PTPN11 p.Y63C ($n = 1$), NOTCH1 p.R1287C ($n = 1$). Образец с MYB-GATA1 содержал мутацию KRAS. В каждом из 3 NUP98-NSD1-положительных образцов была обнаружена по крайней мере 1 мутация в генах KRAS, NRAS или NOTCH1. MYB-GATA1-положительный образец обнаружил четко различимый профиль экспрессии, характеризующийся сверхэкспрессией генов, участвующих в IL6-опосредованной передаче сигналов и дифференцировке клеток. Образцы со слитым геном NUP98-NSD1 имели сходные паттерны с повышенной экспрессией генов, участвующих в окислительном фосфорилировании и гликолизе.

Заключение. Секвенирование всего транскриптома в сочетании с анализом экспрессии генов и мутационным профилированием дает важную информацию о патогенности онкогенных событий, происходящих при ОМЛ-НК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-15-00398).

Ген *SMAP1* как потенциальный ген-кандидат рака яичников

Р.К. Динова¹, А.Х. Нургалиева¹, Д.С. Прокофьева¹,
Э.Т. Мингажева¹, Н.В. Нургалиев¹, Я.В. Валова^{1,2},
Р.Р. Фаисханова³, Э.К. Хуснутдинова^{1,4}

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»,
Уфа;

²ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии
человека», Уфа;

³ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический
диспансер», Уфа;

⁴ОСП ФГБНУ УФИЦ РАН «Институт биохимии и генетики»,
Уфа

Рак яичников занимает ведущее место среди гинекологических раков у женщин. Ежегодно выявляется около 295 тыс. новых случаев злокачественных опухолей яичников и около 185 тыс. женщин умирают от данной болезни. К наиболее распространенным факторам риска РЯ относят генетическую (семейную) предрасположенность, бесплодие, возраст, образ жизни, воздействие окружающей среды. Высокий риск РЯ в первую очередь связан с мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*, белковые продукты которых являются ключевыми участниками сигнального пути клетки в ответ на воздействие ионизирующей радиации. Для лучшего понимания механизмов, лежащих в основе развития канцерогенеза яичников, необходимо проводить поиск новых генов-кандидатов. Весьма привлекательными методами для проведения подобных исследований являются технологии секвенирования нового поколения (NGS). Одной из широко применяемых технологий NGS является экзомное секвенирование.

Ранее в лаборатории кафедры генетики и фундаментальной медицины БашГУ было выполнено экзомное секвенирование 8 образцов ДНК, выделенных из венозной крови больных РЯ из Республики Башкортостан, что позволило выявить новые потенциальные гены-кандидаты РЯ.

К одному из множества генов-кандидатов РЯ относится ген *SMAP1*. Ген *SMAP1* расположен на длинном плече 6-й хромосомы (6q13), обладает ГТФазной активностью и может быть вовлечен в эритропоэз. Основные функции данного гена — участие в воспалительном процессе, взаимодействие с белком UBC, вовлеченным в репарацию ДНК.

По итогам экзомного секвенирования герминальных образцов ДНК у 1 пациентки в гене *SMAP1* нами была обнаружена делеция с.24delC (rs200042613), приводящая к сдвигу рамки считывания — p.N8fs. Установлено, что данный вариант является функционально значимым и патогенным.

По этнической принадлежности носительница исследуемого варианта является русской. В соответствии с клиническими данными у пациентки гранулезоклеточная опухоль в Ib стадии с поражением одного яичника.

Заболевание было выявлено в постменопаузальном периоде. В семье пациентки не наблюдались случаи заболевания РЯ и/или РМЖ.

Принимая во внимание важные клеточные функции белка, кодируемого геном *SMAP1*, а также патогенность обнаруженного варианта — p.N8fs, ген *SMAP1* выступает в качестве потенциального гена-кандидата РЯ. Дальнейшие исследования на расширенных выборках больных РЯ и здоровых доноров из Республики Башкортостан будут способствовать установлению частот встречаемости варианта с.24delC гена *SMAP1* и позволят проанализировать его участие в патогенезе РЯ.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО. Работа выполнена при финансовой поддержке программы «УМНИК» (соглашение № 12611ГУ/2017), в рамках гранта Республики Башкортостан молодым ученым от 05.02.2019 № УГ-28 «О присуждении в 2019 г. грантов Республики Башкортостан молодым ученым».

Оценка роли нового гена-кандидата *HNF1B* в канцерогенезе яичников

А.В. Ефимова¹, А.Н. Фахрисламов¹, Я.В. Валова^{1,2},
Э.Т. Мингажева¹, А.Х. Нургалиева¹, Д.С. Прокофьева¹,
Р.Р. Фаисханова³, Э.К. Хуснутдинова^{1,4}

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»,
Уфа;

²ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии
человека», Уфа;

³ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический
диспансер», Уфа;

⁴ОСП ФГБНУ УФИЦ РАН «Институт биохимии и генетики», Уфа

Рак яичников занимает одно из лидирующих мест в структуре онкологических заболеваний репродуктивной сферы у женщин. С учетом отсутствия эффективных скрининговых программ и сложности ранней диагностики заболевание диагностируется на III и IV стадиях опухолевого процесса. Основными факторами риска данной патологии являются наследственная предрасположенность, возраст, гормональный дисбаланс, воздействие окружающей среды и образ жизни. Наиболее частыми генетическими нарушениями, ассоциированными с повышенным риском развития РЯ, являются мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Однако мутации в данных генах определяют не более 15 % всех случаев заболевания.

В недавнем полногеномном исследовании, в котором проводился анализ генетических особенностей инвазивного эпителиального РЯ, были выявлены еще 3 новых локуса — 8q21, 10p12 и 17q12. Дальнейшие функциональные и молекулярные исследования отобранных локусов позволили идентифицировать новые гены-кандидаты, вовлеченные в патогенез РЯ. В частности, была установлена ассоциация гена *HNF1B*, расположенного в регионе 17q12, с риском развития серозного РЯ. Он является членом семьи транскрипционных факторов,

управляющих экспрессией генов в период эмбрионального развития и в течение всей жизни.

В результате *in vitro*-исследований, проведенных Ross-Adams и соавт., было установлено, что избыточная экспрессия белка HNF1B в опухолевых тканях при сравнении с нормальными тканями приводит к подавлению злокачественного новообразования. При метилировании промотора данный протективный эффект терялся. Для того чтобы определить, может ли экспрессия протеина HNF1B действовать как супрессор на развитие опухоли, авторами исследования был проведен функциональный анализ гиперэкспрессии HNF1B в раковых клетках и выявлено подавление эпителиально-мезенхимального перехода.

С использованием данных по метилированию ДНК и точечного картирования в гене *HNF1B* было выявлено несколько полиморфных вариантов, ассоциированных с повышенным метилированием промотора при серозном РЯ (rs7405776 и rs757210) и светлоклеточном РЯ (rs11651755). При этом наиболее значимым из них является rs757210, который коррелирует с 2 оставшимися и находится между ними.

Дальнейшие исследования на расширенных выборках больных РЯ и здоровых доноров из Республики Башкортостан позволят определить частоту встречаемости варианта rs757210 в гене *HNF1B* и дать оценку его вклада в патогенез РЯ у жителей исследуемого региона.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО. Работа выполнена при финансовой поддержке программы «УМНИК» (соглашение № 12611ГУ/2017).

Соматические мутации генов эпигенетической регуляции в опухолях желудка

А.И. Калинин¹, Е.В. Токарева², Е.Б. Кузнецова^{1,2},
Е.А. Алексеева^{1,2}, И.В. Буре², М.В. Немцова^{1,2}

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр
им. акад. Н.П. Бочкова», Москва;

²ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России, Москва

Введение. Нарушение эпигенетической регуляции играет значительную роль в канцерогенезе, рецидивировании и метастазировании опухолей и может служить маркером, полезным для клинического использования.

Цель исследования — разработать таргетную панель для исследования 25 генов, участвующих в эпигенетической регуляции (метилирование ДНК: DNMT1, MBD1, TET1, DNMT3A, DNMT3B; модификация гистонов: EZH2, UTX, EP300, JARID1B, CREBBP, HDAC2, SIRT1, KMT2A, KMT2D и KMT2C; ремоделинг хроматина: SMARCB1, SMARCA2, SMARCA4, ARID1A, ARID2, BRD7, PBRM1, CHD5, CHD7, CHD4), и провести мутационное профилирование соматических мутаций при раке желудка.

Материалы и методы. Исследование 50 опухолевых образцов проводилось методом высокопроизводительного параллельного секвенирования (NGS) с использованием таргетной панели. Верификация выявленных мутаций в опухолевой и неопухолевой тканях осуществлялась с помощью секвенирования по Сэнгеру. Для верификации отбирали генетические варианты с частотой ниже 0,001 или новые неописанные варианты, не аннотированные в базах данных ClinVar, COSMIC. Все выявленные варианты исследовались по программам-предикторам патогенности PolyPhen2, PROVEAN, SNPs&GO и MutPred2.

Результаты. При использовании таргетной панели для NGS-исследования отобранных 25 генов в 50 опухолевых образцах выявлено 23 варианта с частотой ниже 0,001, из которых 5 являются новыми неописанными вариантами, не аннотированными в базах данных.

Наибольший интерес представляют замены в генах *KMT2D* (p.D3419G), *KMT2C* (p.M959I) и *SMARCA4* (p.P913L), которые оказались патогенными по всем предикторам патогенности. Кроме того, по предсказанию MutPred2 они могут нарушать молекулярные механизмы, происходящие в нормальной клетке, приводя к злокачественной трансформации.

Замены, не отмеченные в базах данных: KMT2A: c.T9728C:p.I3243T, KMT2A:c.G9238A:p.V3080I; CHD4: c.C442G:p.P148A; ARID1A:c.C2738T:p.P913L и MBD1: c.A1603G:p.T535A — выявлены нами впервые, при этом только 1 из них — CHD4: c.C442G: p.P148A — является соматическим, а остальные подтверждены в нормальной ткани и являются новыми герминальными вариантами.

Заключение. Работа по мутационному профилированию и анализу полученных данных будет продолжена. Впоследствии результаты мутационного профилирования можно использовать для формирования групп риска среди пациентов, уточнения диагностических критериев и обеспечения прогностических факторов для принятия решений о лечении, что имеет большое клиническое значение.

Оценка генетической изменчивости эндотелиальной синтазы азота 3-го типа (*NOS3*) — rs1799983 и rs2070744 — как способ прогнозирования развития почечно-клеточного рака

М.И. Коган^{1,2}, З.М. Ахохов³, А.А. Гусев¹, Е.А. Черногубова²

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

²ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН», Ростов-на-Дону;

³МБУЗ «Городская больница скорой медицинской помощи», Таганрог

Введение. Одним из факторов риска развития почечно-клеточного рака (ПКР) является артериальная гипертензия. Способствуя прогрессированию хронической

болезни почек, артериальная гипертензия снижает общую выживаемость у больных. По некоторым данным, гуморальные факторы (ренин-ангиотензин-альдостероновая система, NO), участвующие в регуляции артериального давления, также могут влиять на ряд ключевых факторов, способствующих развитию опухоли (пролиферация, ангиогенез, инвазия), а также ее прогрессии.

Цель исследования — определить эффекты однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в гене эндотелиальной синтазы азота 3-го типа (*NOS3*) — rs1799983 и rs2070744 с позицией в хромосомах 150999023 и 150992991, участвующих в регуляции сосудистого тонуса и артериального давления, на развитие и клинико-патологические особенности ПКР.

Материалы и методы. Из образцов крови 97 пациентов, перенесших оперативное лечение (резекция почки, нефрэктомия) по поводу ПКР, была выделена ДНК с последующей идентификацией SNPs rs1799983 и rs2070744 в гене *NOS3* методом ПЦР в реальном времени. В качестве контроля частоты распространения вариантов аллелей в здоровой популяции использовали global minor allele frequency (MAF) из базы проекта HarMap. Оценку значимости различий проводили с помощью определения отношения шансов (ОШ), χ^2 -Пирсона, при количестве наблюдений менее 5 — точного критерия Фишера.

Результаты. У больных ПКР чаще выявлялись SNPs *NOS3*-786T>C, чем в европейской популяции здоровых людей (43,3 % против 32 %) ($p = 0,0014$) (ОШ 1,62). Отмечена значимая связь ПКР с артериальной гипертензией (*NOS3* rs2070744; $p = 0,019$), наличия полиморфизма с инвазией в клетчатку и сосуды почечного синуса ($p = 0,039$) (ОШ 0,51), а также с инвазией в почечную вену ($p = 0,049$) (ОШ 1,79).

Заключение. Наши результаты показывают, что компоненты ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и NO связаны с развитием и прогрессией ПКР. Выявление SNP гена эндотелиальной синтазы азота, участвующего в регуляции артериального давления, может использоваться в оценке прогноза течения ПКР и рисков развития и прогрессирования хронической болезни почек у этой категории больных.

Копийность генов как фактор радиорезистентности клеток линии HT-29

Н.Г. Кошелева, М.А. Гусарева, Д.С. Кутилин

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Лучевая терапия является одним из методов лечения аденокарциномы толстой кишки. Большое влияние на эффективность подобной терапии оказывает радиорезистентность опухолевых клеток, зависящая от их молекулярно-генетических особенностей, к которым относится показатель копийности генов (CNV).

Цель исследования — изучение влияния копийности генов, ответственных за репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла и апоптоза, на радиорезистентность клеток линии HT-29 в условиях воздействия стандартных доз лучевой терапии 5 и 7 Гр на протяжении 5 дней.

Материалы и методы. Культивирование клеток HT-29 проходило в стерильных флаконах в среде RPMI-1640 с 10 % фетальной телячьей сывороткой и 50 мкг/мл гентамицина. Облучение проводили на линейном ускорителе Novalis TX. Определение относительной копийности 32 генетических локусов (*AKT*, *ATM*, *BRIP*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDK1*, *CDKN1B*, *CCND1*, *CCND3*, *EXO1*, *FGFR2*, *HIST1*, *H2AX*, *KU70*, *PTEN*, *RAD50*, *RAP80*, *RIF1*, *RNF168*, *TOPB1*, *TP53*, *XRCC4*, *BAX*, *CASP8*, *CASP3*, *CASP9*, *MDM2*, *BCL2*, *RBBP8*, *EP300*, *LIG4*, *C-FLIP*) проводили методом количественной ПЦР в реальном времени. Генетические локусы GAPDH, ACTB и B2M применяли в качестве референсных для нормализации полученных показателей количественной ПЦР в реальном времени. Для оценки различий использовали критерий Манна-Уитни для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$. Для проведения кластерного анализа (Hierarchical Clustering, Euclidean distance) применяли собственные скрипты в среде R (R-Studio 8.10.173.987).

Результаты. После 5-дневного облучения на линейном ускорителе Novalis TX культуры клеток HT-29 в дозах 5 и 7 Гр обнаружено статистически значимое снижение общего количества клеток на 56 и 72 % соответственно ($p < 0,05$). При этом суммарная очаговая доза (СОД) составила 35 Гр (5 разовых очаговых доз (РОД) = 7 Гр) оказала более выраженный эффект на элиминацию опухолевых клеток, чем СОД 25 Гр (5 РОД = 5 Гр). После облучения только определенный пул из оставшегося количества клеток HT-29 сохранил жизнеспособность. Доля таких клеток для СОД 25 Гр составила 32,3 %, а для СОД 35 Гр — 20,4 % от начального количества клеток, взятых в эксперимент. В клетках HT-29, подвергнутых облучению СОД 35 Гр, статистически значимо была повышена копийность генов *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9* и *RBBP8* — в 2,5; 3,2; 1,6 и 1,6 раза соответственно ($p < 0,05$) и снижена копийность гена *BCL2* в 3,6 раза ($p < 0,05$) относительно интактных клеток. В клетках HT-29, подвергнутых облучению СОД 25 Гр, статистически значимо была повышена копийность только 2 генов — *CASP9* и *RBBP8* — в 1,5 и 1,4 раза соответственно ($p < 0,05$).

Заключение. Проведенное модельное исследование позволило установить, что 5-дневная лучевая терапия при РОД 5 и 7 Гр с использованием ускорителя Novalis TX приводит к селективному выживанию 32,3 и 20,4 % клеток соответственно, обладающих повышенной копийностью генов *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8*, *CASP9* и сниженной копийностью гена *BCL2*.

Работа выполнена в рамках государственного задания «Поиск предикторов радиорезистентности рака прямой кишки и разработка персонализированных неоадьювантных терапевтических подходов».

Оценка риска прогрессии при хроническом лимфолейкозе

Д. В. Кравченко¹, В. Н. Мартинков¹, А. Е. Силин¹,
А. И. Свирновский²

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь

Введение. Важнейшим этапом ведения пациентов с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) является прогнозирование течения заболевания с оценкой риска его прогрессирования, что может позволить более объективно принимать решение о необходимости более раннего начала терапии и/или использования альтернативных схем ХТ в индивидуальном порядке в зависимости от группы риска прогрессии.

В последнее время большое значение уделяется комплексному использованию прогностических маркеров в прогнозировании течения ХЛЛ, в том числе молекулярно-генетических (*NOTCH1* и др.).

Цель исследования — выявить взаимосвязь лабораторных показателей, в том числе молекулярно-генетических, с различным течением ХЛЛ и разработать комплексную модель оценки риска прогрессирования заболевания.

Материалы и методы. Нами были обследованы 127 пациентов с диагнозом ХЛЛ, наблюдавшихся в ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» с 2015 по 2019 г. Данная когорта была разделена на 2 группы: в 1-ю группу вошли 60 пациентов, наблюдающихся амбулаторно и не имеющих признаков прогрессирования ХЛЛ, а 2-ю группу составили 67 пациентов с клиническими признаками прогрессирования заболевания. Медиана возраста пациентов составила 62 года (55 и 69 лет) (Ме (25 и 75 %)).

Для определения мутаций гена *NOTCH1* применяли метод SSCP-PCR с последующим прямым секвенированием образцов ДНК, имеющих конформационный полиморфизм. Анализ осуществляли в пределах 34-го экзона гена *NOTCH1*. Все другие лабораторные исследования были выполнены также на современном оборудовании (хемилюминесцентный метод, иммунофенотипирование и др.).

Использовали методы непараметрической статистики, рассчитываемые с помощью пакета программ Statistica 6.1. Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты. По результатам статистического анализа наиболее информативными для прогнозирования течения заболевания являлись такие маркеры, как β_2 -микроглобулин, тимидинкиназа, ZAP-70, CD38 и TPA ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p = 0,003$, $p = 0,032$ и $p = 0,026$). На основе этих маркеров была разработана модель оценки риска прогрессирования ХЛЛ с выделением низкого и высокого рисков

прогрессии (беспрогрессивная выживаемость у группы низкого риска 60 мес (95 % доверительный интервал (ДИ) 53,9–66,1), а у группы высокого риска = 29,4 мес (95 % ДИ 20,7–38,1)) с балльной оценкой риска.

В результате молекулярно-генетического анализа у 14 пациентов были выявлены мутации гена *NOTCH1*. Было установлено, что пациенты без прогрессии на момент включения в исследование при наличии мутаций гена *NOTCH1* имели статистически значимо более короткую беспрогрессивную выживаемость (среднее значение — 33,4 мес (95 % ДИ 22,0–44,8) в сравнении с пациентами без мутаций — 59,2 мес (95 % ДИ 54,1–64,3) ($p = 0,018$)). Это свидетельствует о связи мутаций гена *NOTCH1* с неблагоприятным прогнозом в отношении прогрессирования заболевания у пациентов с ХЛЛ.

Определение мутации *NOTCH1* может быть использовано в качестве дополнительного этапа прогнозирования для пациентов из группы низкого риска (согласно полученной модели прогноза) с целью более точного прогноза вероятности прогрессирования ХЛЛ. Таких пациентов с положительным результатом на мутацию *NOTCH1* необходимо также относить к группе высокого риска прогрессирования заболевания, несмотря даже на отсутствие других неблагоприятных факторов прогноза. Такой подход оправдывает себя и с научно-практической, и с экономической точек зрения.

Заключение. Комплексное использование прогностических факторов в виде модели оценки риска прогрессирования ХЛЛ позволяет стратифицировать пациентов с ХЛЛ на группы высокого и низкого рисков и прогнозировать вероятность и скорость прогрессии в момент постановки диагноза и в процессе лечения, что может являться основой для оптимизации дифференциального подхода к терапии данных пациентов.

Полиморфизм генов при колоректальном раке

Е. П. Куликов, С. А. Мерцалов, А. И. Судаков,
А. А. Никифоров, В. А. Григоренко

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Рязань

Введение. Канцерогенез — это весьма сложный и многогранный процесс, который находится под контролем множества механизмов. Таковыми, к примеру, являются эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) и ряд белков-супрессоров (CHEK2), контролирующих клеточный цикл поврежденной клетки. Основным компонентом NER служит комплекс белков, получивших название транскрипционного фактора II H (TFIIH). Ген *XPD* (xeroderma pigmentosum group D) кодирует структуру белка-геликазы, который является важным участником эксцизионной репарации нуклеотидов. Ген *CHEK2* кодирует фермент чекпоинт-киназу 2, которая участвует в контроле клеточного цикла. Данные мировой литературы о роли полиморфизма

этих генов при колоректальном раке (КРР) неоднозначны, ввиду чего эта проблема остается актуальной.

Материалы и методы. Полиморфизм генов был оценен у 143 человек. Основную группу составили 105 пациентов с КРР: 58 мужчин и 47 женщин. Контрольную группу составили 38 здоровых добровольцев: 6 мужчин и 32 женщины. Обе группы были ранжированы в соответствии с возрастом: на 40–49, 50–59, 60–69, 70–79 и 80–89 лет. В локализации опухолевого процесса были выделены 2 подгруппы: рак прямой кишки (76 пациентов) и рак ободочной кишки (29 пациентов). Генотипирование проводилось методом выделения ДНК из лейкоцитов венозной крови обследуемых с последующей ПЦР и электрофоретической детекцией результата. Генотип конкретного индивида оценивался как гетерозиготный (гетеро), гомозиготный по доминантной аллели (гомо1) и гомозиготный по рецессивной аллели (гомо2).

Результаты. При проведении статистического анализа внутри самих групп, при учете полового и возрастного критериев достоверных различий выявлено не было. Дальнейший анализ групп в отношении гена *XPB* показал статистически достоверные различия между пациентками и здоровыми женщинами 60–69 лет и пациентами 70–79 лет обоих полов. В отношении гена *CHEK2* статистически достоверная разница была получена при сравнении пациентов 50–59 лет и здоровых добровольцев того же возраста, а также при сравнении пациентов с раком прямой кишки и пациентов с I–III стадией опухолевого процесса со всей группой здоровых добровольцев. Анализ полиморфизма генов в зависимости от локализации и стадии процесса не показал статистически достоверных различий.

Заключение. Пол и возраст не оказывают влияния на полиморфизм генов. Локализация и стадия КРР также не зависят от полиморфизма данных генов. Однако статистически достоверные различия в старшей возрастной группе, вероятно, указывают на значимость полиморфизма гена *XPB* у пациентов данной возрастной категории. Полиморфизм гена *CHEK2*, по-видимому, значим в отношении развития рака прямой кишки и ранних стадий опухолевого процесса, а также у пациентов в возрасте 50–59 лет.

Роль CNV-генов сигнального пути EGFR в резистентности к терапии моноклональными антителами у больных аденокарциномой легкого

Д.С. Кутилин, Т.Г. Айрапетова, П.А. Анистратов,
С.П. Пыльцин, И.А. Лейман, И.Н. Туркин

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Основной мишенью для таргетной терапии моноклональными антителами (МА) при аденокарциноме легкого являются ERBB (EGFR)-рецепторы.

При применении данной терапии часто встречается эффект резистентности к ней (даже при наличии активирующих мутаций и отсутствии мутаций, связанных с устойчивостью к терапии, в гене *EGFR*). В настоящее время изучено множество молекулярных механизмов, связанных с резистентностью, однако роль в данном явлении изменения копийности генов (CNV) нижележащих эффекторов рецепторных тирозинкиназ сигнального пути EGFR практически не изучена и поэтому стала целью данного исследования.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили срезы тканей из FFPE-блоков 52 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом аденокарциномы легкого (T2N2M0, G₂, с активирующими мутациями в гене *EGFR* L858R (40 пациентов) и Del19 (12 пациентов), у 23 пациентов выявлена резистентность к терапии МА). Срезы фиксировались на предметных стеклах, подвергались депарафинизации (о-ксилолом) и окрашивались гематоксилином и эозином. Из этих препаратов с помощью лазерной микродиссекции (Palm MicroBeam, Carl Zeiss, Germany) выделялись опухолевые и нормальные клетки, из которых фенол-хлороформным методом проводилась экстракция ДНК. Определение относительной копийности 8 генетических локусов (*EGFR*, *KRAS*, *GRB2*, *SOS1*, *MAPK1*, *BRAF*, *STAT1* и *PIK3CA*) проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (референсные гены *GAPDH*, *B2M*, *ACTB*). Праймеры были разработаны с использованием базы данных NCBI GenBank. Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна–Уитни.

Результаты. У пациентов с резистентностью к терапии МА обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение копийности генов *GRB2* (у 72 % пациентов), *SOS1* (у 70 % пациентов), *MAPK1* (у 67 % пациентов) и *BRAF* (у 77 % пациентов) в 2 раза в опухолевых клетках относительно нормальных клеток легкого. У пациентов, чувствительных к терапии МА, обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение копийности гена *BRAF* — в 1,6 раза. При этом копийность генов *EGFR*, *KRAS*, *STAT1* и *PIK3CA* в опухолевых и нормальных клетках легкого статистически значимо не отличалась в обеих группах пациентов (чувствительных ($n = 29$) и резистентных ($n = 23$) к терапии МА).

Заключение. Изменение копийности генов сигнального пути EGFR — *GRB2*, *SOS1* и *MAPK1* у пациентов с аденокарциномой легкого может иметь важное значение в устойчивости опухолей к терапии МА.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-34-00267 мол_а).

Влияние полиморфизмов гена фактора некроза опухоли на общую выживаемость больных раком молочной железы зависит от геномного контекста области HLA

Т.Ф. Маливанова^{1,2}, Е.В. Алферова¹, А.С. Осташкин²,
Т.А. Астрелина², Н.Н. Мазуренко¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва;

²ФГБУ «ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва

Введение. Фактор некроза опухоли (TNF) — это провоспалительный цитокин, вовлеченный в патогенез ряда заболеваний, в том числе онкологических и аутоиммунных. Полиморфизмы -308 (g/a) TNF и -238 (G/A) TNF входят в расширенные наследственные гаплотипы, охватывающие весь комплекс генов *HLA*. Мы предположили, что обнаруженное ранее влияние этих полиморфизмов на общую выживаемость (ОВ) больных РМЖ может быть следствием кооперации с геномным окружением, а именно с гаплотипами AN8.1 и B57, связанными с аутоиммунными состояниями.

Материалы и методы. В работе использована архивная коллекция ДНК от 442 первичных больных РМЖ и 327 женщин контрольной группы с известными генотипами -308 (g/a) TNF и -238 (G/A) TNF. 412 больных РМЖ были протестированы на маркерные аллели гаплотипов AN8.1 и B57 (HLA-A*1, HLA-B*8, HLA-DRB1*3, HLA-B*5701).

Результаты. Не обнаружено влияния полиморфизмов -308 (g/a) TNF и -238 (G/A) TNF на предрасположенность к заболеванию РМЖ. Подтверждена ассоциация минорных аллелей -308a и -238A гена *TNF* с маркерами гаплотипов AN8.1 и B57 соответственно. При II стадии РМЖ 10-летняя ОВ была выше 80 % у носителей генотипа -308ag/-238GG при наличии маркерных аллелей AN8.1 и у носителей -308gg/-238GG независимо от маркеров AN8.1. В то же время 10-летняя ОВ была ниже 50 % у носителей -308ag/-238GG в отсутствие маркеров AN8.1 и у носителей генотипа -308gg/-238AG ($p = 0,0076$).

Заключение. Исходя из полученных данных и анализа источников литературы, можно предположить, что механизмы действия -308 (g/a) TNF и -238 (G/A) TNF отличаются и зависят от геномного контекста. Снижение ОВ у носителей минорного аллеля -238A, по-видимому, опосредовано его ассоциацией с HLA-B*57, тогда как снижение ОВ у носителей -308a, напротив, не связано с наследственным гаплотипом AN8.1. Таким образом, выявлены две генетически детерминированные группы больных РМЖ, имеющие неблагоприятный прогноз в условиях стандартной терапии РМЖ.

Дифференциальная экспрессия микроРНК в гормончувствительной и гормонрезистентной культурах клеток рака предстательной железы

А.Н. Машкарин, М.Г. Тютякина, М.А. Махоткин,
В.А. Тарасов

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН», Ростов-на-Дону

Введение. Инициация и развитие злокачественных опухолей в значительной степени обусловлены эпигенетическими изменениями, в том числе изменением экспрессии микроРНК. МикроРНК контролируют группы генов, определяющие такие процессы, как деление клеток, апоптоз и стабильность генома, которые лежат в основе прогрессии опухоли. Не исключено, что злокачественный рост клеток вызывается aberrантной экспрессией определенных микроРНК, а ее нормализация приведет к остановке роста и дальнейшему уменьшению опухоли. Как следствие, микроРНК могут использоваться как в диагностике, так и в лечении рака.

Цель исследования — анализ роли микроРНК в контроле гормончувствительных и гормонрезистентных клеток рака предстательной железы (РПЖ), культивируемых *in vitro*.

Материалы и методы. В работе использовали клетки гормончувствительной линии LNCaP и гормонрезистентной линии рака РПЖ DU-145. Контролем служили нормальные клетки предстательной железы. Для анализа экспрессии микроРНК использовали метод параллельного массового секвенирования на платформе Illumina. При секвенировании клеток DU-145 и LNCaP в 1-й серии опытов использовали систему MiSeq (Illumina, Inc., США), в остальных случаях — секвенатор HiSeq (Illumina, Inc., США).

Результаты. Результаты исследования показали, что число aberrантно экспрессируемых микроРНК в гормончувствительных клетках линии LNCaP составило 116, из которых 44 индуцировали увеличение экспрессии, а 72 показали уменьшение экспрессии по сравнению с микроРНК нормальной ткани предстательной железы. В клетках гормонрезистентной линии DU-145 число aberrантно экспрессируемых микроРНК оказалось равным 85, из которых увеличили экспрессию 29, а уменьшили — 56 в сравнении с микроРНК нормальной ткани предстательной железы. При этом у 8 микроРНК экспрессия в клетках LNCaP и DU-145 изменялась в противоположных направлениях. Таким образом, экспрессия miR-10a-5p, -100-3p, -31-5p в клетках гормончувствительной линии LNCaP подавлялась, а в клетках DU-145 — увеличивалась. И напротив, экспрессия miR-99a-5p, let-7c-5p, miR-125b-2-3p, let-7b-5p, miR-148a-3p в клетках

гормонрезистентной линии DU-145 подавлялась, а в клетках LNCaP — увеличивалась.

Заключение. Идентифицированы 8 микроРНК, которые показали значимые разнонаправленные изменения экспрессии в гормончувствительных клетках РПЖ линии LNCaP и гормонрезистентных клетках DU-145 в отличие от экспрессии микроРНК в клетках нормальной ткани предстательной железы. Полученные данные указывают на роль микроРНК-зависимой регуляции в контроле чувствительности к гормонам при РПЖ.

Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы в узбекской популяции женщин

Г.Ф. Мирюсупова

ФГБУ «9-й лечебно-диагностический центр»
Минобороны России, Москва

Анализ заболеваемости и смертности от РМЖ указал на рост данных показателей в узбекской популяции женщин на фоне роста численности женского населения в Республике Узбекистан.

С целью раскрытия факторов риска развития РМЖ была изучена группа из 979 больных РМЖ, проживающих на территории Узбекистана. Средний возраст пациенток на момент манифестации заболевания составил $50,32 \pm 1,34$ года. Все больные были разделены на 2 группы по этнической принадлежности: 1-я группа ($n = 543$; 55,5 %) — пациентки коренного этноса (узбечки), 2-я группа ($n = 436$; 44,5 %) — пациентки других народностей. Было установлено, что средний возраст больных на момент манифестации РМЖ в 1-й группе больных составил $49,37 \pm 0,86$ года, во 2-й группе — $51,27 \pm 1,05$ года, что указало на более ранний возраст манифестации РМЖ в группе больных коренного этноса. По результатам ИГХ-анализа опухоли у больных в 2 группах наибольшее омоложение среднего возраста на момент манифестации РМЖ было зарегистрировано в 1-й группе больных люминальным В Her2/neu-отрицательным и трижды негативным подтипами РМЖ. У больных люминальным В Her2/neu-отрицательным подтипом РМЖ средний возраст заболевших в 1-й группе ($n = 93$) составил $46,49 \pm 1,55$ года, во 2-й группе ($n = 102$) — $52,13 \pm 1,19$ года. У больных трижды негативным подтипом РМЖ средний возраст пациенток составил: 1-я группа ($n = 105$) — $48,88 \pm 1,42$ года, 2-я группа ($n = 92$) — $54,56 \pm 1,40$ года. Изучение мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* в 1-й группе больных люминальным В Her2/neu-отрицательным подтипом РМЖ стандартными ПЦР-наборами не позволило установить наличие герминогенных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Проведение скрининга мутации в генах методом секвенирования (NGS) у пациенток 1-й группы с данным биологическим подтипом РМЖ

позволило установить наличие мутации в гене *BRCA1* (rs1799949) (2201C>T) в 3 случаях (3,2 %) при отсутствии у больных семейного анамнеза по РМЖ.

Изучение такого фактора риска развития РМЖ, как наличие мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* в условиях омоложения популяции пациенток, требует дальнейшего изучения методом секвенирования с целью проведения адекватного терапевтического подхода.

Анализ профиля метилирования ДНК при предопухолевых изменениях в бронхолегочном эпителии

А.А. Пономарева¹, Е.В. Денисов^{1,2}, П.А. Гервас¹,
О.В. Панкова¹, А.А. Щеголева¹, А.М. Киселев³,
А.А. Зарубин¹, Н.В. Чердынцева¹, В.М. Перельмутер¹

¹ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

³ОФК 10 ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»
Минздрава России, Санкт-Петербург

Плоскоклеточный рак легкого возникает в результате прогрессивно развивающихся на фоне хронического воспаления предопухолевых изменений эпителия бронхов, встречающихся изолированно или сочетанно: базальноклеточной гиперплазии (БКГ), плоскоклеточной метаплазии (ПМ) и дисплазии I–III степеней. Причины и механизмы развития изменений бронхиального эпителия в условиях хронического воспаления неизвестны. Поэтому актуальным является выявление маркеров, специфичных для каждого из предопухолевых изменений.

Материалы и методы. С помощью лазерной микродиссекции (PALM, Carl Zeiss) из образцов нормальной ткани легкого, полученных от больных плоскоклеточным раком легкого, были выделены фокусы БКГ (3 образца и БКГ и 3 — пмБКГ) и нормального эпителия ($n = 6$, от тех же пациентов с БКГ). Для приготовления ДНК-библиотек использовали набор Pico Methyl-Seq Library Prep Kit (Zymo Research) и далее проводили полногеномное секвенирование.

Результаты. Выявлено 5 383 297 CpG-островков, перекрывающихся хотя бы одним видом между изученными образцами: иБКГ, пмБКГ, нормальный эпителий бронхов. С помощью PCA-метода удалось подтвердить схожесть профилей метилирования ДНК между образцами БКГ и нормального эпителия, полученными от одних и тех же пациентов, и, кроме этого, найти образцы со значительными отличиями в метиломе. С использованием кластерного анализа показана близость образцов БКГ и нормального эпителия в пределах одного и того же случая. Нам удалось идентифицировать несколько кластеров, в число которых вошли образцы с максимально близким профилем метилирования. В целом распределение метилирования незначительно различалось между образцами, что говорит

о корректности бисульфитной обработки и подготовки библиотек. Выявлено гипометилирование гена *SAPCD2*, вовлеченного в регуляцию деления опухолевых клеток, и гиперметилирование гена-онкосупрессора *ST14* в БКГ по сравнению с нормальным эпителием бронхов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-29-06002), выплате стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых (№ СП-1549.2018.4, 2018–2020).

Онкосупрессорные свойства малых сериновых фосфатаз при немелкоклеточном раке легкого

Г.А. Пузанов¹, Г.С. Краснов¹, Е.Е. Егоров¹,
Э.Б. Дашиинимаев², А.Д. Бениаминов¹, М.А. Афанасьева¹,
Х.С. Вишнякова¹, Т.Т. Кондратьева³, В.Н. Сенченко¹
¹ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;
²ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Колыцова РАН», Москва;
³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва

Рак легкого — одно из наиболее распространенных и смертоносных онкозаболеваний в мире. Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) составляет около 85 % всех случаев рака легкого. Малые сериновые фосфатазы CTDSP1, CTDSP2 и CTDSPL (CTDSP1/2/L) принадлежат к подсемейству SCP/CTDSP и участвуют в важных клеточных процессах, нарушаемых при канцерогенезе. Однако их роль при НМРЛ изучена недостаточно.

На клеточной линии A549 показана опухолеподавляющая активность фосфатаз, которая может быть реализована в результате дефосфорилирования Rb по сериновым остаткам Ser-807/811, -780 и -795. В клетках с повышенной экспрессией CTDSP1/2/L наблюдалось увеличение доли клеток с эпителиальной морфологией. Кроме того, выявлено, что частое (84 %, 39/46) и высокоскоординированное ($r_s = 0,53–0,62$, $p \leq 0,01$) снижение экспрессии CTDSP1/2/L и RB1 характерно для первичных образцов НМРЛ. Значительное различие в уровнях мРНК обнаружено для опухолей аденокарциномы с метастазами в лимфатических узлах и без них, но не для образцов плоскоклеточного рака легкого ($p \leq 0,05$). С использованием данных TCGA и оригинального приложения CrossHub обнаружено, что проонкогенные микроРНК miR-96, -182 и -183 могут быть общими регуляторами экспрессии CTDSP1/2/L. Кроме этого, 3'-нетранслируемые области генов фосфатаз содержат предсказанные сайты связывания для всех трех микроРНК. Обнаружена антикорреляция между экспрессией CTDSP1/2/L (среднее снижение около 5 раз) и miR-96, -182 и -183

(среднее повышение около 5,5 раза). Эти результаты биоинформатического анализа подтверждены на независимой выборке парных образцов НМРЛ методом ПЦР в реальном времени.

Полученные результаты отражают функциональную связь CTDSP1, CTDSP2 и CTDSPL, расширяют знания об их супрессорных свойствах посредством дефосфорилирования Rb и дают новое понимание патогенеза НМРЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-50-00060).

Исследование ассоциации аллельных вариантов rs16260 гена *CDH1* в качестве предиктора развития рака желудка

Р.Р. Рахимов¹, А.Х. Нургалиева², Л.Ф. Юсупова²,
Д.Р. Валитова², Р.Р. Абдеев¹, Ф.Р. Мунасыпов¹,
Ш.М. Хуснутдинов¹

¹ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Башкортостан, Уфа;
²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа

Введение. Срезовые и генетические факторы влияют на патогенез рака желудка (РЖ). Одним из специфических генов-супрессоров семейного рака желудка является ген *CDH1*. Частота генетических aberrаций в этом гене варьирует в зависимости от этнической принадлежности изучаемой выборки. Носители мутаций в данном гене имеют 70 % риск развития РЖ в течение жизни. Есть несколько сообщений о рекомендуемой превентивной гастрэктомии в данной группе пациентов из-за трудности эндоскопического выявления раннего РЖ у данной когорты больных.

Цель исследования — поиск ассоциации аллелей и генотипов полиморфного варианта rs16260 гена *CDH1* с риском развития РЖ для населения Республики Башкортостан.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы ДНК 221 пациента с РЖ и 350 здоровых доноров без признаков патологии желудочно-кишечного тракта, проживающих в РБ. ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование проводили с помощью ПЦР-ПДРФ — полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

Результаты. Найдены достоверные различия в распределении частот аллелей и генотипов rs16260 гена *CDH1* между больными РЖ и здоровыми донорами в зависимости от этнической принадлежности. Оказалось, что для русских маркерами повышенного риска развития злокачественных опухолей желудка являются аллель С и генотип С/С ($\chi^2 = 4,02$; $p = 0,045$; отношение рисков (ОР) 1,59; 95 % ДИ 1,03–2,45 и $\chi^2 = 4,25$; $p =$

0,039; ОР 1,77; 95 % ДИ 1,06–2,95 соответственно). Среди татар выявлен маркер повышенного риска развития РЖ — генотип А/А ($\chi^2 = 7,35$; $p = 0,007$; ОР 13,03; 95 % ДИ 1,60–105,95). Разделение выборки пациентов и контроля по половому признаку показало, что генотип С/А является маркером пониженного риска развития РЖ для женщин нашего региона ($\chi^2 = 4,87$; $p = 0,027$; ОР 0,52; 95 % ДИ 0,30–0,90). Более того, установлено, что у пациентов с недифференцированным и низкодифференцированным РЖ чаще встречается генотип С/С ($\chi^2 = 5,15$; $p = 0,023$; ОР 1,69; 95 % ДИ 1,09–2,61) и реже встречается генотип С/А ($\chi^2 = 7,07$; $p = 0,008$; ОР 0,53; 95 % ДИ 0,34–0,83) по сравнению с контрольной выборкой.

Заключение. Полиморфный вариант rs16260 гена *CDH1* может вносить вклад в структуру генетической предрасположенности к развитию РЖ у жителей Республики Башкортостан.

Регуляция гормональной зависимости клеток рака предстательной железы, связанная с дифференциальной экспрессией микроРНК

В.А. Тарасов¹, А.В. Набока¹, М.А. Махоткин¹,
И.Е. Чикунов², М.Г. Тютякина¹, Д.А. Чеботарев¹,
Е.Н. Черкасова¹, М.И. Коган^{1,3}, М.Б. Чибичян³,
Д.Г. Матишов¹

¹ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН», Ростов-на-Дону;

²ФГБОУ ВО «Южно-Российский государственный политехнический университет (НПИ) им. М.И. Платова», Новочеркасск;

³ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. В ходе андроген-депривационной терапии РПЖ зачастую начинают проявлять себя злокачественные клетки, для которых поступление гормональных стимулов извне необязательно. В таких клетках либо многократно усиливается чувствительность к поступающим сигналам, появляются механизмы их имитации, либо включаются подавленные в нормальных клетках предстательной железы пути активизации роста. Накапливаются свидетельства, что регуляция метаболизма клеток РПЖ при трансформации в андроген-независимое состояние связана с микроРНК-зависимым подавлением трансляции генов.

Цель исследования — поиск механизмов влияния экспрессии микроРНК на способность клеток РПЖ к росту без гормональной стимуляции.

Материалы и методы. С использованием платформы Illumina были получены профили экспрессии микроРНК в клинических образцах гормон-чувствительного РПЖ (3 образца), нормальной ткани предстательной железы

(3 образца) и клеточных линиях гормон-чувствительного (LNCaP, 2 образца) и гормон-независимого (DU-145, 2 образца) РПЖ. Проведен анализ функций тех микроРНК, чей уровень экспрессии в злокачественных клетках отличается от уровня экспрессии в клетках нормальной предстательной железы.

Результаты. Выявлены 7 микроРНК с односторонней аберрантной экспрессией во всех исследованных образцах клеток РПЖ (miR-126-3p, -144-5p, -150-5p, -223-3p, -378a-3p, -451a, -486-5p). По-видимому, экспрессия этих микроРНК отражает изменения метаболизма в злокачественных клетках, не связанные с их зависимостью от гормонов. Направление изменения аберрантной экспрессии у некоторых микроРНК связано со степенью зависимости клеток РПЖ от гормонов. Установлено, что экспрессия miR-148a изменена в клетках DU-145 в противоположном направлении по сравнению с клетками LNCaP и опухолями. Обнаружено, что мишенью miR-148a, let-7b и микроРНК, включенных в кластер miR-99a/let-7c/miR-125b-2, экспрессия которых повышена в клетках LNCaP и понижена в DU-145, является ген рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGF1R), который запускает один из ключевых сигнальных путей стимуляции роста клеток при РПЖ. В связи с этим не исключено, что в основе деления и выживаемости гормон-независимых клеток, культивируемых *in vitro*, лежит зависимый от IGF1R, но не от андрогенного рецептора (AR) обходной сигнальный путь.

Заключение. Различия в действии микроРНК в 2 изученных клеточных линиях в основном связаны с их репрессирующим влиянием на экспрессию IGF1R в клетках гормон-зависимой линии LNCaP и отсутствием этого влияния в клетках гормон-независимой линии DU-145.

Роль гена *SOX-2* в патогенезе рака яичников

А.Н. Фахрисламов¹, Я.В. Валова^{1,2}, Э.Ф. Муллагалеева¹,
Э.Т. Мингажева¹, А.Х. Нурғалиева¹, Д.С. Прокофьева¹,
Р.Р. Фаисханова³, Э.К. Хуснутдинова^{1,4}

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет»,
Уфа;

³ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии
человека», Уфа;

³ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический
диспансер», Уфа;

⁴ОСП ФГБНУ УФИЦ РАН «Институт биохимии и генетики»,
Уфа

Рак яичников является одной из наиболее распространенных онкопатологий у женщин. По данным Международного агентства по изучению рака, в мире ежегодно регистрируется более 295 тыс. новых случаев этого заболевания, половина из которых заканчивается летальным исходом.

К факторам риска развития карциномы яичников относятся наследственная предрасположенность, возраст, гормональный дисбаланс, воздействие окружающей среды и образ жизни. Также влияние на патогенез РЯ оказывает состояние иммунной системы.

Одним из генов, ассоциированных с риском развития РЯ, может считаться ген *COX-2* (*PTGS2*). Он расположен на длинном плече 1-й хромосомы (1q25.2-q25.3). Кодированный данным геном фермент *COX-2* является индуцибельным, экспрессируемым только в ответ на стимулы, такие как митогены, цитокины, факторы роста или гормоны, и выполняет провоспалительную функцию. Основной функцией белка *COX-2* является участие в выработке простагландина E2 (*PGE2*), который играет важную роль в модуляции подвижности, пролиферации клеток и устойчивости к апоптозу.

Высокое содержание белка *COX2* в клетке ассоциировано с активацией неоангиогенеза, повышением пролиферации и инвазии. Для злокачественных и пограничных опухолей яичников характерно значительное повышение уровня данного протеина.

Экспрессия и стабильность белка *COX-2* подвержены сложным механизмам регуляции различными элементами как в 5'-, так и в 3'-нетранслируемых областях транскрипта. Следовательно, полиморфизмы в области промотора и 3'-нетранслируемой области гена *COX-2* могут потенциально влиять на экспрессию гена и затем модулировать восприимчивость индивидуума к раку.

В гене *COX-2* известно несколько полиморфных вариантов, и наиболее изученным из них является rs5275. Вариант rs5275 (8473 T>C) находится в 3'-нетранслируемой области данного гена и влияет на стабильность мРНК. При этом выявлено, что аллель С ассоциирован с более низкими уровнями мРНК *COX-2*.

Полиморфный вариант rs5275, в соответствии с данными литературы, ассоциирован с риском развития злокачественных опухолей различной этиологии, в том числе РЯ. Так, в результате метаанализа, проведенного Lurie с соавт., у лиц, гомозиготных по аллелю С полиморфного варианта 8473T>C в гене *COX-2*, было показано достоверное снижение риска развития несерозного РЯ.

С учетом важной роли гена *COX-2* в синтезе простагландинов, а также функциональной значимости обнаруженного варианта rs5275 ген *COX-2* может выступать в качестве гена-кандидата РЯ. Предстоящие исследования на расширенных выборках больных РЯ и здоровых доноров из Республики Башкортостан будут способствовать установлению частот встречаемости варианта rs5275 гена *COX-2* и позволят проанализировать его участие в патогенезе РЯ.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО. Работа выполнена при финансовой поддержке программы «УМНИК» (соглашение № 12611ГУ/2017) в рамках гранта

Республики Башкортостан молодым ученым от 05.02.2019 № УГ-28 «О присуждении в 2019 г. грантов Республики Башкортостан молодым ученым».

Особенности копийности некоторых генов в опухолевых клетках у больных серозной аденокарциномой яичника

М.Р. Цандекова, Д.С. Кутилин, А.Ю. Максимов, Н.В. Порханова

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Уровень смертности от РЯ является самым высоким среди гинекологических опухолей в мире и ежегодно увеличивается. Серозная аденокарцинома является наиболее распространенным подтипом РЯ. Ранняя диагностика данного заболевания может значительно улучшить прогноз. Для разработки более эффективных методов ранней диагностики и выявления более надежных молекулярных маркеров, которые можно использовать либо в качестве новых терапевтических мишеней, либо для оценки прогноза, необходимо исследовать молекулярные механизмы, лежащие в основе злокачественного поведения клеток эпителия яичников.

Цель исследования — анализ изменения копийности генов, регулирующих апоптоз, репарацию ДНК, клеточную пролиферацию, метаболизм и рецепцию эстрогенов в опухолевых и нормальных клетках яичника.

Материалы и методы. Для исследования использовали срезы тканей из FFPE-блоков 65 пациентов с диагнозом серозной аденокарциномы яичника. Опухолевые и нормальные клетки эпителия яичников выделяли с помощью лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом (Palm MicroBeam, Carl Zeiss). Из клеток фенол-хлороформным методом проведена экстракция ДНК. Определение копийности 34 генов (*BRAF*, *KRAS*, *EGFR*, *PIK3CA*, *PTEN*, *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PRKCI*, *NOTCH1*, *AKT1*, *BAX*, *CASP7*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *p53*, *MDM2*, *BCL2*, *CYP11A1*, *CYP11A2*, *CYP11B1*, *CYP19A*, *ESR1*, *ESR2*, *GPER*, *STS*, *SULT1A*, *SULT1E1*, *OCT4*, *SOX2*, *C-MYC*, *SOX18*, *SCNN1A*) проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (референсные гены — *B2M*, *GAPDH*). Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Для кластерного анализа (Hierarchical Clustering, Euclidean distance) использовали скрипты на языке R.

Результаты. Обнаружены статистически значимое ($p < 0,005$) увеличение копийности генов *PTEN*, *MDM2*, *SOX2*, *CYP11B1*, *ESR1* и *SULT1E1* в 2,0; 2,0; 1,8; 2,5; 3,0 и 2,0 раза соответственно и снижение копийности генов *CASP3* и *CASP8* в 2,0 раза в опухолевых клетках относительно нормальных. Кластерный анализ позволил выделить 2 группы образцов серозной аденокарциномы, отличающихся по копийности генов ($p < 0,005$): в 1-й ($n = 40$) повышена копийность генов *SOX2*, *MDM2*, *ESR1*, *CYP11B1* и *SULT1E1* и понижена

копийность генов *TP53* и *BRCA2*, во 2-й ($n = 25$) повышена копийность *PTEN*, *PIK3CA*, *BCL2* и понижена копийность *BAX*, *CASP3* и *CASP8*.

Заключение. Анализ изменения копийности генов позволил выявить наиболее характерные маркеры клеток серозной аденокарциномы яичника. На основании дифференциальных отличий по копийности генов было выделено 2 молекулярных подтипа серозной аденокарциномы.

Дифференциальная экспрессия микроРНК в радиорезистентных клонах линий клеток HeLa и Du-145

Д.А. Чеботарев, М.А. Махоткин, А.В. Набока,
М.Г. Тютякина, Е.Н. Черкасова, А.Н. Машкарин,
В.А. Тарасов

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН», Ростов-на-Дону

Введение. Появление клонов злокачественных клеток, способных устранять последствия действия радиации, затрудняет радиационную терапию онкозаболеваний. Зачастую у таких клеток ослабевают специализация, фенотип становится похож на фенотип стволовых клеток, замедленный клеточный цикл позволяет устранять возникающие повреждения ДНК. Индуцированные радиацией двунитевые разрывы ДНК активируют сигнальные каскады, в том числе вызывающие изменение экспрессии микроРНК, гены-мишени которых вовлечены в контроль репарации ДНК, апоптоза и прохождения клеточного цикла, таким образом, влияя на устойчивость клеток к радиационному воздействию.

Цель исследования — идентификация микроРНК, регулирующих радиорезистентность клеток РПЖ на модели андроген-независимой линии Du-145 и клеток РШМ на модели линии HeLa.

Материалы и методы. С использованием параллельного секвенирования на платформе Illumina были определены профили экспрессии микроРНК в исходных и ранее полученных радиорезистентных вариантах клеток HeLa и Du-145 на 1-е и 8-е сутки после облучения гамма-квантами в дозе 4 Гр. Были отобраны микроРНК, показавшие устойчивые изменения экспрессии в радиорезистентных клетках после радиационного воздействия.

Результаты. Измененную экспрессию микроРНК в клетках радиорезистентных вариантов HeLa и Du-145 показали 34-я и 28-я микроРНК соответственно. Среди них особую роль играют микроРНК с неизменной либо измененной в противоположном по отношению к клеткам исходных вариантов линий направленности абerrантной экспрессией. Эти микроРНК служат индикаторами изменения метаболизма в клетках радиорезистентных вариантов по сравнению с исходными.

Для линии клеток HeLa в их число входит 18, а для Du-145 — 8 микроРНК. Спектр генов-мишеней таких микроРНК указывает на то, что прямое участие микроРНК в формировании радиорезистентности в основном связано с модуляцией процессов апоптоза и прохождения клеточного цикла, но не репарации ДНК. Вместе с тем были выявлены отличия радиорезистентных вариантов HeLa и Du-145 в экспрессии микроРНК, регулирующих ДНК-метилтрансферазы, PTEN, а также находящихся под контролем Мус, что свидетельствует о возможной регуляции ответа клеток на радиационные повреждения через сигнальные пути PI3K/Akt и MAPK/ERK.

Заключение. Полученные результаты дают основания полагать, что роль микроРНК в реализации радиорезистентности в клетках HeLa и Du-145 связана с обеспечением функционального взаимодействия между ДНК-метилтрансферазами, транскрипционным регулятором Мус, а также фосфатазой PTEN в регуляции активности сигнальных путей PI3K/Akt и MAPK/ERK.

Изучение влияния факторов, связанных с ожирением, на риск развития почечно-клеточного рака в молекулярно-эпидемиологическом исследовании с применением метода менделевской рандомизации

О.В. Шаньгина, А.Ф. Мукерия, Д.М. Максимович,
Н.П. Левачева, Д.Г. Заридзе

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Известно, что ряд факторов, связанных с ожирением, играют роль в этиологии ПКР, однако остается неясным, какие именно факторы могут напрямую воздействовать на риск развития этой опухоли. Для решения данной задачи нами была предпринята попытка применить метод менделевской рандомизации (МР) с использованием генетических маркеров гипотетических факторов риска ПКР. Метод МР позволяет с высокой точностью исключить влияние на результаты мешающих факторов, а также обратную причинно-следственную зависимость.

В качестве переменных были выбраны генетические маркеры ожирения, высокого артериального давления, диабета 2-го типа, высоких уровней липидов, инсулина и сахара в крови. Связь этих маркеров с риском развития ПКР была изучена в рамках полногеномного исследования, насчитывавшего 10 784 пациента с диагнозом ПКР и 20 406 контрольных лиц. В результате анализа с применением метода МР было показано, что такие факторы, как максимальные значения коэффициентов индекса

массы тела, соотношение объемов талии и бедер и содержание жира в организме, достоверно повышают риск развития ПКР (относительный риск (ОР) 1,56, 95 % ДИ 1,44–1,70, ОР 1,63, 95 % ДИ 1,40–1,90, ОР 1,66, 95 % ДИ 1,44–1,90 соответственно). На риск ПКР также влияли показатели уровня инсулина натощак (ОР 1,82, 95 % ДИ 1,30–2,55), диастолического (ОР 1,28, 95 % ДИ 1,11–1,47), но не систолического (ОР 0,98, 95 % ДИ 0,84–1,14).

Связи между риском ПКР и содержанием в крови липидов, глюкозы натощак и диабетом 2-го типа выявлено не было. Таким образом, в результате проведенного исследования впервые было показано возможное влияние на риск ПКР содержания инсулина, а также с высокой степенью вероятности была подтверждена этиологическая роль в развитии заболевания ожирения и высокого диастолического артериального давления.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОГРЕССИИ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕЙ

Доклады

Эстрогеновый рецептор α : вклад в формирование тамоксифенрезистентного фенотипа опухолей люминального А-подобного и люминального В-подобного подтипов

Н.Н. Бабышкина^{1,2}, Т.А. Дронова^{1,2}, А.В. Дорошенко¹,
Н.В. Чердынцева^{1,2}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;
²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

Введение. Люминальный А-подобный и люминальный В-подобный подтипы РМЖ представляют собой биологически разные варианты опухоли, характеризующиеся специфическими клиническими и прогностическими особенностями.

Цель исследования — изучить характер распределения ER α , мутации гена *ESR1*, а также уровень его транскрипционной активности у больных с люминальными подтипами РМЖ и оценить их связь с эффективностью тамоксифена и показателями выживаемости.

Материалы и методы. В исследование включен 81 образец с люминальным А-подобным и 54 — с люминальным В-подобным подтипами опухоли от пациентов с прогрессированием заболевания (отдаленные метастазы или рецидив) и больных с отсутствием прогрессирования на фоне терапии тамоксифеном. Характер распределения ER α анализировали ИГХ-методом с использованием визуальной оценки окрашивания. Полиморфные варианты *ESR1* (rs2077647, rs2228480, rs1801132) генотипированы с использованием технологии TaqMan. Уровень экспрессии мРНК *ESR1* оценивали с помощью количественной ОТ-ПЦР.

Результаты. В люминальных В-подобных опухолях, резистентных к тамоксифену, транскрипционная активность гена *ESR1* снижена по сравнению с тамоксифенчувствительными образцами ($p = 0,038$). Кроме этого, такие опухоли характеризовались высокой частотой встречаемости мутантных вариантов *ESR1* rs2228480 ($p = 0,045$). В люминальных А-подобных

опухолях, устойчивых к тамоксифену, значимо чаще наблюдался гетерогенный характер распределения ER α , чем в тамоксифенчувствительных опухолях ($p = 0,016$). Наличие гетерогенной экспрессии ER α в опухоли значительно сокращает период выживаемости без прогрессирования у больных с люминальным А-подобным РМЖ ($p = 0,013$).

Заключение. Отсутствие эффективного ответа на тамоксифен в люминальных В-подобных опухолях ассоциировано с наличием мутаций *ESR1* rs2228480. Развитие тамоксифенрезистентного фенотипа в люминальных А-подобных опухолях сопряжено с гетерогенностью экспрессии ER α .

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-75-30016).

Прогностическое значение стволовых клеток опухоли и экспрессии Anaplastic Lymphoma Kinase у пациентов с первичной меланомой кожи

А.М. Казаков¹, К.С. Титов², М.А. Барышникова¹,
Д.А. Рябчиков¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ГБУЗ «МКНЦ им. А.С. Логинова ДЗМ», Москва

Цель исследования — изучить влияние экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток (ОСК) — CD133 и ABCB5 — и Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) в первичной опухоли на общую и безрецидивную 2-летнюю выживаемость пациентов с первичной меланомой кожи I–II стадий. Выявить корреляцию между наличием того или иного маркера ОСК с экспрессией ALK и рядом морфологических параметров опухоли (толщина опухоли по Бреслоу, уровень инвазии по Кларку, степень выраженности лимфоидной инфильтрации (ЛИ)).

Материалы и методы. Операционный материал — 48 пациентов с диагнозом меланомы кожи I–II стадий. Гистологическое исследование (тип меланомы,

толщина по Бреслоу, уровень инвазии по Кларку, изъязвление, выраженность ЛИ, митотический индекс).

ИГХ-исследование экспрессии маркеров ABCB5 и CD133 с МА для выявления антигенов CD133 (кроличьи поликлональные к CD133 человека, разведение 1:100, ab19898, Abcam) и ABCB5 (клон 5H3C6, разведение 1:200, ab140667, Abcam).

Оценка результатов: световой микроскоп NIKON 80i. Экспрессию оценивали при помощи балльной шкалы интенсивности (0, 1+, 2+, 3+) и процента (0–100 %) позитивных клеток среди всех опухолевых клеток в образце.

Анализ экспрессии ALK: ИГХ с МА D57.3 к ALK на иммуностендере Ventana, система детекции — Ventana.

Оценка статистической значимости результатов: вычисление коэффициента корреляции методом рангов.

Результаты. Пациентов разделили на группы по наличию или отсутствию экспрессии маркеров ОСК: 1-я группа — 25 человек с экспрессией ABCB5 и/или CD133, 2-я группа — 23 пациента с отсутствием экспрессии ОСК.

1. При сравнении обеих групп обнаружена 2-летняя общая выживаемость: в 1-й группе — 76 %, во 2-й — 91,31 %; безрецидивная выживаемость: в 1-й группе — 80 %, во 2-й — 91,31 %.

2. Выявлена сильная корреляционная связь между увеличением процентного содержания клеток, экспрессирующих CD133, и увеличением уровня инвазии по Кларку ($p = 0,879 \pm 0,107$).

3. Выявлена сильная корреляционная связь увеличения процента клеток, экспрессирующих ABCB5, с увеличением толщины опухоли по Бреслоу ($p = 0,943 \pm 0,088$).

4. Обнаружено увеличение степени ЛИ у больных с повышенным процентом клеток, экспрессирующих ABCB5.

5. ALK обнаружена у 28 % пациентов с выявленными маркерами ОСК.

6. ALK чаще ассоциировалась с наличием ABCB5+ опухоли.

7. Статистически значимой связи между 2-летним прогнозом и наличием ALK не обнаружено.

Определение экспрессии маркеров ОСК является перспективным направлением в прогнозировании течения первичной меланомы кожи. Выявленная зависимость между рядом морфологических параметров опухоли и экспрессией ОСК позволит улучшить диагностику и прогнозирование течения болезни. Определение экспрессии тирозинкиназы ALK в первичной меланоме кожи перспективно для использования ингибиторов ALK.

Экспрессия мРНК актинсвязывающих белков и кальпаина-1 и -2 при метастазировании немелкоклеточного рака легкого

Е.С. Колегова¹, Г.В. Какурина¹, Е.Е. Шашова¹,
Д.Н. Костромицкий², А.Ю. Добродеев¹, И.В. Кондакова¹

¹ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер», Томск

Введение. Пятилетняя выживаемость больных НМРЛ не превышает 55 %, а наиболее частой причиной смертности оперированных больных являются гематогенные метастазы. Метастатический потенциал опухолей определяют такие процессы, как нарушение адгезивных свойств и приобретение способности к активному перемещению в экстраклеточном матриксе, важную роль в которых играет реорганизация актинового цитоскелета. Эти процессы опосредуются функционированием актинсвязывающих белков (АСБ), в связи с чем изучение уровня экспрессии генов АСБ является актуальным. Известно, что АСБ являются субстратом для кальпаиновой протеолитической системы.

Цель исследования — изучение уровня экспрессии матричной РНК (мРНК) АСБ (аденилатциклаза ассоциированного протеина 1 (CAP1), кофилина (CFL1), профилина (PFL1), фасцина (FSCN1), эзрина (EZR)) и мРНК кальпаина-1 (CAPN1) и -2 (CAPN2) в тканях больных НМРЛ в связи с метастазированием.

Материалы и методы. Материалом для исследования были опухолевая и неизменная ткани больных НМРЛ ($n = 50$). Анализ экспрессии мРНК АСБ и CAPN проводился методом ПЦР в реальном времени. Нормализация экспрессии проводилась на условно неизменную ткань и референсный ген *GAPDH*. Уровень изучаемых белков оценивался с помощью метода вестерн-блоттинга. Статистическая обработка результатов проводилась с применением пакета программ IBM SPSS Statistics 20.

Результаты. При лимфогенном метастазировании (T2–3N1M0) уровень экспрессии мРНК CAP1 и PFL1 повышается в 4 и 8 раз соответственно в ткани первичной опухоли больных НМРЛ по сравнению с опухолями без лимфогенных метастазов (T2–3N0M0). При этом наблюдается значимое снижение в 2,1 раза экспрессии мРНК CAPN1 в ткани первичной опухоли. Изучена связь изменения экспрессии мРНК АСБ и CAPN с гематогенным метастазированием. С помощью метода χ^2 и регрессии Кокса выявлено, что высокий уровень экспрессии мРНК всех АСБ при низком уровне экспрессии CAPN1 связан с развитием отдаленных метастазов. Корреляционным анализом показана коэкспрессия генов АСБ (RCAP1 — CFL = 0,750, RCFL — PFL = 0,672, RCFL — EZR = 0,555, RPFL — EZR = 0,650, $p < 0,05$). Корреляционным анализом и методом логистической регрессии показана обратная

связь экспрессии мРНК АСБ с CAPN (CAPN1 — CAP1: $R = -0,487$, $B = -8,6$; CAPN1 — CFL1: $R = -0,509$, $B = -5,6$; CAPN1 — EZR: $R = -0,525$, $B = -5,1$; CAPN1 — PFL1: $R = -0,408$, $B = -1,3$; $p < 0,05$). Полученные закономерности в изменении экспрессии мРНК были подтверждены изучением содержания этих белков с помощью вестерн-блоттинга.

Закключение. Показана зависимость экспрессии мРНК АСБ и CAPN от наличия метастазов у больных НМРЛ. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности АСБ и системы кальпаинов в процессы опухолевой прогрессии при НМРЛ. Уровни экспрессии мРНК АСБ и CAPN1 находятся в обратной зависимости в ткани опухоли при НМРЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-415-703003 p_мол_а.

Прогностическая значимость аббераций числа копий генов WNT-сигналинга в остаточной резидуальной опухоли молочной железы

Н.В. Литвяков, И.В. Дерюшева, М.М. Цыганов,
М.К. Ибрагимова, А.М. Певзнер, П.В. Казанцева,
Е.М. Слонимская

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Ранее нами было показано, что наличие в остаточной резидуальной опухоли молочной железы после НХТ 2 и более амплификаций генов стволовости обуславливает способность к стволовой пластичности опухолевых клеток и у таких пациентов в 50 % случаев возникают метастазы. При отсутствии амплификаций генов стволовости в остаточной после НХТ опухоли ни у одного больного (из 30 обследованных) метастазы не возникли (Litviakov и соавт., 2019). Была проанализирована связь наличия в опухоли сочетания амплификаций генов стволовости и амплификаций и/или делеций 150 генов WNT-сигналинга с гематогенным метастазированием. В обследование были включены 30 пациентов, у которых в остаточной резидуальной опухоли было 2 и более амплификаций генов стволовости. У 15 из них развились метастазы, и у 15 пациентов метастазов не было в 5-летнем периоде наблюдения. Сравнили CNA-генетический ландшафт остаточной резидуальной опухоли. Вначале были установлены 32 хромосомных региона с наибольшей разницей в частотах делеций и амплификаций между группами. Всего в этих хромосомных регионах локализовано 35/150 генов WNT-сигналинга. Из них после аннотирования были выделены наиболее важные гены WNT-сигналинга: 15 генов-активаторов WNT-сигналинга (*WNT2B*, *SKP1*, *TCF7*, *PPP2CA*, *WNT8A*, *MAPK9*,

CCND3, *PPP2R5D*, *WNT8B*, *CCND1*, *FZD2*, *WNT3*, *FZD9*, *WNT3*, *WNT9B*) и 7 генов негативных регуляторов (*GSK3B*, *APC*, *CSNK2B*, *SFRP5*, *BTRC*, *TCF7L2*, *CSNK2A2*), амплификации и делеции которых (соответственно) должны стимулировать WNT-сигнальный путь. Для оценки зависимости активности WNT-сигналинга от CNA была разработана балльная система и при амплификации активаторов WNT-сигналинга или делеции негативных регуляторов к общей сумме баллов прибавлялся 1 балл, и наоборот, при делеции активаторов WNT-сигналинга или амплификации негативных регуляторов от общей суммы отнимался 1 балл. Оказалось, что 93 % (14/15) больных с метастазами имели суммарный балл по CNA-генам WNT-сигналинга больше 0, в то время как 87 % (13/15) больных без метастазов имели суммарный балл, равный 0 или меньше 0. Различия между группами были статистически значимы по двустороннему критерию Фишера ($p = 0,00002$) и *log-rank*-тесту ($p = 0,00006$) при оценке по методу Каплана–Майера. Таким образом, установлена связь CNA-генов WNT в остаточной резидуальной опухоли, активирующих WNT-сигнальный путь, с метастазированием и показана их высокая прогностическая значимость.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09131).

Молекулярное профилирование раковых стволовых клеток колоректальной аденокарциномы с использованием клеточных линий и образцов опухолевой ткани

А.Ю. Лупатов¹, А.М. Гисина¹, Я.С. Ким¹, Л.К. Курбатов¹,
С.Е. Новикова¹, Д.М. Поташникова², А.В. Творогова²,
Д.В. Сидоров³, К.Н. Ярыгин¹

¹ФГБУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»,
Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ
радиологии» Минздрава России, Москва

Раковые стволовые клетки (РСК) присутствуют в составе опухолевой ткани в виде субпопуляции наиболее злокачественных клеток. Существуют доказательства, что РСК, обладая способностью к диссеминации и резистентностью к терапии, ответственны за метастазирование и рецидивы многих злокачественных новообразований. В случае колоректальной аденокарциномы наиболее распространенным маркером РСК является проминин-1 (CD133). Мы использовали цитометрическую сортировку для изоляции РСК из клеточных линий HT-29 и Сасо-2, а также из 8 образцов опухолевой ткани от пациентов с КРР. CD133-позитивные клетки обеих клеточных линий обладали

более высокой клоногенной и пролиферативной активностью в тестах *in vitro*. Полногеномный транскриптомный анализ с использованием микроносителей Agilent выявил в HT-29 и Caco-2 соответственно 10 и 70 транскриптов, экспрессия которых отличалась в 2 и более раз в CD133-позитивных по сравнению с CD133-негативными клетками. При этом CD133 оказался единственным дифференциально экспрессируемым транскриптом, общим для HT-29 и Caco-2. Количественный ПЦР-анализ ни в одной из клеточных линий не выявил увеличения экспрессии транскриптов OCT4a, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG, BMI-1 ABCB1, ABCG2 и ALDH1A1, характерных для нормальных стволовых клеток. Протеомное профилирование проводили с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения (LTQ OrbitrapVelos), сопряженной с жидкостной хроматографией. В образцах опухолевой ткани от пациентов было найдено 630 белков с различием в экспрессии между CD133-позитивными и CD133-негативными раковыми клетками. Среди наиболее значимых маркеров, обладающих повышенной экспрессией в РСК пациентов, присутствуют раковый эмбриональный антиген, белки семейства S100, дефензин. На клеточных линиях было выявлено около 80 дифференциально экспрессирующихся белков, но они отличались у каждой из линий. Кластерный анализ данных протеомного исследования показал существенное сходство профилей экспрессии белков в клинических образцах и их значительное отличие от профилей экспрессии в обеих клеточных линиях.

Таким образом, с использованием образцов опухолевой ткани мы показали, что некоторые белковые молекулы, применяемые в клинике в качестве биомаркеров, имеют существенно более высокий уровень экспрессии в CD133-позитивных клетках, которые, как правило, ассоциируют с РСК. Кроме этого, наши результаты свидетельствуют, что прямая экстраполяция данных постгеномного анализа, полученных с использованием клеточных линий, на клиническую ситуацию может быть ошибочной. Не исключено, что промил-ин-1 принимает участие в адаптации опухолевых клеток к росту *in vitro*, увеличивая их пролиферативную и клоногенную активность. При этом мы не обнаружили экспрессионных паттернов, характерных для нормальных стволовых клеток, у РСК обеих клеточных линий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-15-00360).

Эффективность неоадъювантной терапии и отдаленные результаты лечения люминального рака молочной железы в зависимости от экспрессии маркера множественной лекарственной устойчивости Pgp-170

Д.А. Рябчиков, А.М. Казаков

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Цель исследования — изучить влияние экспрессии маркера множественной лекарственной устойчивости Pgp-170 в первичной опухоли на эффективность НХТ РМЖ. Выявить корреляцию между наличием экспрессии Pgp-170 и отдаленными результатами лечения данных больных.

Материалы и методы. Операционный материал — 68 больных РМЖ, средний возраст которых составил $51,0 \pm 9,9$ года, медиана — 53 года. Оценка экспрессии Pgp-170 проводилась ИГХ-методом. Оценка клинического эффекта и степени лечебного патоморфоза — по методу Г.А. Лавниковой. Результаты обработаны стандартными пакетами Statistica v. 10 и SPSS v. 21. Отдаленные результаты лечения больных РМЖ оценены по критерию выживаемости с помощью интервального метода построения таблиц Life table.

Результаты. В ходе исследования выявлена гиперэкспрессия Pgp-170 у 20 (48,8 %) из 41 больной люминальным РМЖ и у 9 (33,3 %) из 27 пациенток с другими молекулярными подтипами. Статистически значимых различий в зависимости от подтипа РМЖ не получено. Отсутствие статистически значимых различий среднего возраста больных, стадии и гистологической формы РМЖ позволило провести корректное сравнение эффективности НХТ (CAF, AC, AT) и отдаленных результатов лечения пациенток с Pgp-положительным и Pgp-отрицательным статусом. Результаты НХТ больных с Pgp-170-позитивным статусом оказались хуже: 1) основной клинический эффект — стабилизация (44,8 %), в то время как у пациенток с Pgp-отрицательным статусом превалировал частичный эффект (64,1 %); 2) прогрессирование заболевания констатировано только у больных с гиперэкспрессией Pgp-170 (10,3 %); 3) лечебный патоморфоз III–IV степени получен в 10,3 % случаев, то время как у пациенток с Pgp-отрицательным статусом частота выраженного лечебного патоморфоза была практически в 4 раза выше и достигла 41 % ($p = 0,0048$). На следующем этапе проанализировали связь Pgp-170 с отдаленными результатами лечения 68 больных РМЖ и выявлена значимая положительная корреляция между гиперэкспрессией Pgp170 и смертностью ($r = 0,27$).

За время наблюдения скончались 27,6 % больных с Pgp-170-положительным статусом и 7,7 % — с Pgp-170-отрицательным, т. е. уровень смертности пациенток с гиперэкспрессией Pgp-170 в 3,6 раза выше ($p = 0,031$). При этом их общая 5–10-летняя выживаемость достоверно ($p = 0,012$) ниже и составила 65,6 %, когда у больных с Pgp-170-негативным статусом она достигла 91,6 %.

Таким образом, проведенное исследование выявило у больных РМЖ статистически значимую положительную корреляцию между гиперэкспрессией Pgp-170 и клиническим эффектом НХТ, статистически значимую отрицательную корреляцию гиперэкспрессии Pgp-170 с лечебным патоморфозом III–IV степени и статистически значимую положительную корреляцию гиперэкспрессии Pgp-170 со смертностью.

Урокиазная система как мишень в онкологии: большие ожидания, скромные достижения

Е.В. Семина^{1,2}, А.А. Шмакова², К.А. Рубина²,
К.Д. Рысенкова^{1,2}, П.С. Климович^{1,2}, А.С. Горбунова²,
В.А. Ткачук^{1,2}

¹Лаборатория молекулярной эндокринологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Москва;

²факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Урокиазная система, включающая протеазу урокиназу (uPA) и ее рецептор (uPAR), играет важную роль в процессах опухолевого роста и метастазирования. Запуская внеклеточный протеолиз, uPA—uPAR-система ремоделирует матрикс, разрушает базальную мембрану и активирует факторы роста и цитокины, стимулирующие пролиферацию и миграцию опухоли. Повышенный уровень uPA и uPAR сопровождает метастатические опухоли и ассоциирован с неблагоприятным клиническим прогнозом, что позволяет рассматривать uPA—uPAR-систему как перспективную мишень воздействия противоопухолевых препаратов. Известно, что uPAR вовлечен в ЭМП опухоли, сопровождая ее инвазию и метастазирование. Несмотря на существенный эффект ингибиторов uPA и uPAR, снижающих скорость роста опухоли *in vivo* и *in vitro*, такие подходы не привели к желаемому терапевтическому эффекту в клинике. Есть также данные о том, что подавление uPA—uPAR стимулирует рост опухоли, поэтому определение механизмов участия uPA—uPAR-системы в пролиферации, ЭМП, миграции и инвазии опухоли выявит новые мишени терапевтического воздействия.

Мы показали, что нокаут гена *uPAR* в клетках нейробластомы Neuro2a с использованием CRISPR снижает их пролиферацию на 60 %, уменьшает экспрессию маркера пролиферации Ki67 и запускает каспазозависимый апоптоз. Отсутствие uPAR в Neuro2a вызывает

ЭМП, стимулирует миграцию, подавляет экспрессию эпителиальных (E-кадгерина, окклюдина и клаудина-5) и активирует экспрессию мезенхимальных (N-кадгерина, ИЛ-6 и α -SMA) маркеров. Поиск механизма выявил uPA в качестве ключевого регулятора ЭМП: отсутствие uPAR на мембране Neuro2a приводит к транслокации uPA в ядро и активации транскрипционных факторов NF- κ B и Snail. Нокаут uPAR в Neuro2a увеличивает их химиорезистентность: добавление цисплатина в клетки, не экспрессирующие uPAR, снижает экспрессию каспазы-3 и низкомолекулярной формы PARP-1 по сравнению с контролем. Эти данные предполагают новый механизм функционирования uPA—uPAR-системы в опухоли, при котором uPAR, являясь «ловушкой» uPA, связывает урокиназу на мембране и регулирует ее протеазную активность, а нокаут uPAR, хотя и снижает пролиферацию клеток, тем не менее позволяет uPA проникать в ядро и активировать экспрессию генов ЭМП, что увеличивает миграторный потенциал опухоли и ее химиорезистентность.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-75-30007).

Heterogeneous expression of KIF14 contributes to decreased metastasis-free survival in breast cancer

T.S. Gerashchenko¹, E.V. Denisov¹, L.A. Tashireva¹,
S.Yu. Zolotaryova¹, N.M. Novikov¹, A.M. Kiselev²,
M.V. Zavyalova¹, N.V. Cherdyntseva¹, V.M. Perelmutter¹

¹Cancer Research Institute of the Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, the Russian Federation;

²Almazov National Medical Research Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, the Russian Federation

Background. Cell invasion is the first step towards the metastatic process and is associated with the acquisition of motile phenotype in cancer cells. However, no effective markers were developed to identify migrating cancer cells in biopsy and surgical tumor samples. Moreover, morphologically registered movement of cells does not always correlate with expression of known molecules associated with cell migration and invasion. In this study, based on the mutational landscape of breast tumors with different types of the invasive growth, we identified genes (proteins) that contribute to cancer invasion and metastasis.

Materials and methods. 80 patients (31 to 77 years old) with invasive breast carcinoma of no special type (T1–4N0–3M0) have been included. Morphological analysis was used to distinguish breast tumors with individual and collective cell invasion patterns. DNA sequencing was applied to analyze the mutational landscape of individually and collectively invaded breast tumors and to identify mutated genes that are involved in cell migration/invasion. Immunohistochemical staining was used to assess expression

of the proteins encoded by mutated genes. RNA sequencing was performed to decipher the transcriptome of cancer cells positive for invasive markers.

Results. The breast tumor with collective invasion carried more alterations in the genes involved in cell migration than the individually-invaded tumor. Moreover, the collectively-invaded tumor showed few specific mutations, for example, in the *KIF14* gene. Immunohistochemical analysis showed heterogeneous expression of the KIF14 in breast tumors, namely in multicellular structures. Cases with *KIF14* expression at the tips of "torpedo-like" structures and protrusions formed by multicellular structures demonstrated high frequency of

distant metastasis ($p < 0.05$). Metastasis-free survival was also significantly decreased in patients with heterogeneous expression of the *KIF14* in multicellular structures ($p < 0.05$). RNA-sequencing showed the enrichment of cell adhesion and locomotion in KIF14-positive tumor cells compared with KIF14-negative tumor cells.

Conclusion. Heterogeneous expression of *KIF14* contributes to decreased metastasis-free survival in breast cancer. *KIF14* expression at the tips of multicellular morphological structures may be a marker of migrating/invading tumor cells in breast cancer.

The study was supported by the Russian Science Foundation (№ 19-75-30016).

Постеры

Особенности экспрессии генов при метастазировании светлоклеточного почечно-клеточного рака

Н.В. Апанович¹, М.В. Петерс², П.В. Апанович¹,
Д.Ж. Мансорунов¹, А.С. Маркова², В.Б. Матвеев²,
А.В. Карпухин¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр
им. Н.П. Бочкова», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Светлоклеточный ПКР (скПКР) составляет примерно 80–90 % всех злокачественных новообразований данной локализации. Метастазы при этом типе рака развиваются примерно у 30–40 % больных. Механизмы развития метастазов при скПКР пока недостаточно изучены. Получение фундаментальной информации о функциональных особенностях генов при раке этой локализации могло бы в дальнейшем послужить основой для разработки диагностических и прогностических маркеров скПКР.

В работе было исследовано 56 парных образцов ткани почки (опухолевая ткань и морфологически нормальная ткань той же почки). Был изучен профиль экспрессии десяти генов, значимых для развития рака почки: *CA9*, *NDUFA4L2*, *VWF*, *IGFBP3*, *BHLHE41*, *EGLN3*, *SAI1*, *CSF1R*, *CIQA* и *FN1* — в образцах ткани скПКР. Были выделены две группы: с отсутствием метастазов (22 больных) и с синхронными метастазами (34 больных). Измерение уровня экспрессии мРНК генов проводили методом ПЦР в реальном времени.

При статистической обработке данных с использованием ROC-анализа выявили, что 8 (*CA9*, *NDUFA4L2*, *VWF*, *IGFBP3*, *BHLHE41*, *EGLN3*, *SAI1* и *CIQA*) из 10 анализируемых генов имеют статистически значимые отличия между 2 группами по уровню их экспрессии ($p \leq 0,001–0,015$). Значимыми для развития метастазов в соответствии с точным критерием Фишера ($p \leq 0,001–0,007$) оказались те же гены, которые были выявлены при ROC-анализе. Наибольшие значения OR (более 10) и RR (от примерно 2,5) найдены для генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *BHLHE41*, *EGLN3*.

Таким образом, выявлены гены, ассоциированные с развитием метастазов. Рассмотрены механизмы возникновения метастазов, связанные с этими генами. Для генов *NDUFA4L2*, *VWF*, *CIQA* связь с развитием метастазов при раке почки выявлена впервые. Уровень экспрессии этих генов в группе без метастазов повышенный. Снижение уровня их экспрессии в группе

с синхронными метастазами ассоциировано с плохим прогнозом для развития метастазов. Исключением является ген *SAI1*, для которого неблагоприятный прогноз связан с повышением уровня его экспрессии.

Особенности гетерогенности раковоассоциированных фибробластов рака молочной железы

Т.В. Безуглова¹, М.В. Мнихович^{1,2}, Л.В. Кактурский^{1,2},
Камаль Халави Скафи³, И.В. Васин^{4,5}, С.В. Снегур⁴,
Ю.Г. Павлова^{4,5}, Д.С. Куш², Н.Г. Малюгин², А.В. Романов²,
Н.В. Золотенкова⁶, К.В. Буньков⁷

¹ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

³Медицинский центр «Клалит», Иерусалим, Израиль;

⁴ГБУ РО «Рязанская областная клиническая больница», Рязань;

⁵ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань;

⁶ГБУЗ «Городская клиническая больница № 17 ДЗМ», Москва;

⁷ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии»,
Смоленск

Раковоассоциированные фибробласты (CAF) являются ключевым компонентом стромы опухоли и играют важную роль в ее прогрессии. Опухолевые клетки тесно взаимодействуют со своим микроокружением (стромой), которое включает в себя CAF, иммунные клетки, эндотелиальные клетки, перициты и компоненты внеклеточного матрикса. Все они способствуют росту опухолевых клеток, осуществляют иммуносупрессивную и проангиогенную функцию и индуцируют развитие ЕМТ. Описаны 6 типов CAF: связанные с экспрессией α -гладкомышечного актина (α -SMA), подопланина, гиалуроната, фибробласт-активированного протеина, белка S100A4, тромбоцитарного фактора роста (PDGF).

Цель исследования — изучить гетерогенность CAF в карциноме молочной железы неспецифического типа.

Материалы и методы. Нами изучено 82 случая карциномы молочной железы неспецифического типа. Использовалась световая микроскопия, проведено ИГХ- и гистохимическое исследование с применением панцитокератина AE1/AE3, цитокератина 18 (CK18), Е-кадгерина, виментина, подопланина, α -SMA, CD44, альцианового синего (рН 2,5–2,7) и PAS-реакции.

Результаты. В карциноме молочной железы неспецифического типа нами выявлены 3 разновидности

CAF: связанные с α -SMA, подопланином, CD44 и гиалуронатом. Экспрессия всех 4 маркеров была максимально выражена в зонах инвазивного роста (зона ЭМП), а в паренхиме опухоли, в ее центральной части, практически отсутствовала. Положительная экспрессия гиалуроната и CD44 в CAF свидетельствует о принадлежности их к мезенхимальным стволовым клеткам. ИГХ CAF определялись во всех случаях ЭМП, следовательно, можно предположить, что они стимулируют ЭМП.

Метилированные микроРНК при переходе от первичных опухолей к перитонеальным метастазам рака яичников, их потенциальные гены-мишени

А.М. Бурденный^{1,2}, И.В. Пронина¹, В.И. Логинов^{1,3},
Е.А. Филиппова¹, Т.П. Казубская⁴, Д.О. Уткин⁴,
Н.Е. Кушлинский⁴, Э.А. Брага^{1,3}

¹ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва;

²ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эммуэля РАН», Москва;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», Москва;

⁴ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

МикроРНК (миРНК) и метилирование их генов играют критичную роль в регуляции процессов онкогенеза. РЯ характеризуется высокой частотой летальных исходов, связанных с метастазированием. Повышенный процент метилированных в опухолях генов миРНК в сравнении с генами, кодирующими белки, делает их перспективными маркерами рака. Ранее нами на основе метилированных генов миРНК составлены эффективные системы маркеров для диагностики и прогноза метастазирования РЯ, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью (75–90 %, AUC $\geq 0,9$).

Данная работа направлена на определение роли метилированных миРНК при переходе от первичных опухолей к макрометастазам. Методами метилспецифичной ПЦР и количественной ОТ-ПЦР построены профили метилирования и экспрессии 21 миРНК и 17 биоинформатически предсказанных генов-мишеней, потенциально вовлеченных в ЭМП. Исследованы 82 парных образца (опухоль/норма) РЯ, включающих 45 первичных опухолей от пациенток без метастазов и 37 — от пациенток с метастазами, а также 19 макрометастазов в брюшину. Для ряда пар миРНК — мРНК определена значимая отрицательная корреляция ($R_s = -0,3... -0,4$), показывающая потенциальную роль miR-137 в регуляции BCL6 и TP53, miR-129-5p — в регуляции RHOA, miR-148a-3p — в регуляции NF1B, miR-132-3p — в регуляции TGFB2.

Интересно, что при переходе от первичных опухолей пациентов без метастазов к первичным опухолям пациентов с метастазами отмечена специфичная перемена свойств miR-203a и miR-375 от онкогенных с повышенной экспрессией к антиметастатическим с гиперметилированием и сниженной экспрессией. Это наблюдение позволяет предположить роль miR-203a и miR-375 в метастазировании на этапе ЭМП; miR-148a-3p не проявляет супрессорные свойства в первичных опухолях как до, так и после метастазирования, но ее ген гиперметилирован и снижает экспрессию в половине макрометастазов в брюшине. Этот результат может указывать на антиметастатические свойства miR-148a-3p, которые проявляются только после колонизации метастазов с образованием вторичных опухолей, и на ее возможную роль в обратном переходе — ЭМП.

Полученные результаты важны для выяснения роли метилированных миРНК в процессах перепрограммирования опухолевых клеток при метастазировании РЯ и для определения новых генов-мишеней этих миРНК.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований для государственных академий на 2013–2020 гг. (грант № 0520-2019-0030).

Опыт редактирования генома *in vivo* для исследования механизма перепрограммирования транскрипции

Е.А. Варламова^{1,2}, В.А. Калмыков¹, Е.Н. Коршунов¹,
Д.С. Коршунова¹, А.А. Штиль^{1,2}, Ю.Ю. Силаева¹,
А.В. Дейкин¹

¹ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

CDK8 — серинзависимая протеинкиназа, участвующая в перепрограммировании генной транскрипции. Вместе с циклином С и компонентами комплекса Mediator CDK8 регулирует экспрессию активно транскрибируемых генов — в развитии организма, ответах на внешние стимулы. В опухолевых клетках CDK8 опосредует перепрограммирование транскрипции, сопровождающее выживание и становление лекарственной устойчивости. Для исследования роли CDK8 *in vivo* проведено редактирование генома мышей C57BL6. С помощью системы CRISPR/Cas9 и матрицы для гомологичной рекомбинации получены первичные трансгенные мыши, в геноме которых заменен фенилаланин на глицин в положении 97 экзона 3 гена *cdk8* (F97G). Такая мутация ослабляет киназную активность *cdk8*. Трансгенных животных получали инъекцией оплодотворенной яйцеклетки. Выжившие зиготы на стадии двухбластомерных эмбрионов трансплантировали в яйцевод самки-реципиента. В эксперименте

использованы 22 реципиента, перенесены 137 эмбрионов. Родивших самок было 4, у 4 реципиентов отмечен аборт на поздних стадиях. По результатам секвенирования ДНК среди 8 родившихся мышат выявлены трансгенные особи: 1 гетерозиготный носитель мутации (самец) и носители мозаик (модификация 20–25 % генома). Невысокая частота рождения жизнеспособных мышат позволяет предположить, что нарушение структуры гена *cdk8* (в результате офф-таргетного редактирования и иных причин) может быть летальным. Жизнеспособные особи будут использованы в экспериментах по скрещиванию и исследованию роли транскрипционного перепрограммирования в многочисленных биологических ситуациях.

Работа поддержана грантом Минобрнауки России (соглашение № 14.W03.31.002 с Институтом биологии гена РАН).

Экспрессия микроРНК при метастазировании рака молочной железы в лимфатические узлы

К.А. Гришина¹, Н.И. Поспехова², В.А. Хайленко²,
А.В. Карпунин¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Рак молочной железы является наиболее распространенным типом рака среди женщин и каждый год диагностируется у 2,1 млн больных. Метастазирование РМЖ является серьезным осложнением заболевания и приводит к 40 тыс. смертельных случаев в год. На сегодняшний день механизмы раннего метастазирования изучены недостаточно, в связи с чем была проанализирована экспрессия 4 микроРНК (miR-34a, -145, -125b и -222), отобранных биоинформатическим путем как наиболее значимых для инициации метастатического процесса при РМЖ в группе больных РМЖ с T(1–2)N1M0. Экспрессия микроРНК была измерена в 40 образцах опухолей молочной железы по отношению к парной нормальной ткани молочной железы в 2 группах больных с РМЖ: без метастазирования и с метастазированием в лимфатические узлы. Все больные не подвергались воздействию лучевой терапии и ХТ. В группе больных с метастазированием в лимфатические узлы (N1) выявлена повышенная экспрессия микроРНК miR-125b и -222 по отношению к группе без метастазирования, ассоциированная с метастазами в лимфатические узлы ($p = 0,01$). Ранее было показано, что эти микроРНК участвуют в процессах ЭМП. ЭМП характеризуется приобретением опухолевыми клетками инвазивных свойств. Повышенная экспрессия miR-125b приводит к реорганизации актинового цитоскелета, действуя через свою прямую мишень — ген-супрессор

опухоли *STARD13*. МикроРНК miR-222 также способствует ЭМП, влияя на экспрессию генов-мишеней *TRPS1* и *ZEB*.

Таким образом, miR-125b и -222 способны стимулировать метастазирование РМЖ на ранней стадии посредством активации ЭМП. Выявленные характеристики связи экспрессии указанных микроРНК с метастазированием РМЖ (ОШ 2,16 и 6,00 соответственно) определяют их, особенно miR-222, в качестве кандидатов в биомаркеры для оценки вероятности ранних метастазов РМЖ в лимфатические узлы.

Исследование роли белков Musashi-2 и NEDD9 в регуляции ответа на таргетную терапию против рецептора эпидермального фактора роста при раке легкого

А.Я. Денека, М.В. Тихомирова, И.Г. Серебрянский,
З.И. Абрамова, Я.А. Бумбер

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Республика Татарстан

Смертность при заболевании НМРЛ занимает лидирующее место среди онкологических заболеваний. Исследование биологических механизмов патогенеза данного заболевания и поиск новых мишеней для таргетной терапии являются особенно значимыми.

Цель исследования — оценка роли белков NEDD9 и Musashi-2 в качестве регуляторов ответа на терапию ингибиторами рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) при НМРЛ.

NEDD9 является поддерживающим белком в сигнальных каскадах интегринов FAK/SRC и рецепторов с тирозинкиназной активностью, таких как EGFR, причем NEDD9 способен стимулировать активность эффекторов EGFR — киназ AKT и ERK1/2. В свою очередь, EGFR способствует фосфорилированию NEDD9, усиливая его активность в регулировании клеточной миграции и инвазии. Оба этих белка высокорелевантны в клинике, так как мутации EGFR обнаруживаются в 15 % случаев НМРЛ, а повышенная экспрессия NEDD9 — более чем в 30 %.

При исследовании роли NEDD9 в патогенезе НМРЛ с использованием мышиной модели нами было обнаружено, что нулевой генотип NEDD9 был связан с более быстрым ростом и инвазией опухолей в легких мышей, а также сопровождался повышенными уровнями белка Musashi-2. При анализе клеточных моделей НМРЛ с измененными уровнями Musashi-2 мы обнаружили, что этот белок напрямую связывается и его уровни положительно коррелируют с уровнями EGFR. Полученные нами данные указывают на то, что Musashi-2 выборочно необходим для жизнеспособности клеток EGFR-мутантного НМРЛ, а уровни

экспрессии NEDD9 способны регулировать чувствительность к ингибиторам EGFR в некоторых типах клеток. Ранее о роли NEDD9, влияющей на экспрессию Musashi-2, а также об оценке взаимодействий NEDD9 и Musashi-2 в качестве модуляторов ответа на таргетную терапию EGFR не сообщалось.

Часть работы выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-315-00307).

Популяция с фенотипом опухолевых стволовых клеток в культуре рака молочной железы человека демонстрирует экспрессию генов, вовлеченных в эпителиально-мезенхимальный переход

М.С. Ермаков^{1,2}, А.А. Нуштаева², А.В. Герасимов³,
В.А. Рихтер², О.А. Коваль^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный университет», Новосибирск;

²ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск;

³ГБУЗ НО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер», Новосибирск

Эпителиально-мезенхимальный переход играет центральную роль в различных физиологических и патологических процессах — эмбриогенезе, заживлении ран, фиброзной трансформации ткани и опухолевой прогрессии. Уже показано, что при развитии метастазов и последующей инвазии клетки должны вступить в ЭМП, чтобы мигрировать через внеклеточный матрикс из опухолевого узла для распространения по кровеносному руслу в отдаленные органы, чтобы образовать микрометастазы. Активация ЭМП сопровождается изменением экспрессии по меньшей мере 400 различных генов.

Путем импульсной гипоксии из первичных культур клеток РМЖ человека нами были получены парные культуры опухолевых клеток с эпителиальным и мезенхимальным фенотипами и экспрессией соответствующих фенотипу молекулярных маркеров — поверхностных и внутриклеточных. В полученных культурах методом ПЦР в реальном времени была проведена оценка относительного уровня мРНК генов, вовлеченных в ЭМП: *SLUG*, *ZEB1*, *ZEB2*, *TWIST1* и *OVOL2*. Экспрессия гена *OVOL2* была достоверно выше в культурах с эпителиальным фенотипом. Показано, что культуры с эпителиальным фенотипом имели низкий уровень экспрессии генов *TWIST*, *SLUG*, *Zeb1* и *Zeb2*, а культуры с мезенхимальным фенотипом — высокий. Методом проточного клеточного сортирования из культур с эпителиальным фенотипом были получены популяции клеток, экспрессирующие маркеры

опухолевых стволовых клеток (ОСК) — *CD44*, *ALDH*, *CD133*. Обнаружено, что уровень экспрессии *SLUG*, *ZEB1*, *ZEB2* и *TWIST1* в ОСК был сопоставим с уровнем экспрессии этих генов в соответствующих парных культурах с мезенхимальным фенотипом. Таким образом, можно заключить, что опухолевым стволовым клеткам соответствует профиль экспрессии генов *SLUG*, *ZEB1*, *ZEB2* и *TWIST1*, характерный для состояния ЭМП.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Правительства Новосибирской области в рамках гранта за 2019 г.

Взаимодействие метилтрансферазы Set7/9 и γ-катенина в опухолевых клеточных моделях человека

А.В. Жарова, О.Ю. Шувалов, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Изучение лизиновых метилтрансфераз особо актуально в контексте регуляции негистоновых белков, которые вовлечены в контроль пролиферации и клеточного цикла. Нарушение функционирования данного класса ферментов характерно для многих злокачественных опухолей. Метилтрансфераза Set7/9 является важным регулятором онкогенеза. Одним из недавно обнаруженных нами негистоновых белков, взаимодействующих с Set7/9, является γ-катенин (плакоглобин) — гомолог β-катенина, ключевого элемента в сигнальной трансдукции, опосредованной Wnt. Данное исследование направлено на изучение механизмов взаимодействия метилтрансферазы Set7/9 и γ-катенина в опухолевых клеточных моделях человека. Нами было подтверждено физическое взаимодействие между γ-катенином и метилтрансферазой Set7/9. Обнаружено, что нокаут гена *SETD7* вызывает изменение экспрессии генов *CCND1*, *CTNNB1* и *JUP*, а также количества их белковых продуктов. Показано, что нокаут гена *SETD7* вызывает изменение локализации β- и γ-катенинов в клетке. При нокауте гена *SETD7* миграционный потенциал клеточной линии НЕК 293Т не изменяется, однако миграционный потенциал клеток А549 возрастает, что, по-видимому, свидетельствует о различном влиянии Set7/9 на клетки в зависимости от контекста.

Работа выполнена в рамках гранта № 14.W03.31.0029 Правительства России.

Влияние эффектора малой ГТФазы Rac белка ANKS1A на подвижность нормальных и опухолевых клеток

А.В. Жолудева^{1,2}, Е.А. Орлова^{1,2}, М.Е. Ломакина¹,
А. Полесская³, А. Готро³, А.Ю. Александрова¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва;

²биологический факультет ФГБОУ ВО

«МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³CNRS UMR7654, Ecole Polytechnique, Палезо, Франция

Введение. Поиск новых тонких регуляторов миграционной активности клеток представляется интересным для исследования механизмов метастазирования и разработки новых подходов к терапии опухолей. Одним из основных сигнальных путей, регулирующих клеточную подвижность, является путь Rac-WAVE-Arp2/3, отвечающий за полимеризацию актиновой сети. Недавно был обнаружен белок Anks1, один из эффекторов Rac, участие которого в регулировании реорганизации актина не изучено. Есть данные, что Anks1a оказывает влияние на миграцию опухолевых клеток, возможно, за счет усиления интенсивности обмена рецепторов к эпидермальному фактору роста (EGF) на поверхности опухолевых клеток. Показано, что экспрессия Anks1a повышена во многих опухолевых клетках и гиперэкспрессия Anks1a в клетках НМРЛ ассоциирована с более продвинутой стадией заболевания.

Цель исследования — анализ влияния экспрессии белка ANKS1A на реорганизацию актинового цитоскелета и подвижность нормальных и опухолевых клеток.

Материалы и методы. Были использованы 3 линии клеток: MCF-10A — условно-нормальные клетки молочной железы; MDA-MB-231 — трижды негативная аденокарцинома молочной железы человека (нет экспрессии HER2/ErB2-рецептора); SK-BR-3 — аденокарцинома молочной железы человека (рецептор HER2/ErB2 амплифицирован). Экспрессию белка ANKS1A подавляли с помощью трансфекции малыми интерферирующими РНК. Для выявления изменений актинового цитоскелета и миграционных особенностей клеток использовали иммунофлуоресцентное окрашивание и прижизненную видеомикроскопию.

Результаты. Эффект подавления экспрессии ANKS1A различается в клетках, несущих рецепторы к EGF и не несущих. Супрессия белка ANKS1A в клетках, в которых есть рецептор HER2/ErB2 (MCF-10A и SK-BR-3), ожидаемо приводит к подавлению стимулирующего действия EGF на миграцию и пролиферацию клеток. Однако в клетках, в которых нет данного рецептора, подавление экспрессии ANKS1A вызывает разборку межклеточных контактов, увеличение степени расплывания клеток на субстрате и изменение характера их движения. В целом эти изменения сходны с теми, которые вызываются конститутивной

активацией малой ГТФазы Rac1. Мы также проанализировали изменения актинового цитоскелета и внутриклеточное распределение ANKS1A (ядерное vs цитоплазматическое) при подавлении экспрессии ANKS1A в исследуемых культурах.

Заключение. Полученные результаты указывают на то, что роль ANKS1A в регулировании миграции опухолевых клеток не ограничивается регуляцией обмена рецепторов HER2/ErB2. ANKS1A также непосредственно вовлечен в регуляторный путь малой ГТФазы Rac, для которой показана важная роль в обеспечении ЭМП — 1-го этапа приобретения клетками миграционного фенотипа. Дальнейшие исследования необходимы для выявления механизмов участия ANKS1A в метастазировании и определении возможности использования оценки его экспрессии как прогностического фактора при развитии опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-54-16006 НЦНИЛ_а).

Транскриптом WAVE2-позитивных клеток рака молочной железы

С.Ю. Золотарева¹, Т.С. Геращенко¹, Л.А. Таширева¹,
А.М. Киселев^{1,2}, Н.М. Новиков¹, А. Готро³,
М.В. Завьялова¹, В.Н. Перельмутер¹, Е.В. Денисов¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

³CNRS UMR7654, Ecole Polytechnique, Палезо, Франция

Введение. Метастазирование является основной причиной смерти при РМЖ. Первым этапом метастазирования является опухолевая инвазия. Механизмы инвазии до сих пор остаются недостаточно изученными. Известно, что белки семейства Wave активируют комплекс Arp2/3, ремоделируют актиновый цитоскелет, способствуют формированию ламеллиподий и тем самым клеточной миграции (Krause M., Gautreau A., 2014). Недавно нами было показано, что экспрессия белка WAVE2 в опухолевых клетках, локализованных на концах трабекулярных структур, ассоциирована с высокой частотой отдаленного метастазирования и плохой безметастатической выживаемостью больных РМЖ (Новиков и соавт., 2018). Однако молекулярная природа WAVE2-позитивных клеток, находящихся на концах трабекулярных структур РМЖ, неизвестна.

Цель исследования — изучение транскриптома клеток РМЖ, позитивных по экспрессии белка WAVE2.

Материалы и методы. В исследовании были использованы образцы опухолевой ткани, полученные в ходе оперативного вмешательства по поводу РМЖ. С помощью лазерной микродиссекции были выделены опухолевые клетки, позитивные и негативные по экспрессии WAVE2 в пределах трабекулярных структур.

Образцы РНК, выделенные из опухолевых клеток, использовались для подготовки РНК-библиотек (SMARTer Stranded Total RNA-SeqKit v2, Clontech). Секвенирование проводили на платформе NextSeq500 в режиме PE75 (Illumina). Биоинформатическая обработка данных осуществлялась с помощью программного обеспечения STAR и пакета DESeq2 в среде R/Bioconductor. Идентификация биологических процессов и сигнальных путей проводилась с помощью онлайн-инструмента PANTHER.

Результаты. В WAVE2-позитивных клетках обнаружена значительная гиперэкспрессия малой ядерной РНК SNHG1, длинной некодирующей РНК MALAT1 и генов, кодирующих рецептор к костному морфогенетическому белку (BMP R1B) и N-ацилсфингозинамидагидролазу-1. По литературным данным, эти транскрипты вовлечены в регуляцию клеточной миграции и опухолевой инвазии. Кроме того, для WAVE2-позитивных клеток была характерна гиперэкспрессия генов сигнальных путей холецистокининовых рецепторов, воспаления и ответа на гипоксию через активацию гипоксического фактора HIF-1 α . Функциональное аннотирование дифференциально экспрессирующихся генов показало выраженность биологических процессов, вовлеченных в локомоцию, в WAVE2-позитивных опухолевых клетках по сравнению с WAVE2-негативными клетками.

Закключение. WAVE2-позитивные клетки, находящиеся на концах трабекулярных структур РМЖ, характеризуются локомоторным и инвазивным фенотипом, что, вероятно, объясняет механизм их вклада в гематогенное метастазирование.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 19-75-30016).

Распределение эффектора Ras, SASH1 в нормальных и трансформированных эпителиальных клетках

А.С. Ильницкая¹, И.Ю. Житняк¹, А. Готро²,
Н.А. Глушанкова¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²CNRS UMR7654, Ecole Polytechnique, Полезо, Франция

SASH1 является адаптерным сигнальным белком, имеющим в своей структуре домены SAM и SH3, отвечающие за межбелковые взаимодействия. Ранее было обнаружено, что SASH1 является эффектором Ras, также показано его взаимодействие с кортактином. Для некоторых типов опухолей SASH1 рассматривается в качестве опухолевого супрессора. С использованием конфокальной микроскопии нами было проведено иммунофлуоресцентное исследование распределения SASH1 в культурах нормальных эпителиальных клеток

IAR-20 и IAR-2, трансформированных *in vitro* эпителиоцитов линии IAR-6—1, а также эпителиоцитов линии рака толстой кишки HT-29. Нормальные эпителиоциты IAR-20 и IAR-2 и эпителиоциты HT-29, имеющие эпителиальный фенотип, образовывали стабильные линейные межклеточные адгезионные контакты (АК), ассоциированные с кольцевыми актиновыми пучками. В этих клетках SASH1 локализовался с кольцевыми пучками и линейными АК. В ламеллиподиях SASH1 не детектировался. Под воздействием эпидермального фактора роста клетки IAR-20 и HT-29 проходили ЭМП. ЭМП в культурах IAR-20 и HT-29 имел существенные различия. При прохождении ЭМП клетки IAR-20 утрачивали стабильную межклеточную адгезию, однако сохраняли аккумуляцию Е-кадгерина в нестабильных радиальных АК, ассоциированных с прямыми актиновыми пучками. Окрашивание SASH1 было слабо выражено в инициальных (точечных) АК, однако в более зрелых радиальных АК аккумуляция SASH1 была значительной. Радиальные АК также были характерны для трансформированных эпителиоцитов IAR-6—1, иммунофлуоресцентное окрашивание показало наличие SASH1 в таких контактах. При прохождении ЭМП клетками HT-29 наблюдались полное разрушение АК и эндоцитоз Е-кадгерина, что также приводило к разрушению стабильной межклеточной адгезии. SASH1 уходил из зон межклеточного взаимодействия, но обнаруживался в краевых актиновых пучках. В ламеллиподиях активного края мигрирующих клеток SASH1 не детектировался. Таким образом, SASH1 ассоциирован с актиновыми пучками АК нормальных и трансформированных эпителиоцитов. Роль SASH1 в межклеточных взаимодействиях нормальных и опухолевых клеток требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-54-16005).

Ассоциация хитиназоподобного белка UKL-39 с метастазированием у больных раком толстой кишки

Е.О. Казакова¹, И.В. Ларионова^{1,2}, Е.С. Григорьева^{1,2},
М.В. Завьялова^{2,3}, Ю.Г. Кжышковска^{1,4}

¹Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИИЦ РАН», Томск;

³ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск;

⁴Институт трансфузионной медицины и иммунологии, Медицинский факультет Маннгейма, Университет Гейдельберга, Гейдельберг, Германия

Опухлеассоциированные макрофаги (ОАМ) являются одним из основных компонентов опухолевого микроокружения (Noy R., 2014). При раке толстой

кишки (РТК) роль ОАМ остается противоречивой. Одни исследования указывают на противоопухолевую роль макрофагов, которые связаны с высокой выживаемостью пациентов (Forsell J., 2007). Другие — на связь ОАМ со снижением выживаемости и ранним рецидивированием (Garvin S. и соавт., 2018). Белок YKL-39 относится к семейству хитиназоподобных белков (Kzhyshkowska J., 2016), играющих важную роль в процессах воспаления и развития опухоли. Ранее мы показали, что YKL-39, способствующий привлечению моноцитов и ангиогенезу, связан с плохим прогнозом и метастазированием у пациентов с РМЖ после НХТ (Liu T., 2018). Однако роль YKL-39 в прогрессировании РТК остается неизученной.

В настоящей работе нами проведено ИГХ-исследование опухолей на наличие белковой экспрессии YKL-39. В исследование были включены 54 пациента с морфологически верифицированным диагнозом аденокарциномы толстой кишки, из которых 37 пациентов получали НХТ, а 17 пациентов не получали предоперационное лечение. Эффективность НХТ оценивалась по шкале RECIST.

Было обнаружено, что среди пациентов с РТК без предоперационного лечения экспрессия YKL-39 была статистически значимо ниже в группе пациентов с наличием как лимфогенных ($1,71 \pm 0,75$, $n = 7$), так и отдаленных метастазов ($1,33 \pm 0,5$, $n = 3$) по сравнению с группой без метастазов ($2,80 \pm 0,91$, $n = 10$, $p = 0,03$ и $2,57 \pm 0,93$, $n = 14$, $p = 0,048$ соответственно). Кроме того, экспрессия YKL-39 негативно коррелировала с количеством лимфатических узлов с метастазами ($R = -0,89$, $p < 0,01$). В группе пациентов с НХТ экспрессия YKL-39 оставалась статистически значимо ниже при наличии лимфогенных метастазов ($1,83 \pm 0,83$, $n = 12$) по сравнению с группой без лимфогенного метастазирования ($2,44 \pm 0,58$, $n = 25$, $p = 0,027$). Более того, в группе пациентов, получавших НХТ, наблюдалась тенденция к повышению экспрессии YKL-39 при наличии объективного положительного ответа на НХТ по сравнению с отсутствием объективного ответа ($2,42 \pm 0,58$, $n = 24$ против $1,93 \pm 0,86$, $n = 13$, $p = 0,075$).

В работе мы показали возможную прогностическую значимость хитиназоподобного белка YKL-39 в отношении отсутствия метастазирования и наличия объективного ответа на НХТ у больных РТК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-15-00151).

Связь уровня экспрессии мРНК протеинфосфатазы 1В с экспрессионным профилем генов, участвующих в ремоделировании цитоскелета

Г.В. Какурина, Д.Е. Кульбакин, О.В. Черемисина,
И.В. Кондакова, Е.Л. Чойнзонов

ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Процессы дефосфорилирования контролируют различные клеточные процессы, и их дерегуляция связана с агрессивностью опухоли. У больных раком гортани/гортаноглотки (РГ) ранее нами обнаружено увеличение содержания протеинфосфатазы 1В (PPM1B). Вклад PPM1B в онкогенез мало изучен.

Цель исследования — оценка связи между уровнями экспрессии гена *PPM1B* и генов белков, ассоциированных с ремоделированием цитоскелета (*SNAIL*, *VIM*, *RND3*), кофилина (*CFN1*), профилина (*PFN1*), эзрина (*EZR*), фасцина (*FSCN1*) и аденилициклаза-ассоциированного белка 1 (*CAP1*).

Материалы и методы. Уровень экспрессии мРНК оценивали методом ПЦР в режиме реального времени по технологии Sybr Green и рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$ в парных образцах ткани 48 больных РГ (T1–4N0–2M0) относительно гена-рефери *GAPDH*. Были сформированы группы с низкой и высокой экспрессией *PPM1B*. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 6.0.

Результаты. Корреляционный анализ показал, что уровень экспрессии мРНК *PPM1B* отражался на уровне экспрессии мРНК *RND3*, *FSCN1* и *PFN*. Также отмечена связь экспрессии *PFN* с уровнем экспрессии *CFN1* и *CAP1* ($r = 0,5$), экспрессии *CAP1* — с появлением рецидивов после комбинированного лечения ($r = 0,4$). На фоне низкой экспрессии *PPM1B* отмечен низкий уровень экспрессии *FSCN1* и *PFN*. С увеличением уровня экспрессии *PPM1B* увеличивался уровень *FSCN1* в 9 раз ($p = 0,001$) и *PFN* — в 8,5 раза ($p = 0,01$). Рост уровня экспрессии *RND3* в 4,5 раза ($p = 0,06$) и *CAP1* в 2 раза ($p = 0,07$) отмечен на уровне тенденции. Обнаруженная нами коэкспрессия гена *PPM1B* и генов, участвующих в реорганизации цитоскелета, — *RND3*, *FSCN1* и *PFN* — говорит об участии PPM1B в клеточных процессах, связанных с агрессивностью опухолей, таких как высокая пролиферативная активность и подвижность опухолевых клеток.

Заключение. На представленной выборке больных РГ показана коэкспрессия генов белков, ассоциированных с ремоделированием цитоскелета, — *RND3*, *FSCN1* и *PFN* — и гена *PPM1B*, что имеет теоретическую значимость и может являться предпосылкой для разработки новых методов прогноза и/или терапии опухолевых заболеваний.

Биологическая роль раково-тестикулярных антигенов — семеногелинов 1 и 2 в клетках рака легкого

А.И. Кизенко, О.Ю. Шувалов, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Белки семеногелин 1 (Semg1) и семеногелин 2 (Semg2) были описаны как основные компоненты плазмы семенной жидкости. Семеногелины и продукты их протеолиза выполняют ряд важных функций в семенной жидкости, например регулируют подвижность и капацитацию сперматозоидов.

Одновременно с этим в ряде исследований было показано, что семеногелины могут быть детектированы как в клинических образцах злокачественных новообразований различного генеза, так и в крови онкобольных пациентов, например в случае рака легкого. При этом какие-либо данные о биологических функциях семеногелинов в злокачественных опухолях на сегодняшний день отсутствуют.

Проведенный нами биоинформатический анализ выявил корреляцию между уровнем экспрессии семеногелинов и низкой выживаемостью пациентов при ряде злокачественных новообразований. Для определения функций данных белков в раковых клетках мы идентифицировали белки-интерактанты методом GST-пулдауна с последующей масс-спектрометрией. Semg1 и Semg2 взаимодействуют с такими функциональными группами белков, как ферменты метаболизма, белки сплайсосомы, и белками — участниками ответа на стресс. Среди ферментов метаболизма было обнаружено взаимодействие семеногелинов с лактатдегидрогеназой и пируваткиназой. Анализ количества и активности данных ферментов в клетках с конститутивной лентивирусной экспрессией Semg1 и Semg2 показал, что сверхэкспрессия семеногелинов вызывает повышение как количества, так и уровня активности данных ферментов по сравнению с контролем. Несмотря на то, что семеногелины являются секретируемыми белками, есть данные об их внутриядерной локализации в сперматозоидах. В связи с этим мы выявили эндогенные белки в различных клеточных линиях рака легкого с использованием метода иммуноцитохимического окрашивания. Было выяснено, что, несмотря на гомологию белковых последовательностей, около 80 % Semg1 и Semg2 имеют различную внутриклеточную локализацию.

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о потенциальной биологической роли семеногелинов в регуляции онкоассоциированного метаболизма.

*Работа выполнена в рамках гранта
№ 14.W03.31.0029.*

Иммунное и ангиогенное микроокружение как фактор стимуляции инвазии при плоскоклеточном раке шейки матки ранних стадий

О.В. Курмышкина, А.А. Богданова, П.И. Ковчур,
Т.О. Волкова

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск

Молекулярные механизмы взаимосвязи между ключевыми составляющими процесса опухолевой прогрессии — инвазией, неоангиогенезом, метастазированием и реакциями иммунного ответа — активно исследуются, так как они определяют фенотипическую пластичность опухоли и недостаточную эффективность стандартных методов лечения. Значительный интерес представляют механизмы, активация которых сопровождает начальный этап инвазивного роста опухоли и, следовательно, может обеспечивать ее прогрессию и дальнейшее метастазирование; среди них большое внимание уделяется формированию воспалительного микроокружения, системе контрольных иммунных точек, внутриклеточным сенсорам врожденного иммунитета, иммуносупрессорным и проангиогенным цитокинам. В отношении РШМ, ассоциированного с папилломавирусной инфекцией, данные вопросы мало разработаны.

В проведенном нами исследовании был проанализирован транскриптом образцов опухолевой ткани преинвазивного рака и ранней инвазивной плоскоклеточной карциномы шейки матки (стадии I и II, включая микроинвазивный рак) с помощью РНК-секвенирования (RNA-Seq). Профили экспрессии генов-регуляторов реакций иммунного ответа и медиаторов (лимфо-)ангиогенеза, активируемых или подавленных на этапе активации инвазивного роста РШМ, были сопоставлены с профилями экспрессии генов, контролирующими процессы ЭМП и клеточной миграции (инвазии). Результаты RNA-Seq были дополнены анализом сигнальных путей; кроме того, все полученные данные были соотнесены с паттернами экспрессии структурных маркеров эпителиальной или мезенхимальной тканевой морфологии. Для анализа опухолевого микроокружения преинвазивного и инвазивного РШМ на клеточном уровне использовалась мягкая ферментативная диссоциация образцов ткани с последующей проточной цитофлуориметрией полученной клеточной суспензии. В составе иммунного микроокружения была выделена популяция CD4+ и CD8+ опухолинфильтрующих лимфоцитов, для которых оценивался паттерн коэкспрессии маркеров регуляторных Т-клеток и контрольных точек иммунного ответа (PD-1/-L1, TIM3, LAG3).

Для неиммунного компонента микроокружения охарактеризован паттерн коэкспрессии маркеров лимфоангиогенеза и ЭМП-VEGFR3, с-MET, SLUG и EpCAM.

Полученные результаты свидетельствуют о вкладе механизмов врожденного иммунитета в создание воспалительного микроокружения и в нарушение процессов активации иммунного ответа в условиях хронического воспаления при формировании инвазивного поведения РШМ. Выявленные взаимосвязи между локальным иммунным профилем и специфическим паттерном экспрессии регуляторов (лимфо-)ангиогенеза, ЭМП и инвазии указывают на важность комплексного анализа иммунного, воспалительного и ангиогенного профиля опухоли при разработке и прогнозировании эффективности стратегий комбинированной терапии инвазивного метастатического РШМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-15-01024).

Клиническая значимость разных типов опухолевых сосудов при раке шейки матки

Е.В. Макарова, М.А. Сеньчукова

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург

Для изучения морфологии и клинической значимости разных типов сосудов при РШМ были ретроспективно исследованы образцы опухолей 63 пациентов с плоскоклеточным РШМ, получивших на 1-м этапе хирургическое лечение. Срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином и ИГХ с использованием антител к CD34 и подоплантину.

При РШМ в ткани опухоли и околоопухолевой строме выделены следующие типы микрососудов: обычные микрососуды, дилатированные капилляры (ДК), атипичные дилатированные капилляры (АДК), сосуды с периваскулярной муфтой, капилляры в солидном компоненте опухоли, структуры с частичной эндотелиальной выстилкой и ячеистые структуры в рыхлой неоформленной соединительной ткани. Обычные микрососуды, ДК, капилляры в солидном компоненте опухоли и сосуды с периваскулярной муфтой окрашивались преимущественно CD34, в то время как АДК и структуры с частичной эндотелиальной выстилкой — и CD34, и подоплатином.

У 5 (7,9 %) пациенток в разные сроки после лечения был выявлен рецидив заболевания. Анализ показал, что при наличии и отсутствии рецидива заболевания глубина инвазии опухоли составила $12,4 \pm 4,6$ мм и $4,8 \pm 4,4$ мм ($p > 0,0001$), феномен ретракции стромы (ФРС) наблюдался в 40 и 6,8 % случаев ($p = 0,001$), васкулогенная мимикрия — в 80 и 20,7 % случаев ($p = 0,003$) и опухолевые эмболы в сосудах (преимущественно в лимфатических) — в 100 и 25,8 % случаев

($p = 0,0006$). Глубина инвазии опухоли коррелировала с выраженностью лимфоидной инфильтрации ($p = 0,006$) и ФРС опухоли ($p < 0,0001$), наличием капилляров в солидном компоненте опухоли ($p < 0,0001$) и опухолевых эмболов — в CD34-позитивных ($p < 0,0001$) и подоплатин-позитивных ($p < 0,0001$) сосудах. Глубина инвазии опухоли была достоверно выше при наличии ФРС опухоли ($p < 0,0001$), при выраженной лимфоидной инфильтрации стромы опухоли ($p = 0,047$), при наличии сосудов в солидном компоненте опухоли ($p = 0,0002$) и опухолевых эмболов в сосудах ($p < 0,0001$), которые являлись преимущественно лимфатическими. Клинической значимости других типов микрососудов при раннем РШМ не выявлено.

Считаем целесообразным при оценке прогноза раннего РШМ учитывать выраженность лимфоидной инфильтрации, ФРС опухоли и наличие сосудов в солидном компоненте опухоли как факторов, ассоциированных с неблагоприятным прогнозом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и субъекта Российской Федерации в рамках научных проектов № 18-415-560005 и 19-415-560004.

Рецепторы факторов роста глиобластомы и металлопротеиназы 14-го типа регулируют аутофагию в стволовых клетках глиобластомы

О. Миянович¹, Дж. Фарес², А. Кордеро², М. Лесняк², И. Уласов¹

¹Группа экспериментальной терапии и диагностики Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва;

²отделение нейроонкологии Северо-Западного университета, Чикаго, Иллинойс, США

Глиобластома (ГБМ) является распространенной опухолью головного мозга у взрослых и характеризуется сильной гетерогенностью. Стандартными методами лечения в случае прогрессии ГБМ являются хирургическая резекция опухоли, воздействие ионизирующего излучения и ХТ. Несмотря на то что текущие терапевтические подходы способствуют выживанию пациента, рецидив опухоли у многих пациентов неизбежен. Зачастую это обусловлено активацией ответа опухолевых клеток на действие терапии, приводящее к стрессу. В последнее время наша группа опубликовала ряд данных о том, что первичные ткани пациентов с диагнозом ГБМ демонстрируют высокую экспрессию MMP14, причем усиленная продукция MMP14 при различных злокачественных новообразованиях, в том числе глиобластомах, ассоциирована с негативным прогнозом выживаемости пациентов. В настоящем исследовании мы показали, что ингибирование FGFR сигнального

пути в клетках U87, U251 и первичных клетках глиобластомы снижает рост опухоли. В этих образцах ингибирование опухоли коррелировало со снижением MMP14, пролиферации клеток и количества нейросфер, формирующихся клетками. Кроме этого, РНК-интерференция генов FGFR 1–3-го типов в клетках глиобластомы продемонстрировала, что подавление экспрессии FGFR 1-го и 3-го типов связано с активацией аутофагии, вовлеченной в регуляцию пролиферации клеток, их стволовость и стрессовую реакцию. Примечательно, что колокализация FGFR1 и FGFR3 с MMP14 наглядно продемонстрировала роль каждого из рецепторов и возможную их биологическую функцию для прогрессирования глиомы. В совокупности эти результаты демонстрируют новую роль FGFR в регуляции стресс-опосредованной реакции глиобластомы на лечение темозоломидом и ключевую роль MMP14 в росте ГБМ, что может быть экстраполировано и на другие MMP14-индуцированные раковые клетки.

Ангиогенез в зонах эпителиально-мезенхимального перехода в неспецифическом раке молочной железы

М.В. Мнихович^{1,2}, Т.В. Безуглова¹, Ю.Г. Павлова^{3,4},
И.В. Васин^{3,4}, С.В. Снегур³, Камаль Халави Скафи⁵,
Д.С. Куш², Н.Г. Малогин², А.В. Романов², К.В. Буньков⁶

¹ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

³ГБУ РО «Рязанская областная клиническая больница», Рязань;

⁴ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань;

⁵Медицинский центр «Калит», Иерусалим, Израиль;

⁶ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии», Смоленск

Введение. Установлено, что одним из ключевых этапов инвазии и метастазирования злокачественных образований является активация ангиогенеза опухоли.

Цель исследования — изучить опухолевый ангиогенез в зонах ЭМП в неспецифическом РМЖ.

Материалы и методы. Изучены материалы клинического обследования 72 больных РМЖ. Размеры опухолевого узла — $2,8 \pm 2,6$ см. ИГХ-реакции проводили с антителами к CD34 (Dako).

Результаты. Была выявлена локализация CD34+ сосудов внутри и по периферии опухолевого узла. Внутриопухолевые сосуды имели мелкие размеры и были представлены кровеносными капиллярами. Электронно-микроскопическое исследование структуры эндотелиоцитов кровеносных капилляров показало, что их цитоплазма пронизана сетью тонофиламентов и имеет небольшое содержание цитоплазматических органелл. Наличие скоплений люминальных и цитоплазматических микропиноцитозных везикул свидетельствовало

об активности обменных процессов. Выявлены атипичные дилатированные капилляры интратуморальной стромы. Цитоплазма выстилающих эндотелиальных клеток неравномерно окрашивалась маркером CD34 и имела большое количество цитоплазматических отростков, вследствие чего контуры сосудов выглядели нечеткими. В просвете их часто определялись опухолевые эмболы и CD34+–клетки, не связанные со стенкой сосудов. Периваскулярная ткань при РМЖ, преимущественно в зонах инвазии (в зонах ЭМП), напоминала соединительную, содержащую рыхлые коллагеновые волокна с фрагментами растущих сосудов, участками некроза и клетками, которые можно расценить как фибробласты и макрофаги. В эпителиальном компоненте инвазивных карцином эндотелиальный пласт имел расположение по типу нагромождения друг на друга с признаками секретирующих клеток. Данные клетки в опухолевом материале нарабатывают компоненты экстрацеллюлярного матрикса. Также обращало на себя внимание отсутствие перицитов. Опухолевые клетки контактировали с эндотелиальными посредством отростков и располагались близко к эндотелию, который был окружен электронно-плотным материалом, отсутствовала оформленная базальная пластинка, что четко указывает на наличие микрососудистой мимикрии в опухоли.

Заключение. Таким образом, проведенное исследование дает основание считать, что изучение ангиогенеза в опухолевой ткани может быть значимым для прогноза течения заболевания.

Оценка экспрессии онкомаркера KISS1 при раке молочной железы неспецифического типа

М.В. Мнихович^{1,2}, Т.В. Безуглова¹, А.В. Романов²,
К.В. Буньков³, Н.Г. Малогин², Камаль Халави Скафи⁴,
Д.С. Куш²

¹ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

³ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии»,
Смоленск;

⁴Медицинский центр «Калит», Иерусалим, Израиль

Введение. Одним из генов-супрессоров метастазов является KISS1, впервые обнаруженный в клетках метастазирующей меланомы в 1996 г. Определение частоты метилирования KISS1 может использоваться в клинической практике для ранней диагностики РМЖ и метастазирования первичной опухоли. Сигнальная система KISS1/KISS1R, будучи регулятором метастазирования опухолей, является потенциальным прогностическим маркером опухолевых процессов. Метилирование промотора KISS1 может быть одной из причин снижения экспрессии мРНК и белка KISS1 в клетках метастазов РМЖ в головном мозге и коррелирует с наиболее неблагоприятным прогнозом для больных РМЖ.

Клиническая значимость KISS1 может заключаться в прогнозировании вовлечения в опухолевый процесс лимфатических узлов: высокий уровень экспрессии KISS1 в первичной опухоли коррелирует с метастазированием в лимфатические узлы, однако уровень экспрессии KISS1 снижается в отдаленных метастазах.

Цель исследования — изучить особенности экспрессии онкомаркера KISS1 при РМЖ неспецифического типа.

Материалы и методы. Исследован операционный материал, полученный от 30 женщин с верифицированным диагнозом протоковой карциномы молочной железы с отдаленными (печень, легкие, кости) и регионарными (лимфатические узлы) метастазами и без нее в возрасте от 28 до 63 лет. Средний возраст пациенток — 49 лет. В качестве первичных антител использовали Metastin (Abcam). Экспрессия белка KISS1 выявлялась в виде гомогенного окрашивания цитоплазмы опухолевых клеток.

Результаты. Интенсивность реакции оценивали полуколичественным методом: (—) — отрицательная реакция, (+) — слабая очаговая реакция; (++) — средняя; (+++) — интенсивная с распространением по всей цитоплазме. Интенсивная реакция (+++) — в 85 % ткани контроля. Среди образцов ткани с подтвержденными метастазами в 9 образцах из 30 отмечалась слабая (+) очаговая реакция. В оставшемся 21 образце экспрессия выглядела следующим образом: интенсивная (+++) — в 4,4 % (1 из 21), средней интенсивности (++) — в 82,6 % (18 из 21), слабой (+) — в 13,0 % (2 из 21).

Заключение. Особенности экспрессии KISS1/KISS1R в РМЖ дают надежды на появление новых подходов в лечении данных опухолей. Уровень экспрессии KISS1 может служить молекулярным маркером, предсказывающим качество ответа опухоли на терапию тамоксифеном, особенно у женщин в постменопаузальном периоде.

произошедшего в них ЭМП, что приводит к усилению злокачественных характеристик трансформированных клеток.

Цель исследования — выявление корреляций между клиническими характеристиками, уровнем риска прогрессирования и рецидивирования РМЖ и опухолевыми маркерами, ассоциированными с ЭМП.

Материалы и методы. В исследование были включены 45 образцов инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (IC NST) и 15 отдаленных метастазов. Парафиновые срезы инкубировали с антителами к основным маркерам ЭМП (Е-кадгерин, β -катенин, α -SMA, виментин).

Результаты. В опухолевых клетках по сравнению с нормальной тканью молочной железы наблюдалось слабое диффузное окрашивание Е-кадгерина в зонах межклеточных контактов. Выраженность таких отклонений увеличивалась с течением опухолевой прогрессии и достигала 63,5 % в опухолях G₃. Снижение мембранной экспрессии и появление ядерного β -катенина обнаруживали в опухолях G₂ и G₃. Увеличение количества гладкомышечного актина (α -SMA) и виментина наблюдалось в 36,5 % образцов опухолей, которые в основном относились к IV стадии заболевания. Меньшее количество изменений в экспрессии и локализации изучаемых маркеров было выявлено в отдаленных метастазах, что может свидетельствовать об ЭМП, наблюдаемом при метастазировании.

Заключение. Полная или частичная утрата экспрессии Е-кадгерина и реорганизация β -катенина характеризуют поздние стадии опухолевой прогрессии (IC NST). Гиперэкспрессия актина и виментина ассоциирована с распространением и низким дифференцировочным статусом опухоли, при этом предложенная панель может рассматриваться в качестве новой при анализе опухолевой прогрессии РМЖ.

Экспрессия генов WNT-сигнального пути в карциномах молочной железы неспецифического типа

М.В. Мнихович^{1,2}, Т.В. Безуглова¹, Ю.Г. Павлова^{3,4},
И.В. Васин^{3,4}, С.В. Снегур³, Камаль Халави Скафи⁵,
Д.С. Куш², Н.Г. Малюгин², А.В. Романов², К.В. Буньков⁶

¹ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

³ГБУ РО «Рязанская областная клиническая больница», Рязань;

⁴ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань;

⁵Медицинский центр «Калит», Иерусалим, Израиль;

⁶ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии»,
Смоленск

Введение. Для опухолевых клеток характерно нарушение экспрессии и локализации белков межклеточной адгезии Е-кадгерина и β -катенина вследствие

Прогностическая значимость морфологической гетерогенности, уровня воспалительной реакции и маркеров эпителиально-мезенхимального перехода в развитии лимфогенных метастазов при плоскоклеточном раке головы и шеи

Ю.А. Небова^{1,2}, В.А. Бычков¹, И.В. Ларионова²,
Л.Н. Бондарь¹, В.М. Перельмутер¹

¹ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский государственный университет», Томск

Введение. Иммуновоспалительная реакция (ИВР) наряду с ЭМП относится к важнейшим прогностическим

факторам опухоли. Предположительно эти факторы могут быть связаны с различной морфофизиологией плоскоклеточных карцином головы и шеи (HNSCC).

Цель исследования — изучение выраженности ЭМП и ИВР в 5 типах клеточных структур HNSCC и разработка прогностической модели лимфогенного метастазирования.

Материалы и методы. Материалом служили гистологические срезы плоскоклеточных карцином 92 пациентов с HNSCC различных локализаций. На каждого больного была получена информация о поле, TNM, количестве пораженных лимфатических узлов, степени дифференцировки, наличии 5 типов изучаемых структур, об инвазии в подлежащие структуры, а также о выраженности и типе воспалительного инфильтрата. С помощью конфокальной микроскопии у 16 пациентов был оценен уровень белков Snail и Vimentin. Анализ морфологической гетерогенности опухолей проводился методом световой микроскопии на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Анализ уровня ЭМП-маркеров в 5 типах структур изучали при помощи ИГХ-исследования с применением первичных антител к Snail, Vimentin, HMW (Novus Biologicals, США), визуализацию окраски проводили на лазерном конфокальном сканирующем микроскопе LSM 780 NLO (Carl-Zeiss, Германия).

Результаты. Содержание Snail+ и Vimentin+-клеток в структурах 1–3-го типов значимо не различалось (2–5 и 6–10 % соответственно). По сравнению с ними структуры 4-го типа имели тенденцию к увеличению количества Snail+ и Vimentin+-клеток (11 и 16 %, $p > 0,05$), а в структурах 5-го типа доля клеток в состоянии ЭМП значимо выше (19 и 20 %, $p < 0,05$).

Установлено, что у пациентов с пораженными метастазами лимфатическими узлами (N1–2) количество клеток в состоянии ЭМП значимо не отличается от такого у пациентов с интактными лимфатическими узлами (N0), при этом в 1-й группе количество дискретных опухолевых клеток повышено, а выраженность ИВР снижена.

С помощью регрессионного анализа была разработана прогностическая модель метастатического поражения лимфатических узлов у пациентов с HNSCC. В уравнение вошли 2 параметра: наличие дискретных опухолевых клеток и выраженность ИВР. Чувствительность составила 54,5 %, специфичность — 89 %. Показано, что наличие одиночных опухолевых клеток является более значимым показателем по сравнению с ИВР.

Заключение. Вероятность поражения сторожевых лимфатических узлов ассоциирована с наличием дискретных опухолевых клеток и низким уровнем ИВР в первичной опухоли и не связана с выраженностью ЭМП.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Томской области в рамках научного проекта № 16-34-00903.

Разработка модели для оценки антиметастатического потенциала дважды модифицированных NK-клеток, экспрессирующих функциональный CAR против белка PSMA

А.А. Нуштаева¹, В.Г. Субракова^{2,3}, С.В. Кулемзин³,
Т.Н. Беловеж^{2,3}, А.Н. Чикаев³, Н.А. Чикаев³,
А.А. Горчаков^{2,3}, А.В. Таранин^{2,3}, В.А. Рихтер¹, О.А. Коваль^{1,2}

¹ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный университет», Новосибирск;

³ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», Новосибирск

Адаптивный перенос Т- и NK-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR), обеспечивающие активацию несущих их клеток при контакте с определенным антигеном, рассматривают как перспективную стратегию борьбы с онкологическими заболеваниями. NK-клетки обладают слабой способностью инфильтрировать солидные опухоли, что ведет к низкой их эффективности в отношении таких опухолей, но осуществляют ведущую роль в отношении контроля метастазирования. Для оценки эффективности антиметастатического потенциала модифицированных CAR-NK-клеток необходимо иметь релевантную модель опухолевых клеток, несущих необходимый антиген и способных к метастазированию.

Цель исследования — разработка опухолевой модели для оценки антиметастатического потенциала дважды модифицированных NK-клеток, экспрессирующих функциональный CAR к белку PSMA человека — маркеру клеток РПЖ. Было показано, что клетки линии РМЖ человека BrCCh4e, полученной из ткани опухоли пациента, метастазируют преимущественно в лимфатические узлы средостения. Методом лентивирусной трансдукции была получена модифицированная линия BrCCh4e-134 с высокой экспрессией PSMA. Клетки линии Cyto-CAR-YT-Lact, экспрессирующие функциональный CAR против PSMA, обладали высокой цитотоксической активностью в отношении PSMA+-клеток BrCCh4e-134 *in vitro*.

При исследовании антиметастатической активности клеток Cyto-CAR-YT-Lact в отношении модели спонтанного метастазирования и внутривенно трансплантированных клеток BrCCh4e-134 было показано, что однократное внутривенное введение клеток Cyto-CAR-YT-Lact супрессировало развитие метастазов. Таким образом, модифицированная линия BrCCh4e-134 с высокой экспрессией PSMA позволяет оценивать антиметастатический потенциал NK-клеток, несущих CAR к PSMA.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1246, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0169).

Характеристика транскриптома основных субпопуляций моноцитов периферической крови при раке молочной железы

М.Р. Патышева^{1,2}, М.Н. Стахеева^{1,2}, Е.С. Григорьева^{1,2},
А.М. Киселев³, Н.А. Тарабановская¹, И.В. Ларионова^{1,2},
А.Б. Федоров¹, Ю.Г. Кжышковска^{2,4}, Н.В. Чердынцева^{1,2}

¹НИИ онкологии ФГБУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

³ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

⁴отдел врожденного иммунитета и толерантности Института трансфузионной медицины и иммунологии, медицинский факультет Мангейма, Университет Гейдельберга, Гейдельберг, Германия

Введение. В последние годы высказывается мнение о том, что злокачественное новообразование может оказывать программирующее действие на моноциты, детерминируя их к участию в опухолевой прогрессии (Casseta L. и соавт., 2019). Поскольку между основными субпопуляциями моноцитов существуют выраженные различия, то влияние опухоли может быть дифференцированным в отношении каждой из них.

Цель исследования — определение особенностей транскриптома моноцитов классической, промежуточной и неклассической субпопуляций у пациенток с РМЖ.

Материалы и методы. Были исследованы 5 больных РМЖ и 5 здоровых женщин в качестве группы сравнения. Из периферической крови методом проточной цитофлуориметрической сортировки были получены моноциты классической ($CD14^{high}16^{low}$), промежуточной ($CD14^{high}16^{high}$) и неклассической ($CD14^{low}16^{high}$) субпопуляций. Из каждой субпопуляции была выделена тотальная РНК ($RIN > 7,5$), получены библиотеки для секвенирования и проведено массовое параллельное РНК-секвенирование (платформа Illumina, NextSeq 550) с последующей биоинформатической обработкой.

Результаты. При сравнении данных больных РМЖ и здоровых лиц с применением метода главных компонент (PCA) выявлено, что наиболее выраженные различия в экспрессии генов характерны для $CD14^{high}16^{low}$ -моноцитов. Анализ дифференциальной экспрессии Limma обнаружил 211 генов с повышенной и 158 — с пониженной экспрессией (adj. P. val. $< 0,05$) в $CD14^{high}16^{low}$ -субпопуляции при РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами. Метод геной онтологии выявил у больных РМЖ по сравнению со здоровыми лицами обогащение молекулярных путей, задействованных в реализации врожденного иммунного ответа, активации клеточного цитоскелета, цитокинового сигналинга и воспалительного ответа ($NES > 1,7$), включая повышенную экспрессию транскриптов,

кодирующих иммунорегуляторные рецепторы (IL1RAP, IL31RA), провоспалительные медиаторы (IL1B, HMGB2) и маркеры тканевых макрофагов (SIGLEC11). В отличие от здоровых лиц $CD14^{high}16^{low}$ -субпопуляция у больных РМЖ имела отличия в уровне дифференциально экспрессированных генов как с $CD14^{high}16^{high}$ (532 с повышенной и 288 с пониженной регуляцией; adj. P. val. $< 0,05$), так и с $CD14^{low}16^{high}$ (629 с повышенной и 330 с пониженной регуляцией; adj. P. val. $< 0,05$) субпопуляциями. При этом в $CD14^{high}16^{low}$ -моноцитах наблюдалось снижение экспрессии транскриптов S100A8/9, которое является характерным признаком дифференцировки в тканевые макрофаги (Koike T. и соавт., 1992; Viemann D. и соавт., 2005).

Заключение. РМЖ дифференцированно влияет на основные субпопуляции моноцитов на уровне транскриптома. При этом классическая субпопуляция является более вероятным кандидатом для пополнения пула опухолеассоциированных миелоидных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-29-06037).

Клеточная модель для изучения устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов

П.А. Подлесная, А.Д. Панахов, О.В. Ковалева,
Д.В. Самойлова, А.Н. Грачев

НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Иммуноterapia является актуальным и перспективным методом лечения злокачественных опухолей. Однако одной из основных проблем данного вида терапии является формирование устойчивости опухоли к иммунологическим препаратам, обусловленное как отбором опухолевых клеток, устойчивых к цитотоксической активности клеток врожденного иммунитета, так и снижением или потерей цитотоксической активности последних. Понимание механизма формирования устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов необходимо для разработки перспективных методов иммунотерапии.

Цель исследования — разработка клеточной модели для изучения механизма устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов.

Материалы и методы. Для разработки модели использовалась клеточная линия РПЖ РС3, клеточные линии моноцитарной (THP-1) и промиелоцитарной (HL-60) лейкемии человека. Получение цитотоксических макрофагоподобных клеток THP-1 и HL-60 проводили с использованием стимуляции $INF\gamma$, PMA, LPS и MDP. Устойчивые клоны опухолевых клеток получали путем сокультивирования последних с цитотоксическими

макрофагами. Функциональный анализ полученных с помощью разработанной клеточной модели клонов PC3 включал анализ устойчивости к цитотоксической активности, динамики роста и миграционной способности.

Результаты. Была разработана уникальная модель сокультивирования опухолевых клеток с цитотоксическими макрофагами *in vitro*, позволяющая получать клоны опухолевых клеток, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов. Кроме того, для полученных клонов наблюдается тенденция к повышению пролиферации. Дальнейший анализ указывает на то, что TNF- α является одним из, но не единственным фактором цитотоксичности макрофагов и влияет на приобретение устойчивости опухолевыми клетками.

Заключение. В рамках данного исследования была разработана уникальная клеточная модель для изучения механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов *in vitro*, позволяющая получать клоны опухолевых клеток, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов, а также предложен потенциальный механизм, обуславливающий данный эффект.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-04-01857).

Исследование взаимодействия аутофагии и эпителиально-мезенхимального перехода в прогрессии опухолей

А.А. Прокофьева¹, И.С. Абрамов², О.О. Рябая¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБУ «Центр стратегического планирования» Минздрава России, Москва

Введение. Несмотря на успехи в лечении злокачественных новообразований, проблема резистентности и дальнейшей опухолевой прогрессии остается актуальной. Аутофагия и ЭМП, являясь основными биологическими процессами в опухоли, тесно связаны между собой и играют ключевую роль в опухолевой прогрессии. Однако имеется ограниченная информация о молекулярной основе их взаимодействия.

Цель исследования — изучение взаимодействия двух процессов в опухолевых клетках и возможности их регуляции.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на клеточных линиях меланомы A375 и MeWo, карциноме желудка CRL5971 и ПКР Sn-12с. Экспрессия маркеров аутофагии (Beclin 1, ATG5, LC3B, p62) и ЭМП (Е- и N-кадгерин, виментин, β -катенин, ZEB1, MMP2 и MMP9) изучена иммуноблоттингом. Коэкспрессия маркеров подтверждена иммуноцитохимически. Эффективность инактивации аутофагии посредством миРНК к ATG5

и GRP78 и ингибиторов аутофагии BEZ235, LY-294.002 (LY) и хлорокина (CQ) на опухолевую прогрессию изучена в экспериментах по способности клеток к колониеобразованию, формированию 3D-сфероидов, изменению миграционной активности и изучению фаз клеточного цикла.

Результаты. Ингибиторы аутофагии значимо подавляли способность клеток к колониеобразованию и снижали жизнеспособность 3D-сфероидов. Снижение миграционной активности под действием LY, CQ и BEZ235 относительно контроля отмечалось во всех изученных клеточных линиях; миРНК к ATG5 и GRP78 снижали миграцию лишь у клеток Sn12с и MeWo, но не A375. Подавление аутофагии способствовало увеличению G0/G1-фазы за счет снижения S-фазы во всех линиях. Наиболее значимый эффект получен в клетках CRL5971. Подавление аутофагии снижало экспрессию виментина, MMP2 и ZEB1 во всех клеточных линиях. Уровень β -катенина и MMP9 не изменялся. Иммуноцитохимически подтверждено увеличение Е-кадгерина при снижении N-кадгерина во всех изученных линиях. Ингибирование аутофагии за счет CQ приводило к увеличенному накоплению LC3BII и p62. LY не влиял на маркеры аутофагии в клетках меланомы: уровень ATG5 и Beclin 1 не изменялся у A375. BEZ235 наиболее значимо подавлял Beclin 1 и ATG5 в изученных линиях. Подавление аутофагии посредством миРНК к ATG5 приводило к снижению экспрессии LC3BII, ZEB1 и увеличению p62/SQSTM1 и Е-кадгерина. Подавление виментина отмечалось только в линии A375. Таким образом, ингибирование аутофагии вовлечено в подавление ЭМП, однако имеются разные механизмы действия.

Заключение. Расширение понимания о перекрестном функционировании аутофагии и ЭМП на примере исследованных клеточных линий опухолей позволит найти клинически значимые биомаркеры для предсказания опухолевой прогрессии и, возможно, новые мишени для противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-015-00447).

Суспензия, содержащая наночастицы карбоната кальция, потенцирует канцерогенный эффект смеси формальдегида и перекиси водорода в экспериментальной модели рака желудка

М.А. Сеньчукова, О.Н. Томчук, Е.И. Шурыгина

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург

Ранее нами была показана возможность индукции интраэпителиального рака желудка (РЖ) у крыс путем

внутрижелудочного введения смеси формальдегида (ФА) и перекиси водорода (ПВ). С учетом того, что при различных патологических процессах в тканях часто наблюдаются микрокальцинаты, целью исследования было изучение влияния наночастиц (НЧ) CaCO_3 на индукцию РЖ смесью ФА и ПВ.

Материалы и методы. Самцы крыс Вистар ($n = 15$) получали по 1 мл 0,05 % суспензии CaCO_3 , смешанной с 0,4 % раствором ФА и 0,4 % ПВ в соотношении 1:1, через оральный зонд в 1-й и 3-й дни эксперимента. Контрольные животные ($n = 3$) получали по 1 мл дистиллированной воды аналогичным образом. Образцы органов с патологическими изменениями окрашивали гематоксилином Майера и эозином и ИГХ с использованием антител к виментину, Snail и TGF- β 2. Окраску по Коссу использовали для выявления микрокальцификатов в тканях. Размеры и долю различных НЧ в суспензии оценивали с помощью метода динамического рассеяния света и атомно-силовой микроскопии, подтвердивших наличие НЧ CaCO_3 со средними радиусами $7,8 \pm 10,8$ нм и $155,3 \pm 86,5$ нм в канцерогенной суспензии.

Результаты. Добавление к смеси ФА и ПВ суспензии, содержащей НЧ CaCO_3 , привело к снижению числа введений канцерогенов с 12 до 2 и времени до индукции РЖ с 6 до 4 мес. Индуцированные опухоли были представлены интраэпителиальными карциномами с обширной инвазией отдельных опухолевых клеток и их скоплений в мышечную и серозную оболочку, а также в сальник и кровеносные сосуды. Инвазивные опухолевые клетки были позитивными в отношении виментина, Snail и TGF- β 2, что указывает на то, что их инвазия могла быть связана с активацией механизмов эпителиально-мезенхимальной трансформации. При окраске образцов по Коссу в слизистой оболочке желудка и брыжеечных лимфатических узлах были обнаружены скопления микрокальцификатов. У контрольных крыс описанных изменений не наблюдалось. Этот факт свидетельствует о том, что усиление канцерогенных свойств смеси ФА и ПВ может быть связано с развитием иммунологической толерантности, подобно механизму формирования иммунологической толерантности к пище и микробиоте кишечника за счет эндогенного образования кальцийсодержащих НЧ (Powell, 2015).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и субъекта Российской Федерации в рамках научных проектов № 18-415-560005 и 19-415-560004.

Киназы ROCK и MLCK обладают общим эффектом действия на динамику фокальных контактов в нормальных и опухолевых клетках

Е.С. Соломатина, А.В. Ковалева, А.А. Саидова

Биологический факультет ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Фокальные контакты (ФК) — структуры, организующие связь между актиновым цитоскелетом и внеклеточным матриксом. Их динамика играет роль в процессах заживления ран, деления и дифференцировки клеток. Процесс формирования и созревания ФК запускается в ходе актомиозинового сокращения. ROCK и MLCK — тирозинкиназы, которые активируют легкие цепи миозина II и обеспечивают возможность актомиозинового взаимодействия.

Цель исследования — установление роли каждой из киназ в процессе регулирования динамики ФК.

Динамику ФК в клеточных линиях A549 (аденокарцинома базального эпителия легких) и 3T3 (эмбриональные фибробласты мыши) оценивали по флуоресценции репортерного белка (винкулин-RFP). Для исследования роли каждой киназы был использован метод ингибиторного анализа (10 μM Y-27632 — специфический ингибитор ROCK, 10 μM ML-7 — ингибитор MLCK) и прижизненной цейтраферной съемки. В качестве параметров для оценки динамики ФК были выбраны медиана времени жизни и медиана площади.

Большая часть (порядка 80 %) динамичных ФК в клетках обеих линий расположены на периферии (не далее чем 10 μm от края клетки). Медиана времени жизни ФК составила 50 мин (разброс 10–235 мин, $N = 100$) для клеток линии A549 и 33,5 мин для 3T3 (6–164 мин, $N = 60$). После кратковременной инкубации с каждым из ингибиторов ФК существуют дольше (медиана времени жизни при инкубации с Y-27632: для A549 — 75,2 мин (15–180 мин, $N = 50$), для 3T3 — 49,50 мин (13–121 мин, $N = 50$); с ML-7: для A549 — 70 мин (15–270 мин, $N = 50$) и для 3T3 — 59,5 мин (18–271 мин, $N = 50$). Медиана площади ФК для клеток линии A549 в контроле составила 0,77 μm^2 (0,15–7,71 μm^2 , $N = 472$), для клеток линии 3T3 — 0,62 μm^2 . После получасовой инкубации клеток в среде с каждым из ингибиторов наблюдалось уменьшение площади ФК в клетках обеих линий (Y-27632: 0,45 μm^2 , $p < 0,0001$ (0,03–4,25 μm^2 , $N = 476$) — для A549 и 0,31 μm^2 , $p < 0,0001$ — для 3T3; ML-7: 0,28 μm^2 , $p < 0,0001$ (0,06–4,59 μm^2 , $N = 372$) — для A549 и 0,26 μm^2 , $p < 0,0001$ — для 3T3).

Наши данные иллюстрируют общий эффект действия ингибиторов киназ легких цепей миозина II в клетках разных культур: ингибирование как ROCK, так и MLCK приводит к увеличению времени жизни и уменьшению площади ФК на краю клетки, что является универсальным феноменом для всех исследуемых типов клеток.

Исследование взаимосвязи между концентрацией цитокинов и экспрессией маркеров эпителиально-мезенхимального перехода у пациентов с заболеваниями молочной железы

А.А. Студеникина, А.В. Бернадо

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск

Введение. Микроокружение опухоли, продуцируя различные цитокины и медиаторы, может индуцировать ЭМП, что способствует локальной инвазии и метастазированию. ЭМП отсутствует в здоровых тканях, но может наблюдаться при доброкачественных заболеваниях молочной железы, что ведет к клеточной атипии и, возможно, развитию злокачественного новообразования.

Цель исследования — изучение взаимосвязи между продукцией цитокинов образцами биоптатов и экспрессией в них маркеров ЭМП при инвазивной карциноме молочной железы неспецифического типа (ИКНТ) и при незлокачественных заболеваниях молочной железы.

Материалы и методы. Материалом были супернатанты биоптатов 68 пациентов, из них 47 — с диагнозом ИКНТ и 17 — с незлокачественными заболеваниями молочной железы. Для определения спонтанной продукции часть биоптата инкубировали в питательной среде DMEM F12, а для определения индуцированной продукции (ИП) — в таком же объеме среды с комплексом полиактиваторов, применяя стандартный набор «Стимул-Бест». В супернатантах после осаждения клеток, используя иммуноферментный анализ (ИФА), определяли концентрацию TNF- α , интерферона γ (ИФН- γ), G-CSF, GM-CSF, VEGF, MCP-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1Ra (Вектор-Бест). Далее оценивали индекс влияния комплекса полиактиваторов (ИБПА = А/Б, где А — концентрация при ИП, Б — концентрация при спонтанной продукции). ИГХ-исследование экспрессии коллагена 2 (C2), β_1 -интегрина (CD29) и E-кадгерина (CDH1) проводили на парафиновых срезах опухолей с использованием набора Vectastain Universal Elite ABCKit. При оценке использовали отношение количества клеток, экспрессирующих маркер, к неэкспрессирующим для C2 и CD29 и обратное отношение для CDH1. Статистическую обработку выполняли с помощью Statistica V6.0.

Результаты. У пациентов с ИКНТ наблюдались статистически значимо более низкие уровни ИБПА на продукцию TNF- α ($p = 0,006$) и GM-CSF ($p = 0,041$), чем у НЗ. Это обусловлено невысокими значениями ИП, что говорит о снижении цитокинпродуцирующей функции клеток опухоли и ее микроокружения. У пациентов

с НЗ была обнаружена умеренная отрицательная корреляционная связь между экспрессией C2 и ИБПА G-CSF ($R = -0,518$; $p = 0,033$), а у пациентов с ИКНТ — умеренная положительная между экспрессией C2 и ИБПА IL-8, IL-18 ($R = 0,415$; $p = 0,003$; $R = 0,456$; $p = 0,001$).

Заключение. Таким образом, проведенное исследование позволило выявить наличие корреляционных связей между продукцией провоспалительных цитокинов опухолью ее микроокружением и экспрессией C2, маркера ЭМП у пациентов с ИКНТ и пациентов с НЗ.

Роль белка Musashi-2 в регулировании сигнального пути VEGFR2-VEGFA при немелкоклеточном раке легкого

Ю.А. Топчу¹, А.М. Мазитова¹, В.Н. Югай¹, Е.Ю. Ратнер²,
И.Г. Серебрянский¹, А.Я. Денека¹, З.И. Абрамова¹,
Я.А. Бумбер¹

¹ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Республика Татарстан;

²ГАОУ «Республиканский клинический онкологический диспансер Минздрава Республики Татарстан», Казань, Республика Татарстан

Заболеваемость НМРЛ занимает 1-е место среди мужчин и 2-е — среди женщин, а смертность от этого заболевания занимает лидирующее место в мире.

Цель исследования — выявление механизмов, которые регулируют метастазирование НМРЛ и приводят к возникновению более агрессивного фенотипа этого заболевания и лекарственной устойчивости.

Ранее нами были опубликованы результаты исследования, в котором было обнаружено, что одной из наиболее постоянных фенотипических особенностей метастазирующих клеток рака легкого являлось повышение уровня белка Musashi 2 (MSI2), который играет важную роль при инвазии и метастазировании НМРЛ *in vitro* и *in vivo*. Проведенный нами анализ предполагаемого сигнального пути и скрининг релевантных мишеней MSI2 выявил ряд белков, ассоциированных с ЭМП, — рецептор фактора роста опухоли TGF- β I типа (TGFBRI), SMAD3, клаудина, а также рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2).

Нами была исследована роль MSI2 как регулятора онкогенных белковых взаимодействий сигнального пути VEGFR2-VEGF, оценена роль MSI2 в регуляции ответа на воздействие ингибиторами VEGF/VEGFR2. Обнаружено, что MSI2 способен регулировать ангиогенез при НМРЛ *in vitro*, а в опухолевых образцах пациентов с НМРЛ YVHK его уровни статистически значимо положительно коррелируют с уровнями VEGFR2, играющего ключевую роль в процессах ангиогенеза. Однако уменьшение экспрессии MSI2 не отражалось на чувствительности клеток аденокарциномы к ингибиторам VEGFR2.

Таким образом, сделан вывод о том, что с целью совершенствования существующих методов лечения

НМРЛ необходим поиск дополнительных комбинаций таргетной терапии, направленных на уменьшение активности других белков-партнеров MSI2.

Часть работы выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-315-00307).

Показатели окислительного метаболизма в сыворотке крови больных колоректальным раком

Ю.В. Фурман, Е.Б. Артюшкова, В.В. Хвостовой,
А.М. Быканова, А.Ю. Кулева

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск

Введение. Рак толстого кишечника занимает одно из ведущих мест в структуре онкологической заболеваемости желудочно-кишечного тракта. Это медленно прогрессирующая опухоль, развитие которой сопровождается эндогенной интоксикацией организма больного. К субстратам эндогенной интоксикации относятся активные формы кислорода (АФК), продукты окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов и другие низкомолекулярные реакционно-способные молекулы. Повышение их содержания в крови является прогностически неблагоприятным признаком, свидетельствующим о деградации биополимеров, надмолекулярных комплексов и нарушении структурно-метаболических и физико-химических процессов в клеточных мембранах.

Цель исследования — изучение содержания в сыворотке крови продуктов окислительной модификации белков для обоснования их прогностического значения.

Материалы и методы. Объектом исследования служила сыворотка крови больных с диагнозом КРР и условно здоровых людей. Уровень окислительной модификации белков оценивали по концентрации карбонильных групп, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразом. По содержанию продуктов реакции судили о состоянии окислительной модификации белков.

Результаты. В результате проведенных исследований в сыворотке крови больных КРР было выявлено стойкое повышение интенсивности процессов окислительного модифицирования белков по сравнению с группой контроля. Преобладание кетонпроизводных динитрофенилгидразонов свидетельствует о том, что в организме больных активно протекают процессы агрегации белков. Они формируют поперечные сшивки, нарушающие трехмерную структуру белков, способствуют разворачиванию глобулы и увеличению гидрофильности молекулы. Такие конформационные изменения в конечном итоге могут приводить к снижению или полной потере функциональной активности белковых молекул.

Заключение. Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что при канцерогенезе толстого

кишечника наблюдается рост процессов окислительной модификации белков. Контроль за процессами окислительной модификации белков может быть прогностически значим при диагностике стадий канцерогенеза и оценке эффективности патогенетической терапии.

Различный вклад изоформ актина в регуляцию деления клеток рака молочной железы в культуре

Г.С. Шагиева¹, В.Б. Дугина¹, П.Б. Копнин²

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Мы исследовали роль цитоплазматических актинов в регуляции клеточного цикла линий клеток РМЖ MCF-7 и MDA-MB-231. Бета- и гамма-актины преимущественно сегрегированы в митотических клетках нормального эпителия. Бета-актин концентрируется в базальной части клетки в течение всего митоза, в экваториальной зоне во время анафазы, в сократимом кольце во время телофазы и цитокинеза. Гамма-актин образует плотную сеть в субкортикальной зоне в течение всего митоза и цитокинеза. Подобное распределение немускульных актинов было обнаружено и в митотических клетках РМЖ.

Помимо архитектурной сегрегации была исследована регуляторная роль изоформ актина в делении и продвижении по циклу клеток MCF-7 и MDA-MB-231. Снижение экспрессии любой цитоплазматической изоформы актина резко подавляло пролиферацию клеток РМЖ, но только супрессия бета-актина дополнительно вызывала значительное уменьшение популяции диплоидных клеток, накопление тетраплоидных и анеуплоидных клеток. Мы обнаружили связь цитоплазматических актинов с белками-регуляторами клеточного цикла. Подавление бета-актина стимулировало экспрессию циклина A2, B1 и D3, тогда как подавление гамма-актина снижало экспрессию этих циклинов в клетках РМЖ. Снижение экспрессии бета-актина вызывало активацию киназы ERK1/2, а уменьшение экспрессии гамма-актина, напротив, приводило к инактивации ERK1/2. Также было обнаружено прямое взаимодействие ERK1/2 с гамма-актином и циклином A2 в общем белковом комплексе. Мы предполагаем, что снижение экспрессии гамма-актина приводит к снижению количества циклина A2, ингибирует передачу сигналов ERK1/2 и замедляет пролиферацию клеток РМЖ в культуре.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-34-00047).

Анализ мутационных профилей первично-множественных опухолей пациента с 7 опухолями

А.Д. Шахматова, Г.М. Бутрович, Е.Д. Мирлина,
О.А. Вострухина

ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова», Гатчина, Ленинградская обл.

Первично-множественными опухолями (ПМО) принято считать те опухоли, которые возникают в разных местах и/или принадлежат к разным морфологическим или гистологическим группам, а также обнаруживаются в разное время у одного человека, что делает их отличными от метастазов. Это положение описывает сложность диагностирования таких опухолей и выбор стратегии лечения уже имеющимися препаратами. Для полинеоплазий характерное лечение включает одномоментную и радикальную хирургию или стереотаксическую абляцию, в то время как для метастазов лечение заключается в паллиативном хирургическом вмешательстве либо симптоматическом. Однако в пределах однородной группы пациентов опухоли характеризуются высокой гетерогенностью течения и ответа на терапию.

Одной из ведущих причин опухолевой трансформации и прогрессии является постоянная активация сигнального каскада митоген-активируемой протеинкиназы. К митогенам, т.е. к соединениям, несущим пролиферативный сигнал, относят в том числе EGFR, который участвует в регуляции ряда биологических эффектов, ответственных за опухолевую прогрессию. В норме запуск процесса пролиферации клетки осуществляется посредством доставки EGF к клеточной мембране. Лиганд EGF взаимодействует со своим рецептором и индуцирует димеризацию последнего. Затем происходит активация белка RAS (KRAS), а RAS, в свою очередь, активирует RAF (BRAF).

Если происходит увеличение количества молекул рецептора на мембране, то терапевтическая инактивация EGFR может сопровождаться остановкой опухолевого роста, что применимо к эффективности терапии моноклональными анти-EGFR-антителами.

Молекулярно-генетический анализ показал, что существенную роль в резистентности опухоли к терапии МА играют мутации гена *KRAS*.

BRAF — ген, который кодирует белок B-Raf — серин/треонинкиназу, которая работает в сигнальном пути Ras-Raf-MEK-MARK. Этот путь в норме регулирует пролиферацию и сохранение клеток под контролем факторов роста и гормонов. Мутации в гене *BRAF* связаны с развитием рака.

Известно также, что мутации в генах *KRAS* и *BRAF* не обнаруживаются одновременно: если в опухоли есть мутации в гене *BRAF*, значит, скорее всего, не будут найдены мутации в *KRAS*, и наоборот.

Цель исследования — провести ретроспективный анализ генетических изменений, накапливающихся в клетках пациента с 7 опухолями (молочная железа, ободочная кишка, прямая кишка, слепая кишка, толстая кишка, рак тела матки); определить, являются ли все опухоли первично-множественными или часть из них имеет метастатическое происхождение, на основе определения мутационного профиля каждой опухоли.

Материалы и методы. Мутационный профиль каждой опухоли определяли с применением ПЦР в режиме реального времени, ПЦР-SSCP, метода электрофореза в денатурирующих условиях. Все образцы анализировали на наличие повреждений в микросателлите BAT26 и в «горячих точках» мутагенеза генов *TP53*, *BRAF*, *KRAS*, *PTEN*.

Результаты. Результаты молекулярно-генетического анализа опухолей были сопоставлены с клинико-патологическими данными пациента. Микросателлитная нестабильность, а также мутации в экзоне гена *Trp53* — В6 были выявлены в тканях ободочной кишки и слепой кишки, что свидетельствует о том, что опухоли, возможно, были метастазами. В остальных тканях микросателлитной нестабильности обнаружено не было. Однонуклеотидная замена в гене *KRAS* выявлена только в образцах прямой и толстой кишки. Это свидетельствует о том, что мутационные профили опухолей имели, скорее всего, независимое происхождение, следовательно, были полинеоплазиями.

Молекулярно-генетическое исследование опухоли толстой кишки и ее метастазов в печени

В.П. Шубин, А.С. Цуканов, А.А. Пономаренко,
Ю.А. Шельгин

ФГБНУ «ГНЦ колопроктологии им. А.Н. Рыжих» Минздрава
России, Москва

Введение. В первые годы наблюдения после оперативного лечения рака толстой кишки довольно часто отмечается метастатическое поражение печени (~50 %), легких (~20 %) и париетальной и висцеральной брюшины (перитонеальный карциноматоз) (5–15 %). Между крайними точками сложного процесса метастазирования — инвазией первичной опухоли в окружающие ткани и формированием метастатических фокусов — существует несколько этапов, прохождение которых строго обязательно для развития и последующей прогрессии опухоли. При этом известно, что опухоли толстой кишки являются гетерогенными и имеют разный метастатический потенциал.

Цель исследования — провести молекулярно-генетическое исследование первичной опухоли толстой кишки и метастазов в печени.

Материалы и методы. Материалом исследования были 40 парных образцов опухолей толстой кишки

и синхронных метастазов в печени. Изменение экспрессии генов проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Статус микросателлитной нестабильности определяли с помощью фрагментного анализа. Мутационный статус определяли с помощью цифровой капельной ПЦР и секвенирования по методу Сэнгера.

Результаты. Общая частота мутаций гена *KRAS* составила 18/40 (45 %). Все опухоли и метастазы по микросателлитным маркерам были стабильными. Конкордантность между первичной опухолью и синхронным метастазом в печени по мутационному и микросателлитному статусу составила 100 %. Опухоль характеризовалась низким уровнем экспрессии генов *ZEB2*, *VIM*, *MUC2*, *SFRP2*, *CDH1*, *RARRES3*, высоким — генов *FOXQ1*, *MACC1*, *PLS3* и неизменным — генов *ZEB1*, *CFTR*, *TNC*, *TFF3*. Совпадение экспрессии генов в опухоли и ее метастазах составило 63 %.

Заключение. Выявлены статистически значимые различия между первичной опухолью и метастазом в печени по уровням экспрессии следующих генов: *ZEB2* ($p = 0,004$), *VIM* ($p < 0,001$), *FLNA* ($p = 0,04$) и *MUC2* ($p < 0,001$), и высокий уровень конкордантности первичной опухоли и метастазов по мутационному статусу.

Нутлин сенсibilизирует клетки карциномы легкого к интерферону альфа независимо от p53

О.Ю. Шувалов, А.В. Петухов, А.И. Кизенко,
О.А. Федорова, А.А. Дакс, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

В качестве противоопухолевого средства ИФН- α используется для лечения ряда злокачественных новообразований. Однако его применение ограничено, в первую очередь из-за высокой токсичности. Следовательно, для снижения токсичности ИФН- α и повышения его противоопухолевой эффективности необходимы и новые комбинированные терапевтические схемы и прогностические маркеры.

Мы показали, что обработка p53-дефицитных клеток немелкоклеточной карциномы легкого человека H1299 ИФН- α в комбинации с нутлином 3а — ингибитором взаимодействия MDM2-p53 синергетично ингибирует пролиферацию клеток.

Важно отметить, что нутлин 3а снижал эффективную дозу ИФН- α примерно в 3,4 раза. Интересно, что этот эффект не зависел от p53, но зависел от MDM2, поскольку нокаут MDM2 делал клетки полностью нечувствительными как к одному ИФН- α , так и в сочетании с нутлином 3а. Напротив, гиперэкспрессия MDM2 повышала восприимчивость клеток H1299 как к монообработке ИФН- α , так и к ИФН- α в сочетании с нутлином 3а.

Обработка клеток комбинацией ИФН- α с нутлином 3а снижала циклин D1/CDK4 на уровне белка и,

следовательно, ингибировала прохождение клеточного цикла. Этот механизм, по крайней мере, частично может лежать в основе наблюдаемых ИФН- α -нутлин 3а-опосредованных антипролиферативных эффектов.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что убиквитинлигаза MDM2 может модулировать восприимчивость опухолевых клеток к ИФН- α /нутлин 3а. Кроме этого, наши данные также подтверждают ингибирующее влияние нутлина даже на p53-дефицитные клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-315-20013 мол_а_вед).

Musashi 2 регулирует экспрессию рецептора эпидермального фактора роста и ответ на таргетную терапию при немелкоклеточном раке легкого

В.Н. Югай¹, Ю.А. Топчу¹, А.М. Мазитова¹, Е.Ю. Ратнер²,
И.Г. Серебрянский¹, З.И. Абрамова¹, Я.А. Бумбер¹,
А.Я. Денека¹

¹ФГАУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Республика Татарстан;

²ГАОУ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Татарстан, Казань, Республика Татарстан

Рак легкого является наиболее распространенным онкологическим заболеванием в мире, подавляющее количество случаев которого составляет НМРЛ. Эффективность терапии НМРЛ зачастую ограничена, так как более чем в половине случаев заболевание диагностируется уже на стадии метастазирования. Ранее нами было показано, что при прогрессировании и метастазировании НМРЛ повышается экспрессия РНК-связывающего белка Musashi 2 (MSI2). Данная работа посвящена исследованию механизмов регуляции роста и метастазирования НМРЛ белком MSI2 с целью обнаружения новых терапевтических подходов в лечении этого заболевания.

С помощью метода протеиновых тест-систем обратной фазы в мышинных клеточных линиях НМРЛ от мышиной KrasLA1/+/Trp53R172HΔG/+ модели были идентифицированы основные белки-мишени MSI2. Обнаружено, что выключение MSI2 влечет за собой снижение экспрессии EGFR, причем регуляция наблюдается на посттрансляционном уровне. С помощью РНК-преципитации обнаружено, что MSI2 напрямую связывается с мРНК EGFR. Выключение MSI2 нарушало пролиферативную способность клеточных линий с активирующей мутацией EGFR, а также сенситизировало эти клеточные линии к таргетной терапии ингибиторами EGFR — эрлотинибом и афатинибом. Полученные данные были подтверждены в образцах

опухолевой ткани пациентов с НМРЛ: нами обнаружена статистически значимая положительная корреляция экспрессии EGFR и MSI2 в образцах пациентов с НМРЛ с мутацией EGFR в отличие от образцов пациентов с НМРЛ из неселектированной выборки.

Таким образом, нами обнаружено, что белок MSI2 является новым регулятором экспрессии EGFR при НМРЛ. Таргетная терапия MSI2 является потенциально новым, многообещающим направлением в лечении этого заболевания.

Часть работы выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-315-00307).

Clonal expansion of drug-resistant CD44+ prostate cancer stem-like cells is modulated by fenofibrate

T. Wróbel, E. Karnas, J. Catapano, M. Luty, K. Piwowarczyk, M. Szczygiel, E. Zuba-Surma, D. Ryszawy, Z. Madeja, M. Elas, J. Czyż

Jagiellonian University, Department of Cell Biology, Faculty of Biophysics, Biochemistry and Biotechnology, Kraków, Poland

"Clonal expansion of cancer stem cells" underlies the microevolutionary adaptation of prostate tumors to chemotherapeutic stress. Because fenofibrate (FF) augments the sensitivity of prostate cancer cells to chemotherapeutic

drugs, we hypothesized that it can impair prostate tumors' chemoresistance via the interference with the clonal evolution of prostate cancer stem cells. Flow-cytometric analyses demonstrated the existence of minute CD133⁺/CD44^{low}, CD133⁺/CD44^{high} and CD133⁻/CD44^{high} sub-populations within DU145/PC-3 populations. These stem cell-like (SCL) cells displayed enhanced docetaxel (DCX) — resistance and readily differentiated into DCX-resistant CD44^{negative} "bulk" cells, thus accounting for the microevolution of drug-resistance under DCX stress. SCLs were also relatively resistant to the combined DCX/FF treatment as illustrated by their increased abundance in the presence of both agents. However, the offspring of SCLs undergone DCX/FF treatment remained DCX/FF sensitive, even though it displayed considerably increased resistance to DCX due to the enhanced function of P-gp protein. Impaired DCX-resistance of prostate cancer cells by FF was confirmed by *in vivo* analyses; however they also showed the signs of tumor recovery from the combined DCX/FF stress. Mechanistic studies revealed/suggested the involvement of DCX/FF-induced polyploid giant cells in the generation of hyper-resistant CD44^{high} SCLs and the role of mesenchymal-epithelial transition in the maintenance of the drug-resistant phenotype of their offspring. Collectively, we confirmed the role SCL cells in the determination of prostate cancer cell heterogeneity and drug-resistance *in vitro*. Along with the *in vivo* data, our observations show that FF can enhance palliative prostate cancer therapies; however FF-induced clonal evolution of hyper-resistant stem cells can interfere with its efficiency.

Тезисы

Уровень VEGF-A в сыворотке и нейтрофилах при прогрессировании цервикальной интраэпителиальной неоплазии

Т.В. Абакумова¹, И.И. Антонеева^{1,2}, Т.П. Генинг¹,
Д.Р. Долгова¹

¹ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»,
Ульяновск;

²ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер»,
Ульяновск

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) — многофункциональный цитокин, продуцируемый опухолевыми и циркулирующими иммунными клетками (Tecchio C., Cassatella M.A., 2014). Обсуждается роль VEGF в поддержании опухолюассоциированного воспаления. При этом особая роль принадлежит нейтрофилам (Нф). Они первыми мигрируют в очаг воспаления, являются его активными участниками, тем самым стимулируя рост опухоли (Qu X., 2018).

Цель исследования — оценка уровня VEGF в сыворотке крови и циркулирующих Нф при переходе от дисплазии шейки матки различной степени к инвазивной плоскоклеточной карциноме.

В сыворотке и лизате циркулирующих Нф у пациентов с цервикальной интраэпителиальной неоплазией (ЦИН) I и II степеней ($n = 21$), ЦИН III степени и раком *in situ* ($n = 25$), плоскоклеточным раком (неороговевающий и ороговевающий) и РШМ ($n = 30$) методом ИФА определяли уровень VEGF-A (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). Медиана возраста пациентов составила $44,0 \pm 10,3$ года. Контрольную группу составили практически здоровые женщины-доноры ($n = 25$). Для статистического анализа использовали критерий ANOVA (Statistica 13.0) ($p \leq 0,05$).

В результате проведенных исследований установлено значимое увеличение уровня VEGF в сыворотке крови женщин с ЦИН I и II степеней по сравнению с группой контроля ($195,536 \pm 49,396$ пг/мл против $124,020 \pm 19,115$ пг/мл, $p = 0,053$). В сыворотке больных РШМ уровень VEGF значимо увеличивался до $294,782 \pm 34,370$ пг/мл. Связь уровня VEGF в сыворотке с гистотипом РШМ и возрастом пациентов не выявлена. При оценке уровня VEGF в лизате Нф было определено статистически значимое его возрастание при ЦИН и РШМ ($p = 0,027$). Показана связь уровня VEGF в лизате Нф с гистотипом РШМ: у пациентов с ороговевающим плоскоклеточным РШМ значения VEGF выше по сравнению с неороговевающим РШМ и раком *in situ* ($p = 0,012$). Была выявлена корреляционная связь

между уровнем VEGF в сыворотке крови и Нф ($r = 0,5329$), что говорит о существенном вкладе именно Нф в продукцию VEGF как медиатора воспаления при цервикальной патологии и переходе одной клинической формы в другую. Таким образом, повышение уровня VEGF в Нф позволяет предполагать их существенную роль в инициации ангиогенеза при РШМ. Увеличение уровня VEGF в сыворотке при прогрессировании заболевания может быть использовано при дифференциальной диагностике ЦИН и РШМ.

Прогностическая роль экспрессии альдегиддегидрогеназы культивируемыми клетками сарком мягких тканей и остеогенных сарком в определении их агрессивного потенциала

Н.А. Авдонкина, А.Б. Данилова, Т.Л. Нехаева,
Е.А. Просекина, А.И. Кузнецова, Н.В. Емельянова,
И.А. Балдуева

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России, Санкт-Петербург

Введение. Наличие в злокачественных новообразованиях популяции стволовых клеток (СКО), которые обладают высоким туморогенным потенциалом, определяет процессы опухолевой диссеминации и формирование отдаленных метастазов. Альдегиддегидрогеназа (ALDH) — метаболический маркер стволовых клеток, позволяющий идентифицировать СКО. Биологическая агрессивность опухоли ассоциирована с численностью популяции СКО, идентификация которой позволяет прогнозировать клиническое течение онкологического процесса.

Цель исследования — изучить экспрессию маркера СКО ALDH в культурах сарком мягких тканей (СМТ) и остеогенных сарком (ОС) и оценить прогностическую роль этого параметра в определении исхода заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены 20 образцов опухолей СМТ и ОС (2 первичных, 2 рецидивных, 16 метастатических) для получения клеточных культур от пациентов, подвергнутых хирургическому лечению в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова с 2016 по 2019 г. Пять образцов были представлены остеогенными саркомами, 5 — миксофибросаркомами, 3 — лейомиосаркомами, 3 — синовиальными саркомами, 2 — хондросаркомами, 2 — липосаркомами.

Содержание метаболически активных СКО в клеточной популяции определяли методом проточной цитометрии на цитофлуориметре FACS Canto™ II (BD Bioscience, США) с использованием набора реактивов ALDEFUOR (STEMCELL Technologies, Канада). Для обработки данных использовали программное обеспечение BD FACSDiva (версия 8.0.1). Время до прогрессирования (ВДП) оценивали как период от момента проведения циторедуктивной операции до прогрессирования заболевания. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы SPSS Statistics 23.

Результаты. Наблюдали широкую гетерогенность экспрессии ALDH в клеточных культурах СМТ и ОС: min—max — 1,1–52,5 %. Минимальное содержание ALDH⁺-клеток отмечено для культур остеогенных сарком, максимальное — в лейомиосаркомах. В общей группе пациентов ВДП составило от 2 до 41 мес. Была выявлена статистически значимая обратная корреляция экспрессии ALDH культивируемыми клетками СМТ и ОС с ВДП ($p = 0,00027$; $R^2 = 0,16$).

Заключение. Взаимосвязь между ВДП и уровнем экспрессии ALDH в клеточных культурах СМТ и ОС позволяет предполагать возможность использования этого маркера для выявления агрессивного потенциала сарком.

Аутокринная активация FGF-сигнального пути как альтернативный путь вторичной резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей к иматинибу

С.В. Бойчук¹, А.Р. Галембикова¹, Ф.Ф. Бикиниева¹,
Д.Д. Халиков^{1,2}, С.В. Петров^{1,2}, Е.Г. Михеева^{1,2},
М.В. Новикова³, П.Б. Копнин³

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Республика Татарстан;

²ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Татарстан, Казань, Республика Татарстан;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Основным патогенетическим драйвером гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) являются активирующие мутации гена *c-KIT*, приводящие к лиганднезависимой активации этой тирозинкиназы (ТК), что служит основанием для проведения больным с ГИСО таргетной терапии иматиниба мезилатом (ИМ), являющегося ингибитором ряда ТК, включая КИТ. Несмотря на высокую эффективность ИМ, более чем у 50 % пациентов спустя 2 года непрерывной терапии развивается вторичная резистентность (ВР). Механизмы формирования ВР в ГИСО к ИМ

могут быть обусловлены не только вторичными мутациями генов *KIT* и *PDGFRA*, но и потерей экспрессии КИТ, сочетающейся с гиперэкспрессией рецепторных и нереперторных ТК (MET, AXL, FAK и др.). В полученной нами ИМ-резистентной сублинии ГИСО T-1 были обнаружены признаки активации FGFR-сигнального пути, происходящие на фоне снижения уровней экспрессии pKIT и pPDGFRA и отсутствия вторичных активирующих мутаций *KIT* и *PDGFRA*, что свидетельствовало о наличии нового молекулярного механизма развития ВР ГИСО к ИМ.

Цель исследования — определение уровня фоновой и ИМ-стимулированной секреции FGF-2 в ИМ-чувствительных и ИМ-резистентных клетках ГИСО. Оценить уровень экспрессии FGF-2 в ксенографных опухолях до и после воздействия ИМ, а также в образцах опухолевой ткани, полученных от пациентов, до проведения адъювантной терапии ИМ (контроль), а также после ее проведения.

Результаты. Было выявлено значимое время-зависимое повышение уровня FGF-2 в супернатантах ИМ-резистентных ГИСО *in vitro* под влиянием ИМ ($p < 0,001$). Также отмечено существенное повышение уровня FGF-2 в сыворотке мышей с ксенографтными ИМ-резистентными (но не чувствительными к ИМ) ГИСО спустя 7 дней после начала проведения терапии ИМ ($p < 0,01$). Уровень FGF-2 в сыворотке животных коррелировал с экспрессией FGF-2 в ксенографтных опухолях. Было также выявлено значимое увеличение числа FGF-2-положительных опухолей, полученных от пациентов с рецидивом на фоне проводимой терапии ИМ. В частности, экспрессия FGF-2 в первичных ГИСО не превышала 50 % (8 из 16 случаев), а в опухолевом материале, полученном от пациентов с рецидивом ГИСО на фоне проводимой адъювантной терапии ИМ, она составила 80 % (8 из 10 случаев).

Заключение. Вышеизложенное свидетельствует об ИМ-индуцированной аутокринной активации FGFR-сигнального пути опухолевыми клетками ГИСО, резистентными к ИМ, что может обуславливать прогрессирование данного заболевания на фоне проводимой таргетной терапии ИМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (проект № 17-04-00158).

Фактор, индуцированный гипоксией (HIF-1α), в асцитных клетках как биомаркер при раке яичников

Д.Р. Долгова, Т.В. Абакумова, И.И. Антонеева,
И.О. Колодий

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»,
Ульяновск

Гипоксия — критический фактор, который модулирует взаимодействие стромальных, эндотелиальных

и опухолевых клеток. Продукция опухолью транскрипционного фактора HIF-1 α определяется микроокружением и чаще всего сопровождается гиперэкспрессией NF- κ B, ИЛ-6, ИЛ-8, VEGF. Белки семейства HIF-1A можно рассматривать как важнейший компонент опухоляссоциированного воспаления, определяющий агрессивный химиорезистентный фенотип. Исследование клеточного и белкового компонентов асцита при злокачественных опухолях яичника может служить дополнительным прогностическим фактором, позволяющим уточнить молекулярный фенотип и персонализировать лечение.

Цель исследования — изучить взаимосвязь экспрессии HIF-1A в опухолевых клетках асцита с клинико-морфологическими параметрами при РЯ. В опухолевых клетках асцита пациенток с верифицированным РЯ ($n = 50$) после выделения тотальной РНК методом количественной ОТ-ПЦР оценивали нормализованную экспрессию HIF-1A. Для статистического анализа использовали критерии ANOVA, Cochran Q-test (Statistica 13.0).

Выделение и оценка уровня HIF-1A в клетках асцита проводились однократно до хирургического или химиотерапевтического воздействия. По результатам проведенных исследований показано значимое повышение транскрипта HIF-1A в опухолевых клетках асцита при распространении опухолевого процесса: максимальные значения экспрессии наблюдались при IV клинической стадии ($4,286 \pm 1,230$, $p = 0,032$) по сравнению с группой пациентов со II–III стадиями ($1,656 \pm 0,952$). В 80 % случаев выявлена гиперэкспрессия HIF-1A в клетках асцита недифференцированных и низкодифференцированных аденокарцином яичника, отражающая агрессивный характер роста. Взаимосвязь HIF-1A с сывороточным уровнем CA125, возрастом пациенток не выявлена. Cochran Q-test показал повышение риска прогрессирования/раннего рецидива РЯ при увеличении экспрессии HIF-1A в 5,5 раза ($p = 0,018$). Таким образом, экспрессия HIF-1A популяции клеток асцита отражает метастатический потенциал первичной опухоли.

Роль моноцитарно-макрофагальной дифференцировки в чувствительности клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу

Я.В. Евстратова, М.И. Кобякова, А.С. Сенотов,
А.И. Ломовский, Р.С. Фадеев

ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной
биофизики РАН», Пушкино, Московская обл.

Данная работа была направлена на изучение экспрессии TRAIL-рецепторов (TRAIL-R) и, следовательно, чувствительности к TRAIL-индуцированному апоптозу клеток острого миелоидного лейкоза

при моноцитарно-макрофагальной дифференцировке. Баланс про- и антиапоптотических TRAIL-рецепторов может играть ключевую роль в чувствительности опухолевых клеток к основному молекулярному эффектору противоопухолевого иммунитета — цитокину TRAIL. Лейкозные бласты — это незрелые клеточные формы, именно на них направлено действие TRAIL, так как вероятность злокачественной трансформации пролиферирующих клеток несоизмеримо выше, чем дифференцированных высокоспециализированных неделящихся клеток. Исходя из этого, возникло предположение о роли дифференцировки клеток в чувствительности к TRAIL-индуцированному апоптозу.

Исследовали монобластные клетки острого миелоидного лейкоза THP-1 (THP-1wt) в сравнении с клетками THP-1, дифференцированными в моноцитоподобном направлении, с помощью ретиноевой кислоты (ATRA), а также 1 α ,25-дигидроксивитамина D3 (VitD3). Также использовали клетки THP-1, обработанные форболовым эфиром (PMA), и нормальные клетки — моноциты периферической крови и макрофаги человека. Моноциты выделяли из мононуклеарной фракции периферической крови человека.

Экспрессия DcR1 и DcR2 отсутствовала у всех типов клеток. Самый высокий процент клеток, несущих проапоптотические рецепторы DR4 и DR5 (65 ± 2 % и 71 ± 8 % соответственно), наблюдался у клеток THP-1wt. Среди клеток THP-1ATRA отмечали снижение процента клеток, экспрессирующих DR4 и DR5, до 15 ± 9 % и 12 ± 2 % соответственно. Среди клеток THP-1VitD3 наблюдалось снижение числа клеток, несущих DR4, — 12 ± 3 %, а процент клеток, имеющих DR5, достоверно не отличался от процента THP-1wt. Клетки THP-1PMA полностью потеряли DR4, а процент клеток, несущих DR5, снизился до 30 ± 3 %. У моноцитов экспрессия DR4 отсутствовала, DR5 имели 19 ± 7 % клеток. Макрофаги показали отсутствие как DR4, так и DR5.

Полученные данные согласуются с анализом действия izTRAIL на исследуемые клетки. Было показано, что 82 ± 6 % клеток THP-1wt чувствительны к izTRAIL. Кроме этого, 52 ± 5 % клеток THP-1VitD3 и только 15 ± 3 % клеток THP-1ATRA и THP-1PMA были чувствительны к действию izTRAIL. Моноциты и макрофаги были полностью резистентны к действию izTRAIL.

Таким образом, показано, что изменение экспрессии TRAIL-рецепторов, а соответственно, и устойчивость к TRAIL-индуцированному апоптозу коррелируют с дифференцировкой клеток в макрофагальном направлении. Следовательно, моноцитарно-макрофагальная дифференцировка может опосредовать устойчивость как лейкозных клеток, так и нормальных зрелых миелоидных клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу через модулирование экспрессии проапоптотических TRAIL-R.

Работа выполнена в рамках стипендиального гранта Президента Российской Федерации (№ СП-606.2019.4, СП-608.2019.4).

Продукция хемокина CXCL12 в опухолях, полученных из солидных опухолей

А.И. Кузнецова, А.Б. Данилова, Е.А. Просекина,
Н.А. Авдонкина, Т.Л. Нехаева, И.А. Балдуева

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России, Санкт-Петербург

Введение. Современные подходы к противоопухолевой терапии требуют разработки *in vitro* моделей, имитирующих взаимодействие опухоли с микроокружением *in vivo*, ключевую роль в котором играют хемокины (Nagarsheth N. и соавт.). CXCL12 — хорошо изученный хемоаттрактант, по градиенту его концентрации в опухоль мигрируют несущие CXCR4 миелоидные иммуносупрессирующие клетки, дендритные клетки, В-лимфоциты (Nagarsheth N. и соавт.). CXCL12 способствует ангиогенезу, пролиферации химиорезистентности опухолевых клеток, в связи с чем он рассматривается в качестве терапевтической мишени (Meng W. и соавт.).

Цель исследования — оценить продукцию хемокина CXCL12 клетками солидных опухолей, культивируемыми в 2D- и 3D-формате (монослойная культура и тумороид).

Материалы и методы. Культуры клеток миксосаркомы (МФС), меланомы кожи (МК), рака легкого (РЛ), почки (ПКР), РМЖ, толстой кишки (КРР) ($n = 5$) были получены из операционного материала пациентов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Клетки культивировали в монослой или в виде тумороидов, полученных методом «висячей капли», через 7 дней отбирали культуральную среду. Уровень CXCL12 определяли с помощью мультиплексного анализатора BioPlex® 200 (Bio-Rad, США). Всего было проанализировано 20 образцов, после статистической обработки данные представлены как $M \pm m$.

Результаты. Показано увеличение секреции CXCL12 клетками МФС в 20,43 раза в 3D-культуре по сравнению с монослоем ($6456,78 \pm 152,28$ и $315,99 \pm 21,60$ пг/мл соответственно). Тумороиды клеток РЛ также демонстрировали более выраженную продукцию этого хемокина ($4796,88 \pm 6,91$ и $517,04 \pm 14,72$ пг/мл соответственно). Увеличение секреции CXCL12 не наблюдалось в 3D-культурах клеток МК ($216,23 \pm 4,07$ и $215,22 \pm 3,06$ пг/мл) и ПКР ($110,48 \pm 9,63$ и $102,16 \pm 9,30$ пг/мл), а тумороиды РМЖ и КРР продуцировали меньше CXCL12, чем 2D-культуры (в 3D- и 2D-культурах соответственно: РМЖ — $18,32 \pm 4,26$ и $91,93 \pm 5,77$ пг/мл, КРР — $178,25 \pm 5,09$ и $233,17 \pm 0,97$ пг/мл).

Заключение. Выявлены существенные различия секреции CXCL12 тумороидами разного происхождения. Увеличение уровня CXCL12 в некоторых 3D-культурах можно объяснить гипоксическими условиями в центре тумороида (Ceradini D.J. и соавт.), однако

снижение этого показателя по сравнению с 2D-культурой требует дальнейшего изучения. Ось CXCL12/CXCR4 в настоящее время рассматривается в качестве мишени для противоопухолевой терапии, поэтому оценка продукции CXCL12 различными типами солидных опухолей в 3D-моделях *in vitro* важна при разработке препаратов для лечения злокачественных новообразований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09014 от 04.09.2018).

Влияние изменения экспрессии цитоплазматических изоформ актина на регуляцию пула опухолевых стволовых клеток при раке молочной железы

М.В. Новикова¹, В.Б. Дугина², Б.П. Копнин¹,
Н.В. Хромова¹, О.И. Сокова¹, П.Б. Копнин¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Одной из основных причин резистентности к большинству ХТ и радиотерапий, рецидивирования и метастазирования солидных опухолей, в частности РМЖ, является наличие субпопуляции опухолевых стволовых клеток (ОСК), обладающих некоторыми свойствами нормальных стволовых клеток, включая способность к самообновлению и изменению дифференцировочного статуса. Ранее нами были получены данные, указывающие на непосредственную связь между изменением соотношения немышечных цитоплазматических изоформ актина (β и γ) и опухолевым потенциалом неопластических клеток. Поэтому мы предположили, что сдвиг их баланса может играть важную роль в поддержании фенотипа и пула ОСК.

Экзогенная экспрессия β -актина в клетках линии метастазирующей аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) приводила к снижению скорости пролиферации, способности к образованию колоний в адгезивных и неадгезивных условиях, инвазии (в камере Бойдена через заполненные матригелем поры в градиенте ростовых факторов) и миграции (скорость заполнения «клеточной раны»), в то время как гиперэкспрессия γ -актина вызывала противоположный эффект. Некоторые из проведенных тестов являются классическими по определению доли ОСК в культуре неопластических клеток, поэтому полученные данные свидетельствуют о потенциальной роли соотношения цитоплазматических изоформ актина в регуляции пула ОСК.

Принимая во внимание то, что экзогенная экспрессия β -/ γ -актина не приводила к сдвигу их баланса в значительной степени, методом РНК-интерференции

были созданы клеточные сублинии MDA-MB-231 с подавленной экспрессией одной из изоформ актина, что вызывало компенсаторное увеличение экспрессии другой. Подавление экспрессии β -актина приводило к формированию локомоторного фенотипа, в то время как снижение γ -актина — к частичной нормализации и приобретению эпителиоидного фенотипа. По результатам ПЦР в режиме реального времени сдвиг баланса актинов в сторону подавления β -изоформы способствовал повышению экспрессии генов, ответственных за поддержание мультипотентности/стволовости (*SOX2*, *POU5F1*, *NANOG*), индукцию ЭМП (*HES1*, *TWIST1*) и протоонкогена *C-MYC*. Подавление экспрессии β -актина также приводило к индукции экспрессии одного из основных компонентов сигнального пути Notch, непосредственно вовлеченного в процессы неопластической трансформации, опухолевой прогрессии и поддержание фенотипа ОСК, гена трансмембранного рецептора *NOTCH1*. Кроме этого, по данным иммунофлуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии, при подавлении экспрессии β -актина детектировалось увеличение доли CD133+ -клеток (маркер стволовых клеток).

Таким образом, сдвиг баланса цитоплазматических изоформ актина играет непосредственную роль в регуляции фенотипа и пула ОСК в клетках РМЖ, а его определение потенциально может служить дополнительным диагностическим маркером.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-015-00238 А).

Галектин-1 и -3 в механизмах опухолеассоциированной тканевой эозинофилии при раке желудка и толстого кишечника

Е.В. Романова, Ю.В. Колобовникова, О.А. Васильева,
О.И. Уразова, В.В. Новицкий

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Введение. При раке желудка и толстого кишечника весьма часто обнаруживается эозинофильная инфильтрация опухолевой ткани, значение которой до сих пор является не совсем ясным. В регуляции рекрутирования эозинофилов в ткань новообразования принимают участие галектины — белки, экспрессируемые многими клетками и характеризующиеся широким спектром свойств.

Цель исследования — оценить экспрессию галектина-1 и -3 в опухолевой ткани и мРНК гена *галектина-3* в эозинофилах крови при раке желудка и толстого кишечника с тканевой эозинофилией и без нее.

Материалы и методы. Обследованы 107 пациентов (84 мужчины и 23 женщины, средний возраст которых

составил $60,9 \pm 6,8$ года) с верифицированным диагнозом рака желудка (52 больных) и рака толстого кишечника (55 больных). В группу контроля вошли 15 мужчин и 11 женщин сопоставимого возраста. Материал исследования: эозинофильные гранулоциты, выделенные из цельной крови методом иммуномагнитной сепарации, и образцы опухолевой ткани желудка и толстого кишечника, полученные в ходе оперативного вмешательства. Экспрессию галектина-1 и -3 в опухолевой ткани оценивали ИГХ-методом. Исследование экспрессии мРНК гена *галектина-3* в эозинофильных гранулоцитах осуществляли методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Результаты. У пациентов с раком желудка и толстого кишечника вне зависимости от наличия тканевой эозинофилии установлены низкая экспрессия галектина-3 в опухолевой ткани и, напротив, высокий уровень экспрессии мРНК гена *галектина-3* в эозинофильных гранулоцитах крови. У больных раком желудка и раком толстого кишечника с тканевой эозинофилией зарегистрирована низкая экспрессия опухолевыми клетками галектина-1. Показана ассоциация гипоксической экспрессии галектина-1 с эозинофильной инфильтрацией злокачественных опухолей желудка и толстого кишечника.

Заключение. Дефицит экспрессии галектина-1 и -3 в опухолевой ткани при раке желудка и раке толстого кишечника, сопровождающихся тканевой эозинофилией, свидетельствует об отсутствии значимого влияния данных белков на процесс рекрутирования эозинофилов в опухолевую ткань. Повышенный уровень экспрессии галектина-3 эозинофилами крови при раке желудка и толстого кишечника не зависит от наличия эозинофильной инфильтрации опухолевой ткани.

Особенности экспрессии TGF- β 2 и HIF-1 α при плоскоклеточном раке легкого

М.А. Сеньчукова, Е.А. Калинин, Е.И. Шурыгина

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург

Гипоксия является одним из ключевых факторов опухолевой прогрессии, приводя к активации процессов ангиогенеза и эпителиально-мезенхимальной трансформации. Известно, что эти реакции опосредуются через индукцию VEGFR и трансформирующего фактора роста бета (TGF- β).

Цель исследования — изучить особенности экспрессии TGF- β 2 и их корреляции с клиническими характеристиками плоскоклеточного рака легкого (РЛ), выраженностью гипоксии и количеством сосудов разных типов в ткани опухоли.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование были включены архивные блоки 40 радикально

прооперированных пациентов с плоскоклеточным РЛ. Срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином и ИГХ с использованием антител к TGF- β 2, HIF-1 α и CD34. После операции 30 (75 %) пациентов получили адъювантную терапию. 16 пациентов умерли от прогрессирования РЛ в разные сроки после операции, из них 12 (75 %) умерли в первые 3 года после операции.

Результаты. Экспрессия TGF- β 2 отсутствовала или была слабовыраженной в 75 % и выраженной — в 25 % случаев в опухолевых клетках, в 72,5 и 27,5 % случаев — соответственно в строме опухоли. В 20 % наблюдений наряду с сосудами без экспрессии TGF- β 2 присутствовали сосуды с выраженной экспрессией TGF- β 2 в хаотично расположенных эндотелиальных клетках. Эндотелий структур с частичной эндотелиальной выстилкой также был позитивен на TGF- β 2. Выраженность экспрессии TGF- β 2 в опухолевых и стромальных клетках значительно коррелировала с выраженностью экспрессии HIF-1 α ($p = 0,004$ и $p = 0,009$). Этот факт косвенно подтверждает, что гипоксия является основным механизмом, активирующим экспрессию TGF- β 2 в опухолевых клетках. При анализе отдаленных результатов лечения было установлено, что 3-летняя общая выживаемость пациентов с РЛ коррелирует со стадией ($p = 0,0004$), наличием метастазов в региональных лимфатических узлах ($p = 0,0001$) и наличием в солидном компоненте опухоли сосудов, эндотелий которых интимно прилежит к опухолевым клеткам ($p = 0,0008$). Наиболее низкие показатели выживаемости были отмечены при III стадии РЛ (50 %), N2 (42,9 %) и при наличии сосудов в солидном компоненте опухоли (0 %). Достоверных корреляций между 3-летней общей выживаемостью и выраженностью экспрессии TGF- β 2 и HIF-1 α не установлено.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и субъекта Российской Федерации (проекты № 18-415-560005 и 19-415-560004).

Вклад полиморфизма генов специализированных ДНК-полимераз в клиническое течение рака мочевого пузыря

М.П. Смаль¹, А.И. Ролевич², Т.И. Набебина²,
С.А. Красный², А.В. Макарова³, Р.И. Гончарова¹

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
Минск, Республика Беларусь;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Минск,
Республика Беларусь;

³ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН», Москва

Введение. Синтез через повреждение, осуществляемый специализированными ДНК-полимеразами

(спецДНКП) при наличии нерепарированных повреждений ДНК, является важнейшим механизмом преодоления блока репликации и поддержания целостности генома. Вместе с тем сами спецДНКП являются источником мутаций в организме за счет низкой точности синтеза. Поэтому неудивительно, что как повышение, так и снижение активности этих ферментов негативно отражается на функционировании и выживаемости клеток, предрасположенности к канцерогенезу и манифестации онкологических заболеваний.

Цель исследования — анализ влияния 11 полиморфных вариантов генов спецДНКП *REV3L*, *REV1* и *POL1* на особенности клинического течения рака мочевого пузыря (РМП).

Материалы и методы. Генотипирование образцов ДНК, выделенной из периферической крови 216 пациентов с уротелиальными карциномами, по полиморфизму генов спецДНКП выполнено с помощью SNaPshot-анализа и ПЦР в реальном времени.

Результаты. Распределение частот генотипов и аллелей по полиморфным локусам генов *REV3L*, *REV1* и *POL1* в зависимости от клинко-морфологических и патогистологических характеристик РМП показало статистически значимую ассоциацию генотипов СТ+ТТ rs11153292 гена *REV3L* ($p = 0,02$) и генотипа GG rs8305 гена *POL1* ($p = 0,011$) с мышечной инвазией. Кроме этого, обнаружено, что у гомозиготных носителей минорного аллеля А rs3017302 гена *POL1* значимо чаще регистрировались опухоли высокой степени злокачественности ($p = 0,01$).

Что касается влияния полиморфизма исследованных генов на отдаленные результаты лечения, установлено, что независимыми факторами риска возврата заболевания являлись предшествующие рецидивы (ОР 2,7; 95 % ДИ 1,50–4,87; $p = 0,001$), генотипы GG + GA rs3087386 гена *REV1* (ОР 6,22; 95 % ДИ 1,84–21,11; $p = 0,003$) и GG rs462779 гена *REV3L* (ОР 6,11; 95 % ДИ 2,59–14,41; $p < 0,001$). В отношении онкоспецифической выживаемости пациентов выявлены статистически значимые различия в зависимости от полиморфизма rs465646 гена *REV3L* ($p = 0,02$, *log-rank*-тест), при этом гетерозиготный генотип проявлял протективный эффект (ОР 0,35; 95 % ДИ 0,14–0,87; $p = 0,025$).

Заключение. Полиморфные варианты генов спецДНКП могут оказывать влияние на фенотип опухоли и выступать в качестве предикторов рецидивирования и исхода заболевания у пациентов с РМП.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (договор № Б18Р-094).

Роль молекулярных маркеров в лимфогенном метастазировании при плоскоклеточном раке ротоглотки

А.И. Стукань^{1,2}, В.А. Порханов^{2,3}, В.Н. Бодня^{2,3},
Р.А. Мурашко^{1,2}

¹ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1»,
г. Краснодар;

²кафедра онкологии с курсом торакальной хирургии ФПК
и ППС ГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Краснодар;

³ГБУЗ «НИИ — Краевая клиническая больница № 1
им. проф. С.В. Очаповского», Краснодар

Цель исследования — изучить влияние молекулярных маркеров клеточного цикла и клеточной адгезии на регионарный метастатический потенциал при плоскоклеточном раке ротоглотки.

Материалы и методы. Изучены данные 104 больных раком ротоглотки (нёбных миндалин, корня языка, нёбных дужек, мягкого нёба и задней стенки глотки). Выполнен ИГХ-анализ срезов с гистоблоков опухоли с антителами к p16, Ki-67, p53, Е-кадгерину и β-катенину. ВПЧ-позитивный рак устанавливался при гиперэкспрессии (ГЭ) p16 (p16 ≥ 70 %), высокий индекс пролиферативной активности (ПА) — при Ki-67 > 50 %, положительная экспрессия (ПЭ) p53 — при p53 ≥ 25 % окрашенных клеток. Положительная экспрессия (ПЭ) Е-кадгерина и β-катенина означала цитоплазматическое и ядерное (β-катенин) окрашивание.

Результаты. ГЭ p16 выявлена у 24 % больных, высокая пролиферативная активность — у 55 %, положительная экспрессия p53 — у 70 %. Отрицательная экспрессия (ОЭ) Е-кадгерина отмечена у 49 %, положительная экспрессия β-катенина — у 100 % больных. ГЭ p16 ассоциирована с высокой пролиферативной активностью, ОЭ Е-кадгерина — еще и с наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах (ЛУ) ($p < 0,05$). ПЭ p53 выявлена в 70 % случаев рака ротоглотки без ГЭ p16, а при ГЭ p16 — в 72 % случаев. Метастазирование в регионарные ЛУ выявлено у 42 % больных, отсутствие метастазов в ЛУ — у 58 %. Выявление метастазов в ЛУ не связано с полом, возрастом, локализацией, степенью дифференцировки и склонностью к ороговению ($p > 0,05$), а риск их выявления увеличивался при ГЭ p16 (ОР 2,424, 95 % ДИ 1,182–4,971, $p = 0,022$), высокой ПА (ОР 1,790, 95 % ДИ 1,096–2,924, $p = 0,015$), ОЭ Е-кадгерина (ОР 10,392, 95 % ДИ 4,006–26,958, $p < 0,05$). Экспрессия p53 не связана с метастатическим поражением регионарных ЛУ ($p > 0,05$). С учетом площади характеристических кривых (АИС) в ROC-анализе обнаружение метастазов в регионарных ЛУ прогнозировали ГЭ p16, высокая ПА (АИС 0,607 и 0,621 соответственно) и ОЭ Е-кадгерина (АИС 0,855, $p < 0,001$; Se 91 %, Sp 80 %).

1. Суррогатный маркер ВПЧ-позитивного статуса (ГЭ p16), высокий индекс ПА и отрицательная экспрессия Е-кадгерина являются молекулярными предикторами метастазирования в регионарные ЛУ. 2. Свойства инвазивности и метастазирования различны в зависимости от этиологии рака ротоглотки: ВПЧ влияет на инвазивность и миграцию через Wnt-b-катениновый путь, потерю экспрессии Е-кадгерина. ВПЧ-негативный рак гетерогенен по маркерам клеточной адгезии и пролиферации. 3. Риск возникновения метастазов в регионарных ЛУ может учитываться в объеме шейной лимфодиссекции и как показание для биопсии сторожевого ЛУ.

Оценка роли ферментов углеводного обмена в прогрессировании рака молочной железы

О.П. Шатова¹, Е.Ф. Комарова¹, Р.В. Ищенко²,
Е.Ю. Комарова³

¹ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

²ФГБУ «ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий ФМБА России», Москва;

³ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Цель исследования — изучить локальную и системную активность ферментов углеводного обмена у больных РМЖ в зависимости от клинико-морфологических показателей.

Материалы и методы. В операционных биоптатах опухолей (ОП) и окружающих визуально неизмененных (ВН) тканей, а также в сыворотке крови больных РМЖ Т1–4N0–2M0 ($n = 68$, возраст — 46–76 лет) изучали активность ферментов — лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) — методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (KonikromPlus, KonikGroup, Испания) на приборе с PDA-детектором и хроматографической колонкой 250 × 4,6 мм, YMC C18 (TriArt).

Результаты. Показано, что для всех исследованных образцов показатели активности ЛДГ и Г6ФДГ в группе Т3–4 статистически достоверно превышали таковые в группе с Т1–2. При морфологически подтвержденных метастазах в регионарные лимфатические узлы (N1–2) активность ЛДГ и Г6ФДГ была выше в образцах тканей и крови по сравнению с группой N0. Однако активность ЛДГ статистически достоверно увеличивалась при метастазировании не только в ОП, но и в ВН. Методом анализа парных корреляций обнаружили, что в группе с Т1–2 показатели сывороточной активности ЛДГ имеют тесную положительную корреляцию с показателями в опухолевом узле и смежных тканях ($r = 0,85$ и $r = 0,81$ соответственно при $p < 0,05$). Активность Г6ФДГ в сыворотке крови больных статистически

достоверно коррелирует только с соответствующим показателем в ОП ($r = 0,64$ при $p < 0,05$). Сопоставление показателей средних отклонений активностей ЛДГ и Г6ФДГ в зависимости от степени дифференцировки опухоли не показало наличия статистически достоверных различий.

Повышенная активность ферментов углеводного обмена (скорость протекания гликолиза и пентозофосфатного пути) в тканях и сыворотке крови у больных РМЖ коррелирует с увеличением размеров опухолевого узла и наличием метастазов в регионарные лимфатические узлы, однако не связана со степенью злокачественной трансформации эпителиальных клеток молочной железы. Опухолевая активность ЛДГ и Г6ФДГ при небольших размерах опухоли имеет достоверно высокий уровень сопряжения с их сывороточной активностью. Таким образом, ЛДГ и Г6ФДГ участвуют в прогрессировании РМЖ и при дальнейшем исследовании могут рассматриваться как терапевтические мишени для данной онкопатологии.

Участие убиквитин-протеасомной системы на этапах лимфогенного и гематогенного метастазирования при раке молочной железы

Е.Е. Шашова^{1,2}, Е.С. Колегова¹, Г.В. Какурина¹,
Н.А. Тарабановская¹, А.В. Дорошенко¹, О.А. Карелина²,
Д.А. Коршунов¹, Е.М. Слонимская¹, И.В. Кондакова¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Введение. Проблема прогрессирования РМЖ является актуальной для современной онкологии. Это вызвано сложностью прогнозирования развития и течения онкологического процесса, а также поиском подходов к лечению в связи с высокой гетерогенностью данной онкопатологии. Исследование убиквитин-протеасомной системы является актуальным с позиций оценки ее вклада в патогенетическую гетерогенность РМЖ, так как она участвует в регуляции ключевых процессов, связанных с течением и прогрессией опухолей, таких как пролиферативная активность, апоптоз, неоангиогенез и функционирование иммунной системы. Кроме того, убиквитин-протеасомная система играет большую роль в регуляции уровня показателей, определяющих молекулярный подтип РМЖ.

Цель исследования — изучение особенностей внутриклеточного протеолиза на этапах лимфогенного и гематогенного метастазирования, характерных для различных молекулярных подтипов РМЖ. Всего в исследование были включены 159 пациенток с люминальным А-, люминальным В-подтипом и ТНР молочной железы со стадиями T1–3N0–3M0, комбинированное лечение которых было начато с оперативного этапа.

Материалы и методы. Материалом для исследования были опухолевая и гистологически неизменная ткани молочной железы. Оценивались химотрипсиноподобная (ХПА) и каспазаподобная (КПА) активности протеасом флуориметрическим методом, а содержание субъединиц протеасом изучалось с помощью вестерн-блоттинга. Также были определены коэффициенты ХПА протеасом (кХПА), КПА протеасом (кКПА) и коэффициент активности кальпаинов (КАК).

Результаты. Было выявлено, что протеасомы и кальпаины вносят определенный вклад на различных этапах прогрессирования РМЖ. Продemonстрировано взаимное влияние друг на друга показателей, на основании которых определяют молекулярный подтип РМЖ, и внутриклеточных протеолитических систем. Методом линейной регрессии выявлена связь ХПА, КПА протеасом в опухоли с содержанием рецепторов эстрогенов, рецепторов прогестерона и уровнем маркера пролиферативной активности Ki67 ($p < 0,05$). Тем не менее, несмотря на биологическую универсальность протеасомной системы, существуют особенности ее функционирования, характерные для каждого молекулярного подтипа РМЖ. Показано, что при люминальном А РМЖ поражение метастазами 4 и более регионарных лимфатических узлов (N2–3) сопровождается увеличением КПА и содержанием регуляторной PA28 β субъединицы протеасом. При люминальном В-подтипе РМЖ, напротив, наблюдается угнетение КПА на фоне высокого содержания $\alpha 1\alpha 2\alpha 3\alpha 5\alpha 6\alpha 7$ и PA28 β субъединиц протеасом. При ТНР поражение метастазами 4 и более регионарных лимфатических узлов ассоциировано со снижением кКПА протеасом и не оказывает выраженного влияния на их субъединичный состав. Полученные результаты отражают биологические особенности лимфогенного распространения опухоли, характерные для различных молекулярных подтипов РМЖ. Кроме того, получены данные о прогностической значимости изменения кХПА и кКПА относительно развития отдаленных метастазов. Установлено, что значение кХПА более 2,45 является значимым показателем неблагоприятной 5-летней безметастатической выживаемости при люминальном А РМЖ. При люминальном В-подтипе рака показатели 5-летней безметастатической выживаемости были ассоциированы с уровнем ХПА и кКПА протеасом: кКПА выше 2,19 ассоциирован с высокой вероятностью развития отдаленных метастазов у больных люминальным А-, люминальным В-подтипом и ТНР РМЖ.

Заключение. Обобщая представленные в работе данные, можно заключить, что протеасомная система играет важную роль в патогенезе различных молекулярных подтипов РМЖ, оказывая свое влияние на этапах прогрессирования. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования показателей протеасомной системы в качестве дополнительных прогностических критериев при оценке риска развития отдаленных метастазов у больных РМЖ.

Роль IGF-1 в развитии множественной лекарственной устойчивости, обусловленной гиперэкспрессией гена *LRP/MVP*, у больных множественной миеломой

С.С. Шушанов¹, Т.А. Кравцова¹, Н.П. Акентьева²,
Ю.Б. Черных³

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «Институт проблем химической физики РАН»,
Черноголовка, Московская обл.;

³ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва

Введение. Инсулиноподобные факторы роста (IGF) являются одними из широко изучаемых факторов в онкологии. Для опухолей с высоким уровнем экспрессии этих факторов характерен послеоперационный рецидив, они являются инвазивными и дают отдаленные метастазы. Мы установили, что для пациентов с множественной миеломой (ММ), у которых наблюдается высокий уровень экспрессии гена *IGF-1*, характерно уменьшение показателя общей выживаемости, и у таких больных зарегистрирована клиническая резистентность к ХТ. Одним из механизмов, объясняющих низкую общую выживаемость при гиперэкспрессии гена *IGF-1*, может являться возникновение множественной лекарственной устойчивости (МЛУ).

Наша работа посвящена исследованию роли *IGF-1* в развитии МЛУ, обусловленной гиперэкспрессией гена *LRP/MVP*, у больных ММ. По литературным данным, ген *LRP/MVP* экспрессирован приблизительно у 50 % больных ММ и его экспрессия ассоциирована с плохим ответом на лечение больных мелфаланом и в целом с более короткой продолжительностью жизни больных ММ. Считается, что *LRP/MVP* может быть использован в качестве генетического маркера для предсказания слабого терапевтического ответа при ММ.

Цель исследования — изучить роль *IGF-1* в развитии феномена МЛУ, обусловленной гиперэкспрессией гена *LRP/MVP*, у больных ММ.

Материалы и методы. В работе были исследованы 35 образцов костномозговых аспиратов, полученных от больных ММ. У всех пациентов была диагностирована ММ III стадии. Возраст пациентов составлял от 52 до 72 лет. Из образцов костномозговых аспиратов с помощью центрифугирования в градиенте Ficoll получали моноклеарную фракцию клеток костного мозга, содержащую плазматические клетки, и проводили процедуру выделения тотальной РНК. Исследование экспрессии мРНК гена *IGF-1* и мРНК гена *LRP/MVP* проводили с использованием полуколичественной ОТ-ПЦР и количественной ПЦР в реальном времени. В исследовании роли *IGF-1* в регуляции экспрессии гена *LRP/MVP* также использована культура клеток ММ человека RPMI 8226.

Результаты. В образцах костномозговых аспиратов, полученных от больных ММ, мы исследовали экспрессию генов *IGF-1* и *LRP/MVP* и с помощью метода линейной корреляции Пирсона (r) оценили корреляционную зависимость между экспрессией этих генов. Проведенный анализ показал, что экспрессия мРНК *IGF-1* достоверно коррелирует с экспрессией мРНК *LRP/MVP* ($r = 0,60$; $p < 0,0001$). Поскольку наше предположение о том, что фактор роста IGF-1 участвует в регуляции экспрессии гена *LRP/MVP*, основано на корреляционных данных, дальнейшие исследования мы выполнили на культуре клеток ММ человека RPMI8226. В ходе эксперимента мы установили, что в клетках RPMI8226 ингибирование экспрессии рецептора *IGF-1R* приводит к ингибированию экспрессии гена *LRP/MVP*.

Заключение. Наши данные свидетельствуют о том, что IGF-1/IGF-1R-зависимый сигнальный путь регулирует экспрессию гена *LRP/MVP* и таким образом участвует в регуляции механизмов возникновения *LRP/MVP*-опосредованной МЛУ у больных ММ. Высокий уровень экспрессии гена *IGF-1* может являться неблагоприятным прогностическим фактором при ММ.

ФАКТОРЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА И МЕХАНИЗМЫ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Доклады

Экспрессия в опухолевой ткани регуляторного белка MDM2 при различных молекулярно- биологических типах рака эндометрия: есть ли связь с метаболическими факторами и пролиферативной активностью?

Л.М. Берштейн, А.О. Иванцов, Т.Е. Порошина,
Д.А. Васильев, А.Г. Иевлева

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава
России, Санкт-Петербург

Введение. В настоящее время выделяют 4 основных типа рака эндометрия (РЭ): с мутацией гена *POLE*, дефектом репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR-D), признаками экспрессии белка p53 и без специфического молекулярного профиля (WCMP) (Talhouk и соавт., 2017; Вторушин, Малых, 2017; Berstein и соавт., 2019). Одними из важных посредников в процессе канцерогенеза являются ген *mdm2* и кодируемый им белок с аналогичным названием, относимый к числу негативных регуляторов функций p53 и, по некоторым данным, избыточно экспрессируемый в ткани РЭ (но без указания на тип заболевания) (Zou и соавт., 2018). Известно несколько механизмов активации белка MDM2, включая его фосфорилирование, что препятствует ингибирующему влиянию MDM2 на p53 (Goldberg и соавт., 2002); в свою очередь, активированный белок p53 стимулирует экспрессию гена *mdm2*. Активация p53 наблюдается, помимо гипоксии и других стрессорных сигналов, под влиянием избытка питательных ресурсов (в частности, глюкозы и высокожировой диеты) (Barzalobre-Gerónimo и соавт., 2015; Krstic и соавт., 2018), что предотвращается наряду с угнетением пролиферации и экспрессии MDM2 в клеточной линии РЭ Ishikawa антидиабетическим бигуанидом метформинном с указанием на возможность существования метаболических регуляторов сигнальной системы PI3K/AKT/MDM2 (Qiang и соавт., 2019).

Цель исследования — изучить сравнительную частоту экспрессии белка MDM2 в ткани карцином эндометрия, принадлежащих к каждому из 4 перечисленных выше типов РЭ, сопоставить ее выраженность с пролиферативной активностью (Ki-67) этих типов опухолей, величиной индекса массы тела (ИМТ) больных, а также с индексом инсулинорезистентности (ИР) и уровнем гликемии у них.

Материалы и методы. ИГХ-оценка экспрессии MDM2, расценивавшейся как позитивная или негативная, проведена в депарафинированных срезах опухолевой ткани 226 больных РЭ (средний возраст — 60,4 года); там же оценена экспрессия маркера пролиферации Ki-67. У всех больных подсчитан ИМТ (Quetelet), в сыворотке крови 223 пациенток определен уровень глюкозы натощак, у 162 рассчитан ИР (Matthews и соавт., 1985).

Результаты. Положительная экспрессия MDM2 выявлена в общей группе больных РЭ в 86 % случаев, при гиперэкспрессии и умеренной экспрессии p53 resp. — в 100 и 95,5 % соответственно, при MMR-D-типе — в 93,2 %, при WCMP-типе РЭ — в 79,8 % и при типе с мутацией гена *POLE* — в 66,7 %. В общей группе больных РЭ позитивная экспрессия MDM2 сочеталась с тенденцией к менее выраженной ИР, в этой же группе, а также при типах WCMP и MMR-D — с наклонностью к меньшей частоте ожирения (ИМТ ≥ 30), а во всей группе и при WCMP-типе РЭ — с достоверно более высокой пролиферативной активностью опухолевой ткани.

Заключение. Частота выявления в ткани карцином эндометрия позитивной экспрессии MDM2 — регулятора клеточного цикла и активности p53 — определяется молекулярно-биологическим типом РЭ и дефицитом метаболических факторов, сопряженных с ожирением и ИР, что может, помимо интенсивности клеточного деления, оказывать влияние на другие маркеры, ассоциированные с течением процесса (включая, не исключено, рецепторный статус и иммунофенотип новообразования).

Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (проект № 18-015-00026).

Роль рецепторов гемопоэтических факторов роста в формировании устойчивости лейкозных клеток к ингибиторам киназ

Э.Р. Вагапова^{1,2}, Т.Д. Лебедев¹, Н.Ю. Пойменова¹,
О.Ю. Григорук^{1,2}, П.В. Спирин¹, В.С. Прасолов¹

¹ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)», Москва

На сегодняшний день цитокинопосредованные механизмы формирования резистентности злокачественных клеток к терапевтическим агентам остаются малоизученными. У большинства пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) обнаруживают гиперэкспрессию генов, кодирующих рецепторные тирозинкиназы (РТК), такие как KIT. Однако ингибиторы РТК не показали свою эффективность при лечении этого типа рака кроветворной системы. Данная работа направлена на выявление новых регуляторных механизмов, ответственных за избежание гибели лейкозных клеток под действием таргетных препаратов, а также на обнаружение новых прогностических маркеров, ассоциированных с повышенной экспрессией гемопоэтических рецепторов.

Обработка перевиваемых клеток лейкоза человека цитостатическим агентом (цитарабином) или ингибитором РТК (иматинибом) приводит к значительному повышению экспрессии рецепторов факторов роста — эритропоэтина (EPOR), тромбопоэтина (MPL) и фактора роста макрофагов (CSF1R) на уровне мРНК и белка. Более того, EPOR и MPL способны стимулировать рост и/или выживание клеточных линий лейкоза человека при наличии ХТ-агентов. Мы провели анализ общедоступных данных РНК-секвенирования образцов больных ОМЛ (237 больных) и выявили гены, экспрессия которых ассоциирована с высокой экспрессией MPL, CSF1R. Мы обнаружили, что значительное число дифференциально экспрессируемых генов в группе больных с высокой экспрессией MPL связано с плохим прогнозом, в то время как коэкспрессирующиеся с CSF1R гены связаны с хорошим прогнозом. Таким образом, в ходе работы были обнаружены компенсаторные механизмы, реализуемые в злокачественных кроветворных клетках в ответ на подавление активности РТК, которые связаны с активацией экспрессии EPOR, MPL и CSF1R. Также мы обнаружили новые прогностические маркеры, ассоциированные с высокой экспрессией MPL.

Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (проекты № 19-34-80029 и 17-04-01555).

Мутационный ландшафт морфологических изменений эпителия бронхов, предшествующих плоскоклеточному раку легкого

П.А. Гервас¹, А.А. Щеголева^{1,2}, А.А. Пономарева¹,
Т.И. Коновалова², А.А. Зарубин³, Е.В. Денисов¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский
государственный университет», Томск;

³НИИ медицинской генетики ФГБНУ «Томский
НИМЦ РАН», Томск

В настоящее время хорошо известно, что плоскоклеточному раку легкого предшествует ряд морфологических изменений в бронхиальном эпителии: базально-клеточная гиперплазия (БКГ), плоскоклеточная метаплазия (ПМ) и дисплазия (Д). Изучение молекулярно-генетической природы таких изменений представляет большой интерес, в первую очередь с целью идентификации триггеров прогрессирования в ряду БКГ—ПМ—Д — карцинома *in situ* — инвазивный рак. В доступной литературе данные о мутационных событиях в генах при различных гипер-, мета- и диспластических процессах эпителия бронхов скудны.

Цель исследования — изучение мутационного ландшафта респираторного эпителия на разных этапах предопухолевого процесса.

Материалы и методы. Забор операционного материала нормальной ткани легкого в отдалении от опухоли производился у больных плоскоклеточным раком легкого. Нормальный эпителий бронхов и различные типы морфологических изменений (изолированная БКГ, БКГ, сочетанная с ПМ) получали из срезов тканей с помощью метода лазерной микродиссекции (PALM) с последующей полногеномной амплификацией (Biopon, Германия). Подготовка библиотек проводилась с использованием набора NimbleGen SeqCap Choice panel (Roche, NimbleGen) (981 ген). Секвенирование выполнялось на платформе MiSeq (Illumina, США).

Результаты. В морфологически измененном эпителии по результатам данных NGS были обнаружены несинонимичные, а также приводящие к сдвигу рамки считывания или к стоп-кодону нуклеотидные замены. Нами найдено 18 нуклеотидных замен с неизвестным клиническим значением согласно dbSNP. Впервые обнаружены нуклеотидные замены в генах контроля клеточного цикла (KIAA1549, KIT), репарации ДНК (XPC, ERCC5), генах воспаления (TNFRSF10), онкогенах (CCND3) и др. Таким образом, нами выявлены новые гены и мутации, вовлеченные в предопухолевую трансформацию бронхиального эпителия, что, возможно, позволит в дальнейшем идентифицировать первичные драйверные мутации, которые могут служить важнейшими мишенями

при разработке новых терапевтических средств с целью предотвращения развития рака легкого.

*Работа выполнена при поддержке стипендии
Президента Российской Федерации
(№ СП-1549.2018.4).*

Топология натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b при злокачественной трансформации клеток

**Р.Г. Киямова¹, Л.Ф. Минигулова¹, В.С. Скрипова¹,
М.В. Богданов^{1,2}**

¹НИЛ «Биомаркер» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет», Казань;

²кафедра биохимии и молекулярной биологии НМЦ Техасского
университета, Медицинская школа МакГоверна, Хьюстон, США

Поиск специфических мишеней для таргетной противоопухолевой терапии остается приоритетной задачей в современной онкологии. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b (SLC34A2, NaPi-Пb, NPT2b) является интегральным мембранным белком с большим экстрамембранным доменом (ЭМД4), что делает его перспективной мишенью для таргетных противоопухолевых препаратов. Фосфатный транспортер NaPi2b принадлежит к семейству транспортеров SLC34A2 и участвует в поддержании фосфатного гомеостаза в организме человека, экспрессируясь в ряде нормальных тканей, при этом aberrантная экспрессия NaPi2b наблюдается при РЯ, легкого, РМЖ, папиллярном РЩЖ и других видах рака.

Наш проект направлен на изучение распознавания МА доменов транспортера NaPi2b в норме и в условиях, имитирующих опухоль (гипоксия, низкий pH и мутации). Нами клонирован район эпитопа для МА MX35 и L-NaPi2b и показано, что распознавание этими МА обусловлено дисульфидными связями, гликолизированием в районе эпитопа и отменяется мутацией в положении T330V. Выявлено, что топология белка претерпевает значительные изменения в условиях гипоксии и низкого pH, при этом его N-концевой фрагмент может быть локализован снаружи клетки, что делает его привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии. Полученные данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение при разработке новых таргетных препаратов против транспортера NaPi2b.

*Работа выполнена за счет субсидии, выделенной
в рамках государственной поддержки Казанского
(Приволжского) федерального университета в целях
повышения его конкурентоспособности среди ведущих
мировых научно-образовательных центров.*

Исследование энергетического метаболизма опухолевых клеток методом флуоресцентной время- разрешенной микроскопии при химиотерапии

**М.М. Лукина¹, Л.Е. Шимолина^{1,2}, В.В. Дуденкова^{1,2},
Н.И. Игнатова¹, В.И. Щеславский¹, Е.В. Загайнова^{1,2},
М.В. Ширманова¹**

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский
университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

²ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород

На сегодняшний день остается нерешенной проблема мониторинга раннего ответа опухолевых клеток на лечение. Предположительно изменения в биоэнергетике клетки могут быть использованы в качестве индикатора ответа опухоли на лечение. Кофакторы никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и флавиноадениндинуклеотид (ФАД) выступают главными переносчиками протонов и электронов в реакциях энергетического метаболизма и обладают собственной флуоресценцией. Флуоресцентный время-разрешенный имиджинг (FLIM) на основе регистрации флуоресценции кофакторов является перспективным методом для исследования энергетического обмена клетки.

Цель исследования — изучение энергетического метаболизма опухолевых клеток методом FLIM при ХТ.

Работа проводилась на монослойных клеточных культурах (HeLa Kyoto — РШМ человека), опухолевых сфероидов (HeLa Kyoto) и мышечных опухолях (HeLa Kyoto и СТ26 — КРР мыши). Лечение осуществляли препаратами цисплатин, паклитаксел и иринотекан. Исследование проводили на установках LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) и MPTflex (JenLab, Германия) с FLIM приставками ST 150 TSCPC (Becker & Hickl GmbH, Германия).

В результате исследований *in vitro* и *in vivo* установлены универсальные изменения оптических метаболических параметров в опухолевых клетках независимо от механизма действия препарата: увеличение редокс-отношения ФАД/НАД(Ф)Н и снижение вклада свободного НАДН в ответ на лечение. Показано, что изменения параметров флуоресценции кофакторов наблюдаются до морфологических и ростовых проявлений ответа опухоли на лечение.

Таким образом, исследование энергетического метаболизма методом FLIM является перспективным подходом для мониторинга ответа опухолевых клеток на ХТ.

*Работа выполнена при финансовой
поддержке РФФИ (проекты № 18-315-00373 мол_а
и 18-29-09054 мк).*

Экологически обусловленный окислительный стресс в онкогенезе у детей

С. К. Пинаев¹, А. Я. Чижов²

¹ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет» Минздрава России, Хабаровск;

²ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Изучение молекулярных механизмов канцерогенеза год от года высвечивает все больше деталей этого процесса. Одни из них служат трамплином для нового витка исследований, другие ложатся в основу новых таргетных препаратов для терапии опухолей. Неизбежным следствием этого является нарастание степени персонализации и адресности лечебного процесса, зачастую без кардинального повышения конечной эффективности. Поэтому по-прежнему актуальным остается исследование универсальных механизмов онкогенеза, способных быть основой для выхода на новые системные подходы к профилактике и лечению рака.

Одним из таких универсальных механизмов является экологически обусловленный окислительный стресс (ОС). Подавляющее большинство экологических факторов (ЭФ) с онкогенным потенциалом реализуют свое воздействие через образование активных метаболитов кислорода, азота и углерода, что позволяет рассматривать ОС как своего рода «точку сборки» разнообразных факторов внешней среды в единый вектор.

Помимо этого, многие ЭФ оказывают влияние на элементы антиоксидантной системы, снижая ее способность компенсировать формирующийся ОС. Также установлено прямое воздействие ряда ЭФ на эпигеномную регуляцию функционирования генов, участвующих в онкогенезе и развитии опухолей. При этом ОС обладает прямым иммуносупрессивным действием, повышая таким образом шансы на выживание у трансформированных клеток.

Особую роль экологически обусловленный ОС играет в онкогенезе у детей младшего возраста (0–4 года). Особенности опухолевой патологии этого периода являются ее преимущественно пренатальный генез, тесная связь процессов эмбриогенеза и органогенеза с канцерогенезом, а также относительно короткие сроки между воздействием ЭФ и развитием новообразований. В генезе опухолей этого возраста существенная роль отводится эпигеномной регуляции генов, отвечающих за функционирование семафоринов и интегринов.

Изучение временных трендов опухолей детского возраста может явиться ключом к выявлению их связи с конкретными ЭФ, став основой для разработки мер профилактики. При этом постоянные тренды могут быть свидетельством антропогенных влияний, тогда как циклические процессы более характерны для ЭФ природного происхождения.

Например, лейкоз у детей в России на протяжении последних 22 лет демонстрирует постоянный рост заболеваемости. За период 1997–2007 гг. его частота увеличилась на 33,17 %, в 2008–2018 гг. процесс продолжился, и прирост составил еще 19,84 %. С учетом данных литературы, а также полученных нами данных о связи дыма с частотой лейкоза у детей можно говорить о том, что одной из существенных причин роста заболеваемости данной патологией в России является нарастающее загрязнение воздушной среды городов выхлопными газами транспортных средств. В свете этого проясняется хорошо известная связь повышенной частоты детского лейкоза с высоким уровнем экономического развития страны. Соответственно, в качестве меры профилактики будущим родителям следует рекомендовать с момента за 1 год до планового зачатия избегать нахождения в дымных местах, защищать органы дыхания эффективными респираторами и очищать воздух в помещениях фильтрами.

Другим примером являются неходжкинские лимфомы у детей, частота которых в России на протяжении 22 лет имеет нулевой уровень прироста. В то же время для указанной патологии характерны как ежегодные, так и длиннопериодические циклы со значительными колебаниями уровней заболеваемости, что согласуется с нашими данными о связи частоты неходжкинских лимфом с изменениями магнитного поля Земли под влиянием активности Солнца. Мерой защиты будущих детей при данной патологии будет, при наличии возможности, выбор для планирования беременности периодов более спокойного Солнца.

Помимо этого, исходя из системного механизма реализации онкогенных факторов внешней среды через ОС, меры профилактики всех форм злокачественных новообразований у детей должны включать в себя средства, способствующие улучшению антиоксидантной защиты у будущих родителей, молодых мам, а также непосредственно самих детей младшего возраста. А с учетом иммуносупрессивного действия ОС является целесообразным включение в защитный комплекс рекомендованного Минздравом России такого эффективного средства иммунореабилитации, как трансфер-фактор.

The role of specific macrophages populations in colon homeostasis and cancer

A. S. Chikina^{1,2}, T. Thomas-Bonafos², M. San-Roman², M. Maurin², A.-M. Lennon-Dumenil², D. Vignjevic¹

¹UMR144 Subcellular structure and cellular dynamics, Institut Curie, PSL Research University, Paris, France;

²U932 Immunité et Cancer, Institut Curie, INSERM, PSL Research University, Paris, France

Accumulating evidences suggest that tumors at distal and proximal colon acquire different mutations and involve

different signaling pathways (Missiaglia et al., 2014), suggesting colorectal cancer should be viewed as a heterogeneous disease, with proximal and distal colorectal cancer showing multiple biological and clinical differences as well as different mortality rate of patients (Minoo et al., 2010).

Proximal and distal colon are also associated with different microenvironment. Several components of resident microbiota (bacteria, fungi, archaea) populate specific regions of the colon regulating formation and function of the local immune system (Mowat and Agace, 2014). Indeed, several immune response-associated markers showed significant difference among proximal and distal colon carcinomas (Merlano et al., 2017). These include CD68 and CD163, well-known markers of macrophages (MFs). MFs differ between small and large intestines (Bujko et al., 2017) and are known to affect progression of colon carcinoma. However, it is not clear whether MFs differ in proximal versus distal colon in the homeostasis which potentially can results in different efficiencies of carcinoma formation at these sites. We hypothesized that MFs can be specialized within the colon to maintain and locally support the distinct functions of its proximal and distal regions. Accordingly, we observed that MFs in the distal colon form a unique type of dendrites, which we named balloon-like protrusions (BLPs), that are inserted in between epithelial cells. We have demonstrated that formation of BLPs highly depends on amount of absorbed water. At the same time, we have shown that formation of BLPs is also dependent on amount of intestinal fungi, in anti-fungi treated animals, formation of BLPs is blocked. These results align well with the known fact, that fungi populate mostly the distal, but not proximal colon, thus following the same gradient as BLPs. We thus hypothesized that BLP-wearing MFs can sample absorbed fluids and control the rate of their absorption by intestinal epithelium in order to prevent potentially dangerous fungal metabolites from entering the blood. Using CD64-DTR mediated or antibody-mediated MFs depletion, we showed that in mice without MFs, normal epithelium of distal colon undergoes massive apoptosis.

In this regard it may be proposed that BLPs-equipped MFs are responsible for fungal metabolite uptake thus shielding epithelium from its toxicity. If so, further investigation analyzing how BLPs-equipped MFs change in tumor environment and whether they play a special role in colorectal cancer progression are required.

Heat shock factor as a model for anticancer drug development: artificial intelligence approaches

A.M. Erkine

Butler University, Indianapolis, Indiana, USA

Heat shock factor (HSF) is the principal regulator of molecular chaperone genes and as such is responsible

for the protein homeostasis in the cell. Function of molecular chaperones is directly involved in carcinogenesis regulating apoptosis and recognition of malignant cells by the immune system. Inhibitors of molecular chaperones and potentially inhibitors of HSF are considered as potential anticancer drug leads.

As a typical gene activator HSF has two obligatory domains: the DNA-binding domain (DBD) and the transcriptional activation domain (TAD). While DBDs are generally well understood having specific structure and recognising a specific target DNA consensus sequence, TADs, however, are a biochemical enigma: (I) they are typical examples of intrinsically disordered regions, (II) are highly variable without having a consensus sequence, yet able to replace each other with the retention of functionality, and (III) their interaction targets are uncertain and characterized by "fuzzy" low affinity and low specificity interactions.

Applying machine learning (ML) to datasets generated by in vivo screening for functional TADs of HSF, we confirmed that TADs do not possess any conventional sequence consensus, have no specific structure, are hugely variable (theoretically up to 10^{24} interchangeable sequences), and their function cannot be explained by the conventional mechanism involving physical recruitment of coactivators and general transcription factors. The highest gain in performance of ML algorithms has a feature describing TADs as sequence variants containing at least one of a large variety of short mini-motifs with negatively charged and aromatic amino acids. This "detergent-like" arrangement is consistent with the radically new mechanistic model whereby aromatic residues intercalate into nucleosomal DNA, while the negatively charged extremity transiently interacts with histones' Ks or Rs. The resulting nucleosome distortion triggers promoter chromatin remodelling by conventional enzymatic complexes and stimulates the transcription initiation complex assembly.

Development of ML algorithms is an especially useful tool in connection with the CRISP-Cas9 DNA editing of HSF gene, which is responsible for maintenance and modification of protein homeostasis within the cell, which in turn affects the carcinogenesis.

Modulation of NK cell activity by different cytokine *in vitro* conditions for cancer patients

V. Jurišić¹, K. Mirjačić-Martinović², A. Vuletić², G. Konjević²

¹Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia;

²Institute of Oncology and Radiology, Belgrade, Serbia

NK cells are important effectors of innate immune response that were defined by their capacity to kill certain tumour-target cells without prior sensitisation or major histocompatibility restriction. They are characterized as

CD3⁻CD56⁺CD16⁺ and NKp46 natural cytotoxicity receptor positive phenotype and comprise 5–16 % of peripheral blood lymphocytes. It was shown that different cytokines have possibility to modulate NK cytotoxic activity in cancer patients. Based on this we investigated effect of IL-2, -12, -18 and their combination *in vitro* condition from lymphocytes separated from cancer patients and healthy controls. The immunomodulatory effects of several cytokines was estimated by measurement of NK cell activity by classical radioactive Cr release assay and by measurement NK activation and inhibiting receptors on gated cells on Flow

cytometry (Becton Dickinson) in patients with different cancer in comparison to effects of healthy controls. Results indicated that between several cytokines, mostly IL-2, -12 induced significantly increase NK cell activity in melanoma patients ($p < 0.05$) but depending on clinical stage. Effects in less expressed in cancer patients then in healthy controls. We postulated that effects stimulatory cytokines in cancer patients is limited, probably by presence mostly inhibitory receptors on NK cells and presence suppressive effects of elevated values of other cytokines that exist in serum of cancer patients.

Постеры

Исследование экспрессии микроРНК, потенциально регулируемых прогестероновым и андрогеновым рецепторами, в культуре клеток MCF7

Е.Ю. Алексеенко, Т.С. Калинина

ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН»,
Новосибирск

С процессами канцерогенеза молочной железы связаны нарушения в активности рецепторов стероидных гормонов. Прогестероновый рецептор (PR) является маркером, который применяется в диагностике РМЖ, а изменение в экспрессии андрогенового рецептора (AR) в последние годы ассоциируют с прогрессированием РМЖ и способностью к метастазированию. С другой стороны, известно, что важными участниками процессов канцерогенеза также являются микроРНК (miR). Можно предположить, что регулируемые данными рецепторами микроРНК влияют на течение заболевания, и их экспрессия меняется в ходе прогрессирования РМЖ. Поэтому целью работы стал поиск микроРНК, чувствительных к действию прогестерона или тестостерона, с использованием AR-, PR-позитивных клеток культуры MCF7.

Для исследования были выбраны микроРНК, в моторных областях которых согласно данным биоинформатического анализа присутствуют сайты связывания AR и PGR (miR-200c, -184, -190a, -21, -423, -193b, -216, -324, -127, -194), а также некоторые онкогенные микроРНК. Уровень данных микроРНК был измерен при помощи метода ОТ-ПЦР в реальном времени в клетках культуры MCF7, обработанных дозами гормонов 10 и 100 нМ. Было выявлено снижение экспрессии miR-27a, -24, -184, -21, -216 в 1,3–1,9 раза спустя 6 ч инкубации с высокой дозой тестостерона. На 2-е сутки после добавления как высокой, так и низкой концентрации тестостерона увеличивался уровень miR-200b, -190a, -21, -423, -193b, -216, -127 в 1,2–1,6 раза. В ответ на обработку клеточной культуры прогестероном происходило снижение экспрессии спустя 6 и 24 ч miR-190a, -21, -216. Спустя 6 ч инкубации с прогестероном значительно увеличивался — в 1,5 и 2 раза — уровень miR-324: после инкубации с низкой и высокой дозой прогестерона соответственно.

Таким образом, изменение активности AR и PR приводит к изменению экспрессии ряда микроРНК, что позволяет отнести данные микроРНК к потенциальным участникам гормонозависимого канцерогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ
(грант № 19-15-00319).

Влияние антиканцерогенных ДНК-тропных природных малых молекул на локализацию линкерного гистона H1

О.А. Власова¹, И.А. Чернова², А. Сафина³, Е.А. Лесовая^{1,4},
К. Гурова³, А. Джордан⁵, К.И. Кирсанов^{1,6}, М.Г. Якубовская¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва;

³Онкологический центр «Розвелл Парк», Буффало, США;

⁴ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Рязань;

⁵Институт молекулярной биологии Барселона, Барселона,
Испания;

⁶ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Введение. Для ряда природных соединений (апингенин, генистеин, ресвератрол, куркумин и др.), демонстрирующих антиканцерогенное действие на различных моделях канцерогенеза *in vitro* и *in vivo*, было показано их взаимодействие с дцДНК без образования ковалентных связей посредством интеркаляции или связывания с узкой бороздкой ДНК. Мы предполагаем, что подобно противоопухолевому препарату кураксину CBL0137, имеющему сходные характеристики связывания с ДНК, для ряда данных соединений также может происходить изменение пространственных, физико-химических и структурных характеристик ДНК, что может приводить к нарушению функционирования белков метаболизма ДНК и вызывать дестабилизацию хроматина. В частности, эффекты этих природных ДНК-связывающих соединений могут быть вызваны их влиянием на процесс упаковки ДНК через вытеснение линкерного гистона H1 из хроматина.

Материалы и методы. 1. Прижизненная микроскопия клеток: клеточная линия с флуоресцентно-меченым гистоном H1.5 (HT1080 H1.5-mCherry) была обработана соединениями интереса в нетоксичных концентрациях с экспозицией от 1 до 24 ч. 2. Метод вестерн-блоттинга на клеточной линии HeLa: были определены локализации вариантов линкерного гистона H1.2 и H1.4 в нуклеоплазматической и хроматин-связанной ядерных фракциях клеток до и после обработки агентами в 2 нетоксичных концентрациях с экспозицией 24 ч.

Результаты. При исследовании локализации варианта линкерного гистона H1.5 с помощью флуоресцентной микроскопии в живых клетках были выявлены значительные различия между клетками, обработанными ДНК-связывающими соединениями, и клетками контрольной группы. В частности,

произошло увеличение доли клеток, в которых гистон H1.5 локализован в ядрышках или приобрел промежуточную локализацию. Эффекты генистеина, ресвератрола, куркумина, физетина усиливались в течение 24 ч после их добавления в среду культивирования клеток, а кверцетин, кумарин, EGCG, тимохинон и нарингенин влияли на локализацию гистона H1.5 быстрее, демонстрируя максимальные эффекты при инкубации с соединением в течение 1 или 6 ч.

Из исследованных соединений наиболее существенное перераспределение белка вариантов линкерных гистонов H1.2 и H1.4 между ядерными фракциями (нуклеоплазматической и хроматинсвязанной) вызывали эпигаллокатехина галлат, кемпферол и ресвератрол. Анализ данных для этих соединений в максимальных нетоксичных концентрациях показал, что для эпигаллокатехина галлата, ресвератрола, кемпферола количество белка H1.2 в хроматинсвязанной фракции клеток HeLa уменьшилось в среднем на 65, 55 и 51 % соответственно, а количество белка H1.4 — на 55, 42 и 53 % соответственно.

Заключение. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ряд исследуемых соединений вызывает значительное вытеснение различных вариантов линкерных гистонов, что может вносить существенный вклад в регуляцию структурного и функционального состояний различных областей хроматина и, как следствие, в регуляцию экспрессии ряда генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-15-01526).

Экспрессия NO-синтаз в перевиваемых и колоректальных опухолях животных и человека

В.П. Дерягина, Н.И. Рыжова, Л.А. Савлущинская,
И.С. Голубева, Д.А. Хоченков

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Оксид азота (NO), генерируемый индуцибельной и эндотелиальной NO-синтазами (iNOS и eNOS соответственно), участвует в патогенезе злокачественных опухолей, вызывая генотоксические эффекты, разнонаправленно действует на выживаемость опухолевых клеток, стимулирует ангиогенез, влияет на мобилизации стволовых клеток и др.

Цель исследования — сравнительный анализ экспрессии iNOS и eNOS в перевиваемых опухолях в зависимости от их метастатического потенциала у мышей, а также в опухолях толстой кишки разной степени дифференцировки у человека.

Материалы и методы. Были исследованы парафиновые микросрезы опухолей, полученные от мышей F1, BDF с перевитой метастазирующей карциномой легкого Льюиса (КЛ) и карциномой Эрлиха (КЭ),

а также умеренно и высокодифференцированные аденокарциномы толстой кишки человека (сигмовидная, прямая, ободочная кишка) и окружающей опухолевой очаг ткани. Экспрессию NO-синтаз определяли ИГХ-методом с использованием поликлональных кроличьих антител к ферментам (Santa Cruz Biotechnology, США).

Результаты. Экспрессия iNOS выявлялась в 29–50 % опухолевых клеток, преимущественно в цитоплазме, а также в эндотелии сосудов (до 20 %) на всех сроках роста КЭ и КЛ. Выраженность экспрессии iNOS варьировала от положительной до сильной, в зависимости от временных параметров роста КЭ и КЛ. Уровень экспрессии eNOS в опухолевых клетках КЛ был выше при сравнении с таковым, определенным в клетках КЭ в течение первых 2 нед роста опухолей. В этот период регистрировали положительную экспрессию eNOS в выстилке сосудов как КЭ, так и КЛ. Обращает на себя внимание отсутствие реакции на белки iNOS и eNOS в метастазах легких, что может свидетельствовать о селекционном отборе диссеминирующих опухолевых клеток с подавленной экспрессией этих белков. У 85 % больных в эпителиальных клетках и выстилке сосудов карцином толстой кишки обнаружена экспрессия iNOS и eNOS (от положительной до сильной). Следует отметить, что эпителиальные клетки и сосуды условно здоровых тканей, полученные от больных с крупными опухолями, также были положительно окрашены на наличие iNOS и eNOS.

Заключение. Выявлены особенности экспрессии iNOS и eNOS в перевиваемых опухолях с разной метастатической активностью, а также в аденокарциномах толстой кишки человека, что указывает на их участие в развитии злокачественного процесса.

Исследование роли микроРНК в механизмах токсического действия дихлордифенилтрихлорэтана

Т.С. Калинина, В.В. Конончук, Л.Ф. Гуляева

ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН»,
Новосибирск

В ходе канцерогенеза меняется профиль экспрессии микроРНК. Одной из причин нарушения экспрессии микроРНК может являться воздействие ксенобиотиков. В настоящее время накоплено мало информации о воздействии негенотоксических соединений, таких как хлорорганические пестициды, на экспрессию микроРНК. Среди хлорорганических пестицидов лидирующим по масштабам применения в прошлом является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Так как этот инсектицид обладает всеми свойствами стойкого органического загрязнителя, остатки

ДДТ и его метаболитов до сих пор повсеместно детектируются. Данное соединение является эндокринным разрушителем, что делает его потенциальным канцерогеном гормоночувствительных тканей.

Цель исследования — определение уровня микроРНК, в регуляции экспрессии которых может участвовать эстрогеновый рецептор (ER), в культурах клеток молочной железы человека MCF7, обработанных о,р'-ДДТ — изомером ДДТ, обладающим наиболее сильными эстрогенными свойствами.

Для подтверждения эстрогенных эффектов ДДТ методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени в клетках, обработанных ДДТ, был измерен уровень мРНК мишеней ER. Уровень мРНК генов *PgR* и *VEGFA* действительно увеличивался под действием о,р'-ДДТ как после инкубации в течение 24 ч, так и после инкубации с ксенобиотиком в течение 48 ч. Уровень мРНК гена *CCND1* увеличивался только спустя 48 ч. Далее для исследования были отобраны микроРНК, в промоторных областях которых содержатся сайты связывания ER, а также ряд хорошо изученных микроРНК. Относительный уровень данных микроРНК методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени был измерен в клетках, обработанных эстрадиолом. Был определен ряд микроРНК, уровень которых увеличивается под действием эстрадиола спустя 6, 24 или 48 ч инкубации с соединением: miR-190b, -184, -193b, -324, -127. Далее уровень экспрессии микроРНК был оценен в клетках, обработанных о,р'-ДДТ. Было выявлено увеличение в 1,3–1,6 раза экспрессии всех отобранных микроРНК под действием 10 мкМ о,р'-ДДТ.

Таким образом, нарушение экспрессии микроРНК может действительно происходить в результате изменения активности ядерного ER, на которую влияют в том числе ксенобиотики, в частности ДДТ.

Микроядра и выживание культивируемых опухолевых клеток человека

О.П. Кисурина-Евгеньева, О.И. Сутягина, Г.Е. Онищенко
Биологический факультет ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Спонтанно образованные микроядра (МЯ) являются характерной чертой опухолевых клеток. При этом наличие МЯ само по себе может индуцировать опухолевую трансформацию клетки, в том числе путем запуска хромотрипсиса. Действие ряда ХТ-препаратов основано на индукции образования микроядерных клеток, которые в дальнейшем гибнут путем апоптоза (p53+ опухоли). Однако в случае выживания опухолевой клетки с индуцированными микроядрами возможно дальнейшее озлокачествление процесса.

Цель исследования — оценка жизнеспособности культивируемых опухолевых клеток человека

со спонтанными и индуцированными МЯ и морфофункциональная характеристика МЯ.

Спонтанные МЯ исследовались в клетках аденокарциномы молочной железы (MCF7, p53+) и эпидермоидной карциномы (A431, p53—). Образование МЯ в клетках MCF7 вызывали воздействием паклитаксела (ПТ) (125 нМ, 48 ч). Выживаемость клеток оценивали на протяжении 7 сут после удаления агента. Использованы методы прижизненного наблюдения, цито- и иммунофлуоресцентной микроскопии (LamB1, γ H2Ax, p53, Ki-67, EdU), МТТ-тест, трансмиссионная электронная микроскопия. Морфометрический анализ произведен с помощью ПО Vision Bio (West Medica, Россия).

Доля клеток со спонтанными МЯ сходна в обеих культурах: $13,9 \pm 0,5$ % (MCF7) и $15,8 \pm 1,4$ % (A431). Среди МЯ выделены 2 группы: крупные ($S > 4$ мкм²) и мелкие ($S < 4$ мкм²). Клетки с МЯ сохраняют жизнеспособность в течение 24 ч (23 из 25 MCF7, 10 из 10 A431), пролиферативную ($89,8 \pm 1,2$ % (MCF7); $96,0 \pm 0,7$ % (A431)) и репликативную активность ($15,9 \pm 1,2$ % (MCF7), $35,6 \pm 1,1$ % (A431)). Репликация в основном ядре и МЯ в 90 % случаев протекает асинхронно. Спонтанные МЯ характеризуются наличием дефектов ламины, содержат поврежденную ДНК. В клетках MCF7 в $48,7 \pm 1,2$ % клеток с МЯ не происходит активации p53. В целом морфофункциональные дефекты более выражены в мелких МЯ и МЯ клеток A431 (p53—).

Воздействие ПТ в культуре MCF7 приводит к формированию клеток с множественными МЯ ($66,9 \pm 0,2$ %). При наличии ПТ и в течение 7 сут после удаления агента $67,2 \pm 5,8$ % клеток сохраняют жизнеспособность; возрастает доля γ H2Ax+-клеток (с $7,9 \pm 1,8$ до $24,7 \pm 0,7$ %) и p53+-клеток (с $5,8 \pm 0,3$ до $16,7 \pm 1,1$ %). Несмотря на снижение пролиферативной ($5,2 \pm 1,0$ %) и репликативной ($4,3 \pm 0,6$ %) активности, происходит увеличение числа полиплоидных клеток.

Для индуцированных МЯ показаны: дефекты ядерной ламины ($20,8 \pm 2,4$ %), разрывы оболочки МЯ (по данным трансмиссионной электронной микроскопии), аккумуляция поврежденной ДНК в мелких МЯ, способность к репликации ($3,8 \pm 0,4$ %), асинхронность репликации ($75,0 \pm 2,1$ %).

Таким образом, часть клеток, как со спонтанными, так и с индуцированными МЯ не подвергается гибели. МЯ характеризуются различными морфофункциональными нарушениями, которые могут приводить к увеличению генетической нестабильности клеток. После воздействия ПТ возникает пролиферативно-инертная популяция клеток, предположительно устойчивая к дальнейшим воздействиям фазоспецифичными агентами.

Визуализация меченых лимфоцитов при клеточной иммунотерапии у онкологических больных

Н.В. Михайловский^{1,2}, О.Н. Спиченкова¹, М.А. Сигов¹,
Г.А. Давыдов^{1,2}, Е.В. Абакушина^{1,2}

¹МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск;

²Обнинский институт атомной энергетики — филиал ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск

Введение. За последние десятилетия существенный прогресс в лечении злокачественных новообразований достигнут в области иммунотерапии опухолей. Особое место занимают подходы клеточной иммунотерапии, при которых используют активированные НК-клетки и Т-лимфоциты. Однако на сегодняшний день не изучались пути миграции активированных лимфоцитов человека при различных способах введения.

Цель исследования — разработка методики мечения активированных лимфоцитов и их дальнейшая визуализация *in vivo* с помощью однофотонной эмиссионной КТ/КТ.

Материалы и методы. Иммунотерапия активированными лимфоцитами проводилась пациентке с диагнозом РМЖ. Аутологичные лимфоциты после активации в течение 5 дней метили соединением ^{99m}Tc-теоксим. Оценивали качество мечения: активность меченой клеточной массы на 1 млн клеток составила 2,0 МБк, жизнеспособность — более 95 %. Для дифференциальной диагностики процессов распределения радиофармацевтического препарата (РФП) и меченых клеток исследование разбили на три этапа: 1) введение чистого РФП; 2) введение меченых неактивированных лимфоцитов; 3) введение меченых активированных лимфоцитов. На каждом этапе проводились планарная сцинтиграфия и исследование с помощью совмещения однофотонной эмиссионной КТ и КТ. Препарат вводился внутривенно паравerteбрально на уровне лопаток, перерыв между введениями составлял 7 дней.

Результаты. В случае с введением пациенту чистого РФП и меченых неактивированных лимфоцитов на сцинтиграммах наблюдали гипернакопление препарата лишь в местах введения, а также физиологическое накопление свободного РФП (почки, мочевого пузыря, желудок). При введении активированных лимфоцитов, меченых РФП и последующей визуализации обнаруживался специфический очаг накопления — подмышечный лимфатический узел, который визуализировался и в последующие сутки.

Заключение. Было показано, что активированные лимфоциты при внутривенном введении депонируются во вторичных органах иммунной системы — лимфатических узлах, которые являются местом их функционирования, тогда как собственные неактивированные лимфоциты не обладают такой способностью.

Транслокация фактора транскрипции NF-κB в культуре клеток глиомы крысы С6 в присутствии бактериального липосахарид

Г.М. Соболева

ОАО «Институт инженерной иммунологии», пос. Любучаны, Московская обл.

NF-κB — фактор транскрипции, обладающий способностью связываться с мотивом ДНК, присутствующим во многих генах, ассоциирующихся с активацией клеточной пролиферации. Изменения уровня экспрессии и/или внутриклеточной локализации NF-κB могут указывать на сдвиг митогенного потенциала клеток. Глиома/глиобластома крысы С6 — клеточная линия астроцитарного ряда, используемая для изучения *in vitro* механизмов опухолевой прогрессии. Бактериальный липополисахарид (ЛПС) — фактор, ассоциированный с клеточной стенкой грамотрицательных бактерий. В экспериментах с культурами эукариотических клеток *in vitro* ЛПС используется для моделирования оксидативного стресса и метаболических расстройств, вызванных бактериальными инфекциями. В данной работе показано, что при наличии ЛПС внутриклеточная локализация NF-κB и выживаемость клеток С6 изменяются.

Культура клеток С6, полученная из Российской коллекции клеточных культур, выращивалась стандартно на среде DMEM (ПанЭко, Россия) в присутствии 10 % фетальной сыворотки телят. ЛПС, флуоресцентный ядерный краситель DAPI, тест для определения цитотоксичности на основе реактива МТТ были закуплены в Sigma Aldrich (США). Первичные антитела NF-κB p65 (A): sc 109 были получены в Santa Cruz Biotechnology, Inc. (США). Вторичные антитела goat anti-rabbit Alexa fluor 594 A11012 были получены в Invitrogen (США). Флуоресцентная микроскопия проводилась на микроскопе Zeiss ImagerD1 (Германия). Микрофотографии были получены с помощью камеры CoolSNAP (США). Файлы были обработаны с использованием программы ImageJ (NIH, США). Определение цитотоксичности ЛПС для клеток С6 проводилось с использованием прибора Wallac 1420 Multilabel Counter (Victor-2) (Финляндия).

В работе показано, что при отсутствии ЛПС фактор транскрипции NF-κB в клетках С6 локализован преимущественно в ядре, что может указывать на повышенный митогенный потенциал этих клеток. При наличии 10 мкг/мл ЛПС в среде культивирования значительная часть NF-κB перемещается из ядра в цитоплазму. Анализ цитотоксичности показывает, что при наличии ЛПС количество жизнеспособных клеток С6 снижено по сравнению с контролем примерно на 20 %. Можно предположить, что ЛПС

в концентрации 10 мкг/мл снижает пролиферативную активность клеток С6. Требуется дальнейшее исследование, чтобы уточнить природу этого явления и возможность его использования для изучения механизмов канцерогенеза и повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Нарушение программы воспаления, клеточного цикла и сборки ресничек как основа прогрессирования реактивных изменений эпителия бронхов в дисплазию

А.А. Щеголева^{1,2}, Е.В. Денисов^{1,2}, Т.С. Геращенко^{1,2},
Н.А. Скрябин³, А.А. Слепцов³, О.В. Панкова¹,
В.М. Перельмутер¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

³НИИ медицинской генетики ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Предопухолевый процесс при плоскоклеточном раке легкого протекает через морфологические изменения бронхиального эпителия: базальноклеточная гиперплазия (БКГ), плоскоклеточная метаплазия (ПМ) и дисплазия. Такие изменения могут встречаться как изолированно (изолированная БКГ (иБКГ)), так и в различных сочетаниях друг с другом: БКГ, сочетающаяся с ПМ (пмБКГ), ПМ, сочетающаяся с БКГ (бкгПМ) или дисплазией (дПМ), тем самым, вероятно, отражая различные этапы предопухолевого процесса. Однако причины и механизмы прогрессирования предопухолевых изменений эпителия бронхов остаются не до конца понятными.

Цель исследования — изучение экспрессионного профиля разных вариантов БКГ и ПМ, а также дисплазии и выявление механизмов, лежащих в основе различных сценариев предопухолевого процесса в эпителии бронхов.

Материалы и методы. Предопухолевые изменения получали из операционного материала ткани легкого больных НМРЛ с помощью лазерной микродиссекции

($n = 15$) и подвергали микроматричному экспрессионному анализу с использованием SurePrint G3 Human GE v2, $8 \times 60K$ (Agilent, США). Формалинфиксированные образцы ($n = 9$) ткани легкого с фокусами различных вариантов БКГ и ПМ, а также дисплазии использовали для валидации экспрессии генов, отобранных в ходе микроматричного экспрессионного анализа.

Результаты. Различные варианты БКГ и ПМ отличались как от нормального эпителия, так и друг от друга по экспрессионному профилю: иБКГ и пмБКГ были более схожи друг с другом, чем с ПМ, бкгПМ была ближе к вариантам БКГ, чем к дПМ.

Функциональное аннотирование генов, гипер- и гипоекспрессирующихся в каждом варианте БКГ и ПМ, показало выраженность различных биологических процессов; иБКГ отличалась от пмБКГ гипоекспрессией генов, связанных с регуляцией воспаления. В отличие от бкгПМ дПМ характеризовалась гипоекспрессией генов, участвующих в процессе сборки ресничек и аксонемы, и гиперэкспрессией генов, связанных с клеточным циклом. В экспрессионном плане дПМ была более схожей с дисплазией, чем с бкгПМ.

На основании данных микроматричного экспрессионного анализа выбрано несколько генов, дифференциально экспрессирующихся между вариантами БКГ и ПМ, и валидирована их экспрессия с помощью ИГХ-окрашивания. Экспрессия белков CCDC114, MAP7D2 и LIFR снижалась от нормального эпителия к дисплазии. При этом потеря экспрессии CCDC114 и MAP7D2 наблюдалась в дПМ по сравнению с бкгПМ и, таким образом, может служить индикатором прогрессирования метаплазии в дисплазию. Экспрессия белка LIFR была диффузной в иБКГ и локализовалась в ресничках при пмБКГ. В целом изменение локализации экспрессии LIFR может использоваться как маркер прогрессирования гиперплазии до метаплазии.

Заключение. Проведенное исследование указывает на наличие 2 экспрессионно обособленных вариантов БКГ и ПМ и демонстрирует основные механизмы, вовлеченные в прогрессирование предопухолевого процесса в респираторном эпителии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-29-06002).

Тезисы

Роль микроРНК hsa-miR-122-5p, hsa-miR-107 и hsa-miR-330-3p в регуляции экспрессии HIF1-альфа при глиобластоме

И.А. Аллилуев^{1,2}, А.А. Пушкин¹, Э.Е. Росторгуев¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

²ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону

Введение. Концентрация кислорода в опухоли подвержена значительным изменениям, и даже в хорошо оксигенированной опухоли существуют гипоксические области. Гипоксия стимулирует метастазирование и связана с негативным прогнозом развития заболевания. Основным эффектором гипоксического ответа является индуцируемый гипоксией фактор транскрипции 1-альфа (HIF1-альфа). Глиобластомы, как и другие солидные опухоли, имеют обширные области гипоксии. Для глиоматоза HIF1-альфа является мощным регулятором ангиогенеза и клеточной инвазии путем активации генов-мишеней, критических для онкогенеза. Активация HIF1-альфа строго регулируется с помощью молекулярных путей, которые могут стать мишенями в терапии онкологических заболеваний. Одним из возможных реализуемых вариантов контроля может быть изменение экспрессии микроРНК, которые являются важными посттранскрипционными регуляторами.

Цель исследования — изучить влияние микроРНК hsa-miR-122-5p, hsa-miR-107 и hsa-miR-330-3p на экспрессию HIF1-альфа при мультиформной глиобластоме.

Материалы и методы. В исследовании использовали выборку из 30 парных (опухоль/норма) образцов глиобластом. Фрагменты ткани гомогенизировали в TRIzol (Thermo Fisher, США) с помощью MagNA Lyser (Roshe, Швейцария). Нуклеиновые кислоты выделяли согласно инструкции производителя. Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV Reverta (Синтол, Россия). Оценку уровня экспрессии микроРНК и HIF1-альфа выполняли с применением ПЦР в реальном времени на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Анализ данных количественной ПЦР осуществляли с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Статистический анализ результатов выполняли с помощью Statistica 10 (StatSoft Inc., США).

Результаты. В ходе предварительно проведенного биоинформационного анализа были отобраны микроРНК (hsa-miR-122-5p, hsa-miR-107 и hsa-miR-330-3p), способные осуществлять регуляцию экспрессии HIF1-альфа. Для оценки влияния микроРНК на активность

HIF1-альфа был измерен уровень их экспрессии в образцах опухолевой и физиологически неизменной ткани. Уровень экспрессии HIF1-альфа в опухоли был в 2 раза выше по отношению к таковым в условно нормальной ткани. При этом показатель $2^{-\Delta\Delta Ct}$ для hsa-miR-122-5p, hsa-miR-107 и hsa-miR-330-3p составил 0,6, 0,51 и 0,1 соответственно. Выявлена корреляция между уровнем экспрессии исследуемых микроРНК и HIF1-альфа (коэффициент корреляции Спирмена $-0,45$ для hsa-miR-122-5p, $-0,46$ — для hsa-miR-107 и $-0,404$ — для hsa-miR-330-3p при $p < 0,05$).

Заключение. Установлена отрицательная корреляционная зависимость экспрессии микроРНК hsa-miR-122-5p, hsa-miR-107 и hsa-miR-330-3p и HIF1-альфа в глиобластомах, что может найти применение при выборе потенциальных мишеней для таргетной терапии и выборе маркеров для прогнозирования течения онкологического заболевания.

Изменение уровня сывороточных воспалительных маркеров при раке шейки матки разной степени дифференцировки

Е.В. Каюкова

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», Чита

Введение. Известно, что персистирующее локальное воспаление является неотъемлемым этапом развития РШМ, потенцирующим канцерогенез.

Цель исследования — изучить уровень некоторых гематологических воспалительных маркеров у больных РШМ в зависимости от степени дифференцировки (G) первичной опухоли.

Материалы и методы. Материалом для исследования служила сыворотка крови пациенток с инвазивным РШМ I–IV стадий, из них 20 больных — с G₁, 6 — с G₂ и 10 — с G₃ РШМ. Средний возраст больных составил $39,0 \pm 9,8$ года. Образцы контрольной группы были взяты у 15 гинекологически здоровых женщин-добровольцев, ознакомленных с дизайном исследования и давших информированное согласие на участие в нем. Метод исследования — проточная цитофлуориметрия с использованием набора реагентов, входящих в состав панели Human Vascular Inflammation Panel 1.

Результаты. Для фенотипа РШМ с дифференцировкой G₃ характерны системные воспалительные изменения в крови: снижение остеопонтина в 1,75 раза ($p < 0,05$) на фоне увеличения уровня SAA в 4,7 раза ($p < 0,05$).

В качестве критерия дифференциальной диагностики между РШМ G_1 - и G_3 -дифференцировки могут быть использованы величины OPN и SAA в сыворотке крови. Для опухолей G_3 -градации характерно снижение уровня OPN в 1,75 раза ($p < 0,05$) на фоне повышения величины SAA в 1,8 раза ($p < 0,05$).

Заключение. Выявленные изменения сывороточных уровней некоторых воспалительных маркеров у больных РШМ разной степени дифференцировки свидетельствуют о напряженности воспалительных изменений на системном уровне, что подлежит дальнейшему изучению для возможности их использования в качестве прогностических маркеров, предикторов опухолевой резистентности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых (грант № МК-6143.2018.7).

Роль рецепторов ангиотензина II 2-го типа в злокачественной трансформации предстательной железы

М.И. Коган^{1,2}, М.Б. Чибичян², Е.А. Черногубова^{1,2},
И.А. Павленко³, А.В. Аветян²

¹ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН», Ростов-на-Дону;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

³ГБУ Ростовской области «Патологоанатомическое бюро», Ростов-на-Дону

Введение. Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), ангиотензин II (Анг II), рецепторы Анг II 1-го и 2-го типов (AT1-R и AT2-R) представляют собой классическую ось регуляции ренин-ангиотензиновой системы (РАС). Наиболее изученными компонентами РАС, участвующими в процессе пролиферации клеток, являются Анг II и его рецепторы. Анг II-AT1-R-зависимый сигналинг в опухолевых и окружающих опухоль клетках направлен на ускорение процесса пролиферации и перехода к злокачественности, а также вовлечен в модулирование ангиогенеза, который рассматривается в качестве одного из основных механизмов противоопухолевого влияния РАС. AT2-R являются негативными регуляторами сигнальных путей, зависимых от AT1-R. В ткани предстательной железы экспрессированы все основные компоненты РАС.

Цель исследования — анализ роли AT2-R в процессах онкогенной трансформации при РПЖ.

Материалы и методы. Исследован материал полифокальных пункционных биопсий 10 мужчин с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ), 10 — с простатической интраэпителиальной

неоплазией (ПИН), 10 — с РПЖ (сумма баллов по шкале Глисона ≥ 7). В ткани предстательной железы оценивали экспрессию AT2-R с использованием первичных поликлональных антител AT2-R и системы визуализации EnVision FLEX (Dako, Дания) по стандартной методике.

Результаты. Результаты исследования показали, что в строме экспрессия AT2-R при разных типах пролиферации предстательной железы была одинаковой. В ядрах эпителиальных клеток уровень экспрессии AT2-R снижался в ряду ДГПЖ>ПИН>РПЖ. Так, при ДГПЖ окрашивание максимальное, при ПИН экспрессия слабая в сравнении со стромой, при РПЖ в ядрах клеток отмечается снижение или отсутствие окрашивания. Различия статистически значимые ($p < 0,01$). Необходимо отметить, что, по данным других исследователей, существенных различий в количестве и распределении AT1-R при ДГПЖ, ПИН и РПЖ не обнаружено. И если возможные механизмы проонкогенного влияния РАС связаны со стимуляцией ангиогенеза, который опосредуется преимущественно через Анг II-AT1-R-зависимый сигналинг, то в противоположность этому селективная стимуляция AT2-R вызывает торможение ангиогенеза (Carbajo-Lozoya J. и соавт., 2012).

Заключение. Таким образом, снижение экспрессии AT2-R в ядрах эпителиальных клеток предстательной железы при РПЖ опосредует активацию неоваскуляризации и торможение антипролиферативных процессов. Полученные данные подтверждают концепцию вовлечения РАС в процессы инициации и развития РПЖ.

Роль естественного освещения северо-запада России в развитии новообразований

Ю.П. Матвеева, О.В. Жукова, В.Д. Юнаш,
И.А. Виноградова

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск

Введение. На сегодняшний день существует множество факторов, модифицирующих канцерогенез и рост опухолей. Одним из экологических факторов, влияющих на онкогенез, является световой режим. Проведено большое количество экспериментальных и эпидемиологических исследований по влиянию различных режимов освещения на возрастзависимые заболевания, где показано, что нарушение циркадианной системы приводит к прогрессированию опухолевого роста. Для северных, северо-западных и северо-восточных регионов России фактором риска является контрастная динамика продолжительности светового дня в течение годового цикла.

Цель исследования — изучить роль естественного освещения северо-запада России (Республика Карелия) в развитии новообразований.

Материалы и методы. Работа проведена на крысах ($n = 261$) обоих полов собственной разводки. Первая (дата рождения: конец апреля — начало мая; NL-Spring; 46 самцов и 40 самок) и 2-я группы животных (дата рождения: конец октября — начало ноября; NL-Autumn; 48 самцов и 52 самки) находились в условиях естественного освещения северо-запада России, 3-я группа являлась контрольной (стандартный режим освещения; LD; 46 самцов и 42 самки). Работа выполнена с соблюдением принципов гуманного отношения к животным до их естественной гибели.

Результаты. Контрастная фотодинамика продолжительности светового дня в течение годового цикла приводила к ускоренному росту как доброкачественных, так и злокачественных новообразований по сравнению со стандартным режимом освещения. Число крыс с опухолями увеличивалось в следующей последовательности: у животных с осенней (58 % самок и 44,4 % самцов) и весенней датой рождения (80,5 % самок и 50 % самцов) диагностировали такие опухоли, как рак матки и РЯ, лимфома, гепатоцеллюлярный рак, саркома, фибросаркома и др., тогда как в контрольной группе количество особей с онкопатологией было наименьшим (45,2 и 28,2 % соответственно). Число опухолей на 1 крысу в режиме NL-Spring было максимальным: самки — 1,07 и самцы — 0,54, в группе NL-Autumn — 0,7 и 0,48 соответственно, в стандартном режиме освещения — минимальным: 0,56 и 0,37 соответственно.

Заключение. Сезонная асимметрия фотопериодизма способствует развитию и увеличению частоты возникновения доброкачественных и злокачественных новообразований независимо от сезона рождения.

Изучение гендерных особенностей, связанных с генетической предрасположенностью к почечно-клеточному раку

А.Ф. Мукерия, О.В. Шаньгина, В.А. Драудин-Крыленко, В.А. Юрченко, Д.Г. Заридзе

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Имеющиеся данные о молекулярной архитектонике ПКР, а также стабильное преобладание мужчин над женщинами в соотношении 2:1 в структуре популяционной заболеваемости позволяют предположить наличие гендерных различий генетической предрасположенности к этой форме опухоли. Нами впервые был проведен гендерно-специфичный анализ генетических особенностей ПКР среди мужчин (3227 — опытная группа и 4916 — контрольная группа) и женщин (1992 и 3095 соответственно). В анализ включили данные участников 2 крупных европейских полногеномных исследований, а основные полученные результаты

были впоследствии воспроизведены в когортах мужчин (2261 — опытная группа и 5852 — контрольная группа) и женщин (1399 и 1575 соответственно) из 2 независимых исследований, также проведенных в Европе. Мы подтвердили наличие гендерно-специфических ассоциаций при ПКР для 2 ранее выявленных локусов на хромосомах 14q24.2 (DPF3) и 2p21 (EPAS1). Кроме этого, были идентифицированы еще 2 новых локуса, расположенные на хромосомах 6q24.3 и 12q23.3, предположительно связанные с мужским полом и снижением риска развития ПКР по сравнению с женщинами (ОР 0,83, 95 % ДИ 0,78–0,89, $p = 1,71 \times 10^{-8}$ и ОР 0,98, 95 % ДИ 0,90–1,07, $p = 0,68$) и (ОР 0,75, 95 % ДИ 0,68–0,83, $p = 1,59 \times 10^{-8}$ и ОР 0,93, 95 % ДИ 0,82–1,06, $p = 0,21$) соответственно. Полученные нами результаты говорят о необходимости более масштабных генетических исследований для углубленного изучения связи гендерных особенностей генетической предрасположенности к ПКР и другим опухолям.

Результаты анализа генетического взаимодействия онкогенов в молекулярно-эпидемиологическом исследовании по изучению риска развития рака легкого

А.Ф. Мукерия¹, О.В. Шаньгина¹, Н.Д. Плытник¹, М.В. Гаас², Д.Г. Заридзе¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая онкологическая больница № 1 ДЗМ», Москва

Развитие рака происходит в результате накопления повреждений в генах, влияющих на онкогенез. При этом пусковым механизмом онкогенеза является взаимодействие вовлеченных в этот процесс генов, а не независимое влияние отдельного гена. С целью изучения эпистатического взаимодействия онкогенов, вовлеченных в процесс развития рака легкого, нами был проведен парный генетический анализ более 35 000 SNP 2027 онкогенов. В анализе использовались данные 24 000 пациентов с диагнозом рака легкого и 20 400 здоровых контрольных лиц из 3 независимых полногеномных исследований, проведенных в Европе. Были впервые идентифицированы генетические взаимодействия между SNP генов *RGL1:RAD51B* (ОР 0,44, $p = 3,27 \times 10^{-11}$ для рака легкого в целом и ОР 0,41, $p = 9,71 \times 10^{-11}$ для НМРЛ), генов *SYNE1:RNF43* (ОР 0,73, $p = 1,01 \times 10^{-12}$ для аденокарциномы) и *FHIT:TSPAN8* (ОР 1,82, $p = 7,62 \times 10^{-11}$ для плоскоклеточного рака легкого), причем все результаты отличаются высокой достоверностью. Дальнейший анализ экспрессии генов в опухолевой ткани легкого подтвердил функциональную роль выявленного эпистатического взаимодействия в канцерогенезе рака

легкого. Анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA) позволил определить потенциальные пути и особенности организации генных сетей для более глубокого понимания молекулярных механизмов развития как рака легкого вообще, так и его гистологических подтипов. Полученные нами результаты свидетельствуют о важной роли в канцерогенезе рака легкого генетического взаимодействия онкогенов, а эпистатический анализ с функциональным аннотированием может быть использован для выявления новых генов предрасположенности к раку легкого, взаимодействующих с другими генами-модификаторами.

Локальный и системный статусы ренин-ангиотензин-альдостероновой системы сопряжены у гипертензивных больных раком почки

Р.А. Осокин¹, Е.Ф. Комарова², А.Ю. Максимов³,
И.А. Абоян¹, Е.Ю. Комарова⁴

¹МБУЗ КДЦ «Здоровье», Ростов-на-Дону;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

³ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

⁴ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Цель исследования — оценка взаимосвязи опухолевой и плазменной активности компонентов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) у больных раком почки (РП) на фоне артериальной гипертензии.

Материалы и методы. У 128 больных локализованным РП T1N0M0 и с артериальной гипертензией I–II степени (без лечения, основная группа — ОГ) проведено исследование уровня тканевой (биоптаты опухоли, перитуморальной и визуально интактной тканей) и плазменной активности пептидов ангиотензинов 1, 2 и 1–7 (АТ1, АТ2 и АТ (1–7)) и ангиотензинпревращающих ферментов (АПФ и АПФ2) методом ИФА. Группу сравнения (ГС, $n = 54$) составили больные РП без артериальной гипертензии. Нормативные значения исследованных показателей периферической крови выявляли у практически здоровых лиц аналогичного возраста (здоровые доноры, $n = 35$). Корреляционный анализ проведен с оценкой статистической значимости коэффициента корреляции.

Результаты. При сравнительном анализе корреляционных связей уровня пептидов в ткани опухоли и крови обнаружено, что повышенный уровень в опухоли и окружающих тканях у пациентов ОГ имел прямую и тесную связь с плазменным уровнем. Так, коэффициенты парной корреляции для АТ1, АТ2

и АТ(1–7) составили соответственно 0,85 ($p < 0,05$), 0,79 ($p < 0,05$) и 0,81 ($p < 0,05$). Для ферментов РААС коэффициенты корреляции характеризовали прямую связь меньшей по силе выраженности и составили для АПФ 0,68 ($p < 0,01$) и для АПФ2 — 0,65 ($p < 0,05$). Интересно отметить, что для перитуморальной ткани также были найдены выраженные корреляции по содержанию локальных и плазменных компонентов системы. Наибольшую тесноту связи наблюдали для АТ1, АПФ и АТ2 ($r = 0,89$, $p < 0,01$; $r = 0,95$, $p < 0,01$; $r = 0,96$, $p < 0,001$ соответственно). У пациентов ГС была также выявлена тесная взаимосвязь большинства компонентов РААС. Анализ коэффициентов парной корреляции составил для АТ1 ($r = 0,81$, $p < 0,01$), АТ2 ($r = 0,79$, $p < 0,01$) и АПФ ($r = 0,59$, $p < 0,01$). Однако для АТ(1–7) и АПФ2 корреляция отсутствовала.

Заключение. По результатам корреляционного анализа можно сделать вывод, что по показателям системной активности пептидов и ферментов РААС можно судить о состоянии ее внутритканевых компонентов. Местная РААС, по-видимому, представляет собой расширение системной: локально-образуемые компоненты имеют специфические эффекты на артериальное давление, которые отличаются от системных.

Влияние квадруплексных структур ДНК на функционирование системы репарации «мисматчей»

А.В. Павлова¹, М.В. Монахова², Л.А. Абросимова¹,
Н.Г. Долиная¹, М.Г. Якубовская³, Т.С. Орецкая²,
Е.А. Кубарева²

¹Химический факультет ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Неканонические конформации геномной ДНК, такие как G-квадруплексные структуры (G4), являются источником генетической нестабильности. Они индуцируют двуцепочечные разрывы ДНК, которые непосредственно связаны с хромосомными перестройками, характерными для большинства онкологических заболеваний. Возникновение мутаций в промоторах генов, способствующих трансформации клеток в опухолевые, может быть связано с нарушением эффективности действия систем репарации ДНК в непосредственной близости от неканонических структур ДНК.

Цель исследования — изучение механизма взаимодействия (взаимовлияния) G4-ДНК с белками высококонсервативной системы репарации «мисматчей» (MMR), исправляющей некомплементарные пары нуклеотидов (результат ошибок репликации) и инсерционно-делеционные петли.

В работе использовались рекомбинантные белки MutS, MutL и MutH, инициирующие начальные этапы репарации MMR в *E. coli*, а именно узнавание структурного повреждения и внесение одноцепочечного разрыва в ДНК. В качестве субстрата применяли специально сконструированную 76/95-звенную линейную ДНК, содержащую G/T-пару и участок узнавания эндонуклеазы MutH, в которой внутримолекулярный G4 параллельной топологии закреплен внутри двуспиральной структуры. Гидролиз меченного TAMRA субстрата (25 нМ) ферментом MutH (250 нМ) проводили в 20 мМ буфере HEPES/КОН (pH 8,0), 5 мМ $MgCl_2$, 120 мМ KCl в течение 1 ч при 37 °C. Продукты реакции анализировали методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Флуоресцентные зоны, соответствующие ДНК, детектировали на приборе Typhoon 9410 (GE Healthcare, США).

MutH с одинаково низкой эффективностью расщепляет G4-ДНК с «мисматчем» и без него (6 ± 2 и 7 ± 1 % соответственно) на расстоянии 17 пар нуклеотидов (п.н.) от квадруплекса, а также контрольные ДНК: канонический или G/T-содержащий дуплексы и ДНК, в которой мотив G4 заменен на повторяющуюся TG-последовательность той же длины (TG)₈. Наличие MutS в реакционной смеси вызывает двукратное увеличение активности MutH в случае всех субстратов. В то же время наличие MutL по-разному влияет на активность MutH в зависимости от субстрата: наличие в структуре ДНК с «мисматчем» дополнительно квадруплекса или неструктурированной петли в значительной степени стимулирует гидролиз (29 ± 2 и 27 ± 4 %) по сравнению с контрольными ДНК (для канонического дуплекса — $15,2 \pm 0,6$ %). Эффективность расщепления G4-содержащей ДНК без «мисматча» комплексом белков MutS—MutL—MutH сравнима с каноническим субстратом (30 ± 7 %), в то время как гидролиз ДНК с G/T-парой, но без квадруплекса достигает 56 ± 1 %. Наличие петли в ДНК с «мисматчем» не влияет на инициацию MMR. Вместе с тем эффективность гидролиза ДНК, содержащей и G4, и G/T-пару, максимальна и составляет 67 ± 3 %.

Таким образом, формирующий параллельный квадруплекс мотив (GGGT)₄ не репарируется системой MMR. В то же время белки MutL и MutS, связанные с G4, находящемся на расстоянии более 17 п.н. от «мисматча», не препятствуют инициации MMR по стандартному механизму.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-34-00768).

Оценка сопряжения опухолевого ангиогенеза и микрососудистой плотности при базально-клеточном раке кожи

Ю.В. Пржедецкий¹, В.В. Позднякова¹, Е.Ф. Комарова²,
О.В. Хохлова¹, В.Ю. Пржедецкая¹, Н.А. Захарова¹,
Е.Ю. Комарова³

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

³ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Цель исследования — изучить взаимосвязь экспрессии факторов неоангиогенеза и плотности микрососудов в опухолевой ткани базально-клеточного рака кожи в зависимости от клинической формы.

Материалы и методы. В тканях опухоли 73 больных (от 44 до 87 лет) базально-клеточным раком кожи T1–T3N0M0 нодулярной ($n = 21$), инфильтративной ($n = 17$) и поверхностной клинико-морфологических форм ($n = 15$) определяли концентрацию васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF), фактора роста фибробластов (FGF) методом ИФА. В качестве контроля использовали здоровую кожу, полученную при оперативном лечении пациентов без онкопатологии ($n = 20$). Опухолевую экспрессию CD34 и CD31 оценивали количественно при ИГХ-исследовании с применением МА по стандартным методикам. Корреляционный анализ по Спирмену проведен с оценкой статистической значимости коэффициента корреляции.

Результаты. Анализ корреляции уровня VEGF и экспрессии CD34, CD31 выявил прямые связи различной тесноты для морфотипов базально-клеточного рака кожи. Коэффициент корреляции VEGF и экспрессии CD34 составил для нодулярной формы 0,58 ($p < 0,01$), для инфильтративной — 0,97 ($p < 0,001$), для поверхностной — 0,71 ($p < 0,01$). Коэффициент корреляции VEGF и экспрессии CD31 составил для нодулярной формы 0,51 ($p < 0,01$), для инфильтративной — 0,95 ($p < 0,01$), для поверхностной — 0,70 ($p < 0,01$). Были показаны корреляционные связи для пары FGF и CD34: коэффициент корреляции для нодулярной формы составил 0,67 ($p < 0,01$), для инфильтративной — 0,99 ($p < 0,001$), для поверхностной — 0,69 ($p < 0,01$), для пары FGF и CD31: для нодулярной формы — 0,65 ($p < 0,01$), для инфильтративной — 0,99 ($p < 0,01$), для поверхностной — 0,73 ($p < 0,01$). Оценка корреляции между опухолевой экспрессией VEGF и FGF выявила наибольшую тесноту связи для инфильтративной формы базально-клеточного рака кожи ($r = 0,98$, $p < 0,001$), связи средней степени для поверхностной формы ($r = 0,58$, $p < 0,05$), а для нодулярной формы не найдены корреляции.

Заключение. Показаны положительные корреляционные связи факторов опухолевого ангиогенеза и показателей микрососудистой плотности, имеющие наибольшую тесноту при инфильтративном варианте, а наименьшую — при нодулярной форме, что свидетельствует о различиях ангиогенеза в зависимости от клиничко-морфологической формы и, возможно, является причиной более агрессивного биологического поведения инфильтративного базально-клеточного рака кожи.

Сравнительный анализ продукции провоспалительных хемокинов CCL2/CCL3 2D- и 3D-культурами клеток меланомы кожи

Е.А. Просекина, А.Б. Данилова, А.И. Кузнецова,
Т.Л. Нехаева, Н.А. Авдонкина, И.А. Балдуева

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава
России, Санкт-Петербург

Введение. Клетки меланомы кожи (МК) способны продуцировать широкий спектр молекул, в том числе хемокины и их рецепторы, которые играют важную роль в процессах пролиферации, выживания и адгезии, а также ангиогенеза (Steeg P.S.). CCL2 способствует васкуляризации опухоли, созданию иммуносупрессивного микроокружения, метастазированию (Kulbe H. и соавт.). CCL2/CCL3 индуцируют продукцию моноцитами матриксной металлопротеиназы 9 (MMP9), облегчающей экстравазацию малигнизированных клеток (Bonaparte L. и соавт.). Многоклеточные опухолевые сфероиды, которые по своим характеристикам приближены к опухоли *in vivo*, в отличие от монослойных культур позволяют исследовать молекулярные параметры в трехмерной опухолевой микросреде, которая соответствует бессосудистым локусам солидных опухолей и их микрометастазами (Stamenkovic I., Hirschhaeuser F. и соавт.).

Цель исследования — провести сравнительную оценку уровня продукции хемокинов CCL2 и CCL3 клеточными линиями МК в монослойных культурах и сфероидах.

Материалы и методы. В работе были использованы три клеточные линии МК, выделенные из образцов операционного материала больных, получавших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Клетки высевали в культуральные флаконы на полной питательной среде DMEM/F12, содержащей 20 % эмбриональную сыворотку коров, и культивировали до достижения монослоя, после чего отбирали супернатанты. Сфероиды получали методом висячей капли, далее через 7 сут отбирали культуральную среду для последующего мультиплексного анализа с помощью прибора Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, США). Для обработки данных использовали программное обеспечение Bio-Plex

Manager™ v. 6.1 Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Microsoft Excel 2016.

Результаты. Концентрация CCL2 и CCL3 в супернатантах клеток МК зависела от типа культуры и увеличивалась после культивирования в 3D-формате во всех случаях. Содержание CCL2 в культуральной среде сфероидов было выше, чем при росте в монослое в 4,4 ($919,23 \pm 11,68$ пг/мл vs $208,99 \pm 8,10$ пг/мл; $M \pm m$), в 1,76 ($2560,87 \pm 99,54$ пг/мл vs $1453,34 \pm 75,71$ пг/мл), 2,52 раза ($5816,35 \pm 545,29$ пг/мл vs $2306,49 \pm 113,78$ пг/мл). Во всех культурах продукция CCL3 увеличилась в 1,75–3,56 раза при культивировании в сфероидах по сравнению с традиционным монослоем: $3,29 \pm 0,10$ пг/мл vs $1,88 \pm 0,09$ пг/мл, $3,39 \pm 0,04$ пг/мл vs $1,29 \pm 0,04$ пг/мл, $3,88 \pm 0,10$ пг/мл vs $1,09 \pm 0,02$ пг/мл соответственно.

Заключение. Монослойные культуры клеток МК, где отсутствуют существенные клеточные взаимодействия, продуцируют провоспалительные хемокины в более низких концентрациях по сравнению с клетками, формирующими сфероиды. Полученные данные указывают на возможность использования опухолевых 3D-моделей *in vitro* для анализа профиля продуцируемых хемокинов, который может иметь важное прогностическое значение для определения течения заболевания и тактики лечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (проект № 18-29-09014/18 от 04.09.2018).

Создание *in vivo* модели интраокулярной ретинобластомы

С.В. Саакян¹, А.Ю. Цыганков¹, И.П. Хорошилова-Маслова¹, Н.И. Моисеева², А.Ф. Карамышева²,
М.Г. Жильцова¹, А.Г. Амирян¹, С.С. Тадевосян¹

¹ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца»
Минздрава России, Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. В мире в ряде лабораторий и клиник ведутся исследования, посвященные возможности создания животной модели внутриглазных опухолей. Подобная активность обусловлена необходимостью как поиска новых химиопрепаратов, эффективных в отношении клеток ретинобластомы, так и разработки новых подходов к локальному лечению опухоли.

Цель исследования — создание мышинной *in vivo* модели внутриглазной ретинобластомы.

Материалы и методы. Всего обследованы и прооперированы 4 половозрелые иммунодефицитные мыши породы BALB/c nude обоих полов. Взвесь первичной культуры ретинобластомы вводили в каждый из 8 глаз исследуемых животных. Суспензию вводили под контролем операционного микроскопа с применением инсулиновых шприцев диаметром 29G транссклерально в субретинальное пространство в объеме

0,3 мл из расчета 10 тыс. клеток в 25 мкл физиологического раствора. Клеточная культура Rb10, полученная от больного ретинобластомой, на момент опытов прошла 12 пассажей.

Результаты. После введения суспензии животных наблюдали в течение 9 нед, после чего проводили клиническое (офтальмоскопия) и инструментальное (эххография) исследования с визуализацией опухолевых масс на глазном дне. При осмотре на 2 глазах из 8 выявлена белесоватая проминирующая ткань в центральной зоне глазного дна. По данным эххографии в области заднего полюса глаза определено проминирующее образование небольших размеров, имеющее неровную поверхность, гетерогенную структуру, включая участки уплотнения в ткани. После энуклеации выполняли морфологическое исследование. По результатам последнего на 2 глазах выявлены опухолевые комплексы, аналогичные таковым у больных ретинобластомой. Опухолевые комплексы состояли из клеток округлой формы с округлым, слегка овальным ядром и гомогенно расположенным хроматином, узким ободком цитоплазмы с небольшими выростами. Данный опухолевой комплекс располагался между хориоидеей и склерой. На периферии комплекса определяли полнокровный сосуд. При большем увеличении отмечена тенденция к концентрическому расположению клеток с просветом в центре, т.е. к формированию розеток Флекснера—Винтерштейнера. В роговице всех мышей отмечалось прорастание сосудов и воспалительных инфильтратов в строме.

Закключение. Предлагаемая модель может быть использована как для проведения дальнейших исследований, так и для испытания новых химиопрепаратов и схем лечения ретинобластомы.

Особенности молекулярных маркеров в опухоли ободочной и прямой кишки

Л.В. Спирина^{1,2}, А.В. Августининович¹, С.Г. Афанасьев¹,
А.Ю. Добродеев¹, А.А. Димча¹, А.С. Тарасова¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Введение. Опухоли ободочной, сигмовидной и прямой кишки имеют различное клиническое течение, что связано с их молекулярными особенностями.

Цель исследования — изучение экспрессии транскрипционных факторов NF-κB p65 и NF-κB p50, HIF-1α, HIF-2α, ростовых факторов VEGF, CAIX и VEGFR2, компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути и экспрессии PD, PD-L1, PD-L2 у больных раком желудка в зависимости от эффекта комбинированного лечения.

Материалы и методы. В исследование были включены 20 больных аденокарциномой ободочной кишки

и прямой кишки. Материалом исследования были нормальная и опухолевая ткани, полученные при проведении диагностической ректороманоскопии у пациентов. Уровень мРНК изучаемых показателей определялся методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. В результате проведенного исследования выявлены разнонаправленные изменения в молекулярных показателях у пациентов с ободочной и прямой кишкой. Отмечены возрастание экспрессии ингибитора 4EBP 1 в ткани ободочной кишки в 3,5 раза и снижение экспрессии c-RAF в 1,4 раза по сравнению с опухолью прямой кишки. Кроме этого, отмечено преобладание экспрессии HIF-2 у пациентов с ободочной кишкой по сравнению с прямой кишкой (экспрессия показателя возрастала в 7,7 раза). При этом отмечено снижение содержания VEGF и VHL в 24,7 и 67,0 раза соответственно по сравнению с раком прямой кишки. Также зафиксировано возрастание уровня мРНК PD-L2 в 2 раза в опухоли ободочной кишки по сравнению с прямой. Известно, что активация транскрипционных, ростовых факторов может влиять на экспрессию PD-рецепторов в опухоли.

Закключение. Биологические особенности опухоли могут определять сложный молекулярный механизм прогрессирования заболевания у пациентов с опухолями данной локализации. Они могут служить в качестве дополнительных прогностических критериев заболевания.

Изучение генетических особенностей больных с первично-множественными злокачественными новообразованиями

М.Н. Тилляшайхов, М.С. Гильдиева, А.А. Абдувалиев,
Ш.Н. Мусаева, Н.А. Нигманова

Республиканский специализированный научно-практический
медицинский центр онкологии и радиологии Минздрава
Республики Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан

Введение. К ряду факторов, обуславливающих высокий риск развития первично-множественных злокачественных новообразований (ПМЗН), можно отнести наследственные и приобретенные заболевания, связанные с повышенной ломкостью хромосом и нарушением процессов репарации ДНК. С целью улучшения репродуктивного здоровья женщин детородного возраста интерес представляют ПМЗН с участием РМЖ и РЯ, этиопатогенетически связанные с мутациями генов BRCA 1/2.

Материалы и методы. В исследуемую группу были включены 22 больных с ПМЗН репродуктивных органов. Генеалогическим методом проведен сбор сведений о семьях пробандов. Цитогенетическим методом изучали хромосомную нестабильность у больных ПМЗН. Выделение ДНК проводили с использованием

коммерческих наборов, для определения полиморфизма генов BRCA 1/2 применяли общепринятый метод ПЦР.

Результаты. На основании полученных результатов были составлены родословные. Анализ показал, что в 50 % семей у сибсов был диагностирован рак различных локализаций. У больных ПМЗН чаще наблюдался метохромный РМЖ (45,5 %). Цитогенетические исследования специфических нарушений хромосом показали, что уровень хромосомной нестабильности в виде фрагментации и дилеции хромосом был в 4,7 раза выше, чем у здоровых.

Определение генетической предрасположенности к BRCA-ассоциированному РМЖ показало, что в 27,2 % случаев обнаружена инсерция 5382insC в гене *BRCA1* в гетерозиготном состоянии, а мутации в гене *BRCA2* (6174delT) не обнаружено.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что обнаруженная мутация 5382insC гена *BRCA1* может являться генетическим маркером предрасположенности к ПМЗН у женщин узбекской этнической принадлежности.

Активность трипсина в тканях репродуктивных органов при онкопатологии

Ю.В. Фурман, Е.Б. Артюшкова, В.В. Хвостовой,
А.М. Быканова, А.Ю. Кулева

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск

Введение. Способность опухолевых клеток при инвазии в окружающие ткани вызывать частичную деградацию структур органов и тканей реализуется за счет повышения активности ряда протеолитических ферментов. При злокачественных опухолях различной локализации повышенный уровень протеаз в опухолевой ткани обычно свидетельствует о неблагоприятном прогнозе развития заболевания.

Цель исследования — определить активность трипсина и ингибитора трипсина в тканях тела матки женщин при онкопатологии репродуктивных органов.

Материалы и методы. Спектрофотометрическое определение активности трипсина осуществлялось по методу Ансона. Экспериментальные данные были обработаны статистически и методом корреляционного анализа. Оценка достоверности между группами была проведена с использованием критериев Стьюдента.

Результаты. В результате проведенных исследований было выявлено, что активность трипсина в тканях тела матки в ходе развития новообразований по схеме «без новообразований—доброкачественные—злокачественные» увеличивается. Активность трипсина в тканях тела матки у женщин без новообразований составляла $0,39 \pm 0,08$ нмоль/мл $\times$ мин, а у женщин со злокачественными образованиями этот показатель составил

$0,50 \pm 0,09$ нмоль/мл $\times$ мин. Рост активности трипсина, по нашему предположению, связан со снижением активности ингибитора трипсина в тканях тела матки. Величина активности ингибитора составила: в тканях тела матки без новообразований — $0,08 \pm 0,01$ нмоль/мл $\times$ мин, а в тканях тела матки со злокачественными образованиями — $0,06 \pm 0,01$ нмоль/мл $\times$ мин.

Заключение. Результаты проведенных исследований позволяют сформулировать следующие выводы: 1) выявлены биохимические различия активности одного компонента протеолитической системы у женщин с доброкачественными и злокачественными новообразованиями репродуктивных органов, которые могут быть использованы в качестве критериев оценки риска возникновения злокачественных опухолей; 2) они могут быть использованы в прогнозировании данного процесса и дифференциальной клинической диагностике.

Морфологический анализ культуры клеток рака молочной железы

Е.О. Шамшурина¹, А.С. Могиленских^{1,2}, С.В. Сазонов^{1,2},
М.В. Улитко^{2,3}, С.М. Демидов^{1,2}, С.А. Титова³

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург;

²ГАОУ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург;

³ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург

Материалы и методы. Биопатат карциномы молочной железы в стерильной среде, состоящей из PBS и 1 % раствора антибиотика, доставляли в лабораторию, где образцы очищали от соединительной ткани и сосудов, а затем механически измельчали. Фрагменты помещали в среду для диссоциации (4 мг/мл коллагеназы, 1 мг/мл гиалуронидазы, 0,1 % трипсина, DMEM: F-12) и инкубировали 16 ч при 37 °C и 5 % CO₂. Далее образец фильтровали с использованием 100 мкм клеточного фильтра и центрифугировали при 1600 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали с полной питательной средой, состоящей из DMEM: F-12, 5 % FBS, 1 % антибиотика, и переносили в культуральные чашки в посевной концентрации 3×10^5 клеток/мл. Культивирование проходило на протяжении 2 пассажей, смену среды осуществляли через 4–5 дней. Для морфологического исследования клетки окрашивали по Паппенгейму, площадь измеряли с помощью окуляр-микрометра. Статистическую обработку результатов проводили, используя программы MS Excel и Statistica 6, для оценки значимости различий использовали критерий Манна—Уитни.

Результаты. Морфологический анализ первичной культуры выявил значительный клеточный полиморфизм, выражающийся в наличии 2 субпопуляций: крупных распластаных клеток неправильной формы

с отчетливыми контурами, большими ядрами и цитоплазматической зернистостью и слабо прикрепленных к поверхности мелких округлых клеток с низкой оптической плотностью цитоплазмы. По мере увеличения продолжительности культивирования и числа пассажей возрастала доля более крупных клеток, в результате чего средняя площадь увеличилась с $8,50 \pm 0,52$ мкм в первичной культуре до $17,0 \pm 1,3$ мкм на 2-м пассаже ($p < 0,05$).

Гетерогенность и тенденция к увеличению размеров клеток РМЖ при культивировании свидетельствуют о различной пролиферативной активности субпопуляций клеток опухоли, полученных из одного образца, что должно учитываться при дальнейшем культивировании для создания персонифицированной экспериментальной модели.

Работа выполнена в рамках государственного задания УГМУ № 056-00151-18-00.

Сопряжение активности ферментов углеводного обмена и рецепторного статуса опухоли больных раком молочной железы

О.П. Шатова¹, Е.Ф. Комарова¹, Р.В. Ищенко²,
Е.Ю. Комарова³

¹ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

²ФГБУ «ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России», Москва;

³ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Цель исследования — выяснение взаимосвязей между активностью ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и экспрессией рецепторов к эстрогенам, прогестинам и эпидермальному фактору роста 2 (HER2) у больных РМЖ.

Материалы и методы. В операционных биоптатах опухолей, смежных тканей и сыворотке крови больных РМЖ T1–4N0–2M0 ($n = 68$, возраст — 46–76 лет)

изучали активность ЛДГ и Г6ФДГ методом обратноточной ВЭЖХ, экспрессию рецепторов — ИГХ и выражали в процентах к общему числу опухолевых клеток.

Результаты. Корреляционный анализ показал отсутствие зависимости степени выраженности экспрессии всех типов рецепторов от возраста пациенток, размера опухолевого узла, наличия или отсутствия метастазов.

Для показателей сывороточной активности изученных ферментов не выявлены статистически значимые связи с уровнем экспрессии эстрогеновых ($r = 0,30$ и $r = 0,22$) и прогестинных ($r = 0,14$ и $r = -0,18$) рецепторов в опухолевых клетках РМЖ при выраженной положительной связи между экспрессией HER2 и ЛДГ ($r = 0,71$), а также Г6ФДГ ($r = 0,82$) ($p < 0,01$).

При исследовании уровня активности ЛДГ и Г6ФДГ в узле опухоли показано отсутствие статистически значимых корреляций со степенью экспрессии рецепторов к эстрогенам ($r = 0,16$ и $r = 0,05$) и прогестинам ($r = -0,03$ и $r = -0,26$). Однако также выявлены положительные корреляции между экспрессией HER2 и активностью ферментов: средней силы ($r = 0,61$) для ЛДГ и высокой тесноты ($r = 0,89$) для Г6ФДГ ($p < 0,01$).

Также при изучении биоптатов смежных тканей не обнаружено достоверных связей между уровнем экспрессии стероидных рецепторов и показателями активности изученных ферментов углеводного обмена. Значения коэффициентов парной корреляции не превышали 0,26 по модулю, вероятность справедливости нулевой гипотезы составляла не менее 34,5 %.

Активность ферментов ЛДГ и Г6ФДГ в опухолевых тканях молочной железы, смежных злокачественно не трансформированных тканях, а также в сыворотке крови никак не связана с экспрессией стероидных рецепторов в опухоли. Однако показана положительная сопряженность активности ферментов обмена углеводов и экспрессии HER2, имеющая более выраженную корреляционную связь для Г6ФДГ как в ткани опухоли, так и в сыворотке крови. Дальнейшие исследования позволят определить экспрессию ферментов углеводного обмена в соответствии с молекулярным подтипом РМЖ.

ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ В ОНКОЛОГИИ

Доклады

Влияние экзосом спинномозговой жидкости на пролиферативную и миграционную активность клеток злокачественных глиом

Л.А. Гараева^{1,2,3}, А.В. Волницкий^{1,2}, Г.В. Гаврилов⁴,
Р.А. Камышинский², Н.А. Верлов^{1,2}, С.Н. Нарыжный^{1,5},
Т.А. Штам^{1,2,6}

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл.;

²НИЦ «Курчатовский институт», Москва;

³ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого», Санкт-Петербург;

⁴ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия
им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург;

⁵ФГБУ «НИИ биомедицинской химии
им. В.Н. Ореховича», Москва;

⁶ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России, Санкт-Петербург

Среди многочисленных «участников» метастазирования в последнее время внимание исследователей привлекают различные внеклеточные везикулы, в том числе экзосомы. Экзосомы — частицы размером 30–150 нм, окруженные липидной мембраной, выделяемые клетками в межклеточное пространство и биологические жидкости. В дополнение к феномену воздействия опухолевых экзосом на клетки здоровых тканей определенное значение в патогенезе онкологических заболеваний имеет обратный эффект, который оказывают экзосомы, секретируемые клетками различных тканей на клетки опухоли. Представленное исследование направлено на анализ эффекта опухолевых и нормальных экзосом плазмы и спинномозговой жидкости (СМЖ) на пролиферативную активность, клеточную адгезию, инвазию, скорость и способность к миграции трансформированных глиальных клеток в экспериментах *in vitro*.

С помощью ультрацентрифугирования методами анализа траекторий наночастиц, лазерной корреляционной спектроскопии, а также криоэлектронной микроскопии были выделены и охарактеризованы внеклеточные микровезикулы из СМЖ пациентов с диагнозом болезнь Паркинсона, или нормотензивная гидроцефалия. Далее

выделенные внеклеточные частицы сокультивировали с клетками глиального происхождения. Оценку кинетики пролиферативной активности клеточных линий 5 глиом под воздействием экзосом СМЖ неонкологических пациентов выполняли в режиме реального времени на приборе xCELLigence RTCA DP Analyzer (Biosciences, Inc., США). Анализ динамики клеточного роста в биотест-системе выявил значимое увеличение в пролиферативной и миграционной активности одной из исследованных глиальных линий в присутствии экзосом СМЖ. В целом можно сказать, что эффект, который оказывают экзосомы СМЖ на миграционную и пролиферативную способность клеток глиом, является избирательным в зависимости от клеточной линии и, возможно, зависит от профиля экспрессии генов глиальных клеток.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (проект № 18-015-00289).*

*Эксперименты по криоэлектронной микроскопии
выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант
№ 19-74-20146).*

Экзосомный молекулярный шаперон Hsp70 как фактор микроокружения опухоли

Е.Ю. Комарова, А.Д. Никитина, Л.В. Марченко,
Б.А. Маргулис, И.В. Гужова

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Клетки множества опухолей несут повышенный уровень молекулярных шаперонов, в частности Hsp70, что приводит к их повышенной пролиферации, способности к метастазированию и устойчивости к противоопухолевым препаратам. Тем не менее устойчивость клеток, основанную на Hsp70, можно преодолеть, если стимулировать экспорт шаперона из опухолевых клеток в микроокружение.

Опухолевые клетки взаимодействуют с клетками стромы с помощью многочисленных макромолекул и микровезикул. Поведение как собственно опухолевых клеток, так и клеток микроокружения в значительной степени зависит от репертуара цитокинов, представленных в определенном опухолевом локусе.

Ранее мы продемонстрировали, что экзогенный Hsp70, введенный в опухоль, способен проникать в опухолевые клетки, стимулировать экспорт шаперона в микроокружение и активировать врожденный и специфический противоопухолевый иммунный ответ. Для того чтобы понять, как бывший экзогенный (eHsp70) и бывший внутриклеточный (cHsp70) высвобождаются из опухолевой клетки, мы проследили путь, который проходит eHsp70, и показали, что главный механизм, который использует шаперон для проникновения в опухолевую клетку, — эндоцитоз, и оба, eHsp70 и cHsp70, покидают ее как в свободном состоянии, так и в составе экзосом. Другими словами, Hsp70 является важным компонентом микроокружения.

Для того чтобы понять, как eHsp70 влияет на клетки микроокружения, особенно на опухолеассоциированные макрофаги, мы создали 4 пары клеточных линий карциномы человека, где в каждой паре одна сублиния имела нормальный (высокий по сравнению с нормальными клетками) уровень экспрессии Hsp70, а другая — пониженный в результате трансфекции специфической shRNA, и инкубировали эти клетки с моноцитами человека. Мы показали, что проопухолевый цитокиновый репертуар, способность к эпителиально-мезенхимальному переходу и резистентность опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам после кокультивирования с моноцитами были выражены в большей степени в клетках с пониженным уровнем Hsp70, которые высвобождали в среду меньшее количество Hsp70. Мы также продемонстрировали, что обогащенные Hsp70 экзосомы из клеток меланомы B16 при подкожном введении мышам C57Bl вместе с опухолевыми клетками значительно замедляли опухолевый рост и повышали выживание животных-опухоленосителей благодаря активации специфического противоопухолевого иммунного ответа и снижению числа опухолеассоциированных макрофагов в опухолевой ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-29-09101-мк).

Исследование внеклеточных микроРНК биологических жидкостей человека при раке предстательной железы

М.Ю. Коношенко^{1,2}, О.Е. Брызгунова^{1,2}, Е.А. Лехнов^{1,2}, И.А. Запорожченко^{1,2}, С.В. Ярмошук², О.А. Пашковская², А.М. Горицкий², С.В. Пак², П.П. Лактионов^{1,2}

¹ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск;

²ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск

Введение. РПЖ является одним из наиболее распространенных видов злокачественных новообразований

у мужчин и занимает 2-е место в структуре заболеваемости как в России, так и во всем мире. Одним из наиболее перспективных источников диагностических и прогностических маркеров являются внеклеточные микроРНК, характеризующиеся высокой стабильностью и хорошей представленностью в биологических жидкостях. МикроРНК биологических жидкостей представлены в виде упакованных во внеклеточные везикулы и в виде нуклеопротеиновых комплексов. Эти пулы зависят от статуса родительских клеток и могут значительно различаться. Для чувствительной и специфичной детекции микроРНК, в том числе и в биологических жидкостях, в нашей лаборатории разработаны различные аналитические подходы.

Цель исследования — сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК во фракциях мочи и плазме крови здоровых доноров, пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ), больных РПЖ.

Материалы и методы. Были проанализированы образцы плазмы крови и мочи 10 здоровых доноров, 8 пациентов с ДГПЖ, 10 больных РПЖ. Внеклеточные везикулы мочи выделяли с помощью ультрацентрифугирования. Для выделения микроРНК из бесклеточных фракций мочи и плазмы крови (после 17 000g) и внеклеточных везикул мочи использованы ранее разработанные протоколы (Lekhnov и соавт., 2016). На основании результатов, полученных в процессе исследования экспрессии микроРНК в составе микрочастиц и бесклеточной фракции мочи (Lekhnov и соавт., 2018; Bryzgunova и соавт., 2019), а также анализа доступных данных литературы были выбраны 12 микроРНК, ассоциированных с развитием РПЖ. Далее с использованием детекторной системы CFX (BioRad, США) методом ОТ-ПЦР оценена экспрессия выбранных микроРНК.

Результаты и заключение. Результаты сравнительного анализа экспрессии микроРНК в крови и моче здоровых доноров, пациентов с ДГПЖ и больных РПЖ свидетельствуют о значительном диагностическом потенциале miR-19b, miR-22, miR-30e, miR-31, miR-92a, miR-125, miR-200, miR-205, miR-375, miR-378a, miR-425, miR-660, выделенных из внеклеточных везикул мочи. Наиболее эффективные выявленные соотношения (miR-125/miR-30e, miR-205/miR-30e, miR-375/miR-30e, miR-660/miR-30e, miR-200/miR-30e, miR-19b/miR-92a, miR-22/miR-92a, miR-378a/miR-92a, miR-425/miR-92a, miR-22/miR-92a) в сочетании могут классифицировать пациентов с РПЖ, ДГПЖ и здоровых доноров со 100 % чувствительностью при 100 % специфичности и, более того, с высокой избыточностью для большинства доноров. Это дает основания предполагать, что данные микроРНК — специфические маркеры РПЖ и могут быть в дальнейшем использованы для оптимизации неинвазивной диагностики, а также для мониторинга эффективности терапии РПЖ, что позволит корректировать тактику лечения пациентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 16-15-00124).

Особенности экспрессии тканеспецифических маркеров на экзосомах, секретируемых клетками колоректального рака

И.В. Назарова¹, А.В. Малек^{1,2}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

²ООО «Онко-система», Москва

По данным Всемирной организации здравоохранения, КРР — 3-я по распространенности злокачественная опухоль и 4-я по значимости причина онкологической смертности. Существующие методы скрининга КРР недостаточно эффективны. Большинство так называемых онкомаркеров, используемых в лабораторной практике, являются молекулами клеточной адгезии или компонентами гликокаликса (CA19-9, SEA, SEACAM5). Это не опухольспецифичные молекулы, их экспрессия имеет условно тканеспецифичный характер. Поэтому диагностическая ценность методов скрининга КРР, основанных на анализе таких онкомаркеров в плазме, крайне низкая.

Экзосомы — секретируемые клетками нановезикулы, имеющие сходный с клеточным биохимический состав. Можно предполагать, что экзосомы, секретируемые клетками эпителия толстой кишки, или развивающийся из этих клеток КРР должны иметь схожий состав мембранных белков (рецепторов, молекул клеточной адгезии, компонентов гликокаликса). Паттерн (набор) таких молекул в составе экзосом должен иметь тканеспецифичный характер. Поэтому для разработки метода ранней диагностики КРР необходимо сначала оценить профиль экспрессии тканеспецифичных мембранных белков (потенциальных маркеров) клетками эпителия толстой кишки и клетками КРР. Затем определить паттерн тканеспецифичных мембранных белков в популяции экзосом, секретируемых клетками КРР *in vitro*. На основе полученных данных можно создать метод ранней диагностики КРР, основанный на количественной оценке или выделении таких везикул из тотальной популяции экзосом плазмы.

В данной работе были проанализированы уровни экспрессии тканеспецифичных белковых маркеров в клетках нормального эпителия толстой кишки, клетках стабильных линий аденокарциномы толстой кишки (HCT-116, HT-29, Caco-2, COLO-320 и Hutu-80) и экзосомах, секретируемых этими клетками. В качестве метода детекции использовались Dot Blot и проточная цитометрия. По итогам исследования выявлен ряд мембранных белковых маркеров с характерным профилем экспрессии в клетках кишечного эпителия, КРР и экзосомах КРР.

Применение метода отбора аптамеров к поверхностным маркерам тканеспецифичных экзосом в рамках разработки метода диагностики онкологических заболеваний

Н.С. Никифорова^{1,2}, И.В. Назарова¹, В.В. Шаройко³, А.В. Малек^{1,2}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

²ООО «Онко-система», Москва;

³ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Различные варианты технологии жидкостной биопсии считаются перспективным подходом поздней диагностики многих онкологических заболеваний, включая РПЖ и КРР.

Экзосомы — везикулы межклеточного пространства, ограниченные липидной двухслойной мембраной. Экзосомы, секретируемые клетками различных типов тканей и опухолей и попадающие в биологические жидкости, имеют тканеспецифичный паттерн белков и нуклеиновых кислот (мРНК, микроРНК). Результаты исследований изменения состава экзосомальных протеинов и микроРНК в процессе прогрессирования и в связи с особенностями течения онкологических заболеваний создают основу для разработки методов диагностики и мониторинга. Разработка методов жидкостной биопсии, основанных на анализе экзосом плазмы, существенно тормозится отсутствием эффективных и стандартизированных технологий выделения экзосом из плазмы. Кроме этого, диагностически информативные тканеспецифичные экзосомы составляют минорную фракцию экзосом плазмы. Поэтому разработка технологии выделения тканеспецифичных экзосом является важной научной и методологической задачей.

Аптамеры — короткие одноцепочечные олигонуклеотиды, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с мишенями различной природы. Для получения аптамеров с заданными свойствами разработана технология SELEX (Sequential Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), которая предполагает поэтапное обогащение библиотеки случайных олигонуклеотидов молекулами с высокой аффинностью связывания «таргетной» структуры. Выбранные таким образом аптамеры могут быть использованы для выделения (capturing) тканеспецифичных популяций экзосом.

В представленной работе применялась технология SELEX для создания метода выделения экзосом, секретируемых клетками РПЖ и КРР. В качестве модельной «чистой» популяции везикул были использованы экзосомы, секретируемые клетками РПЖ и КРР *in vitro*. Эффективность технологии была доказана путем выделения тканеспецифичных везикул из плазмы.

Экстраклеточные везикулы способствуют прогрессии глиобластомы благодаря транспорту сплайсосомных белков

М.С. Павлюков¹, В.О. Шендер^{1,2}, К.С. Ануфриева², Ю. Хай³,
И. Накано³, М.И. Шахпаронов¹

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА», Москва;

³Университет Алабамы в Бирмингеме, США

Результаты исследования клинических образцов, полученных от пациентов с РЯ и глиобластомой, показали, что под действием терапии опухолевые клетки секретируют во внешнюю среду разнообразные компоненты сплайсосомы — рибонуклеопротеидного комплекса, осуществляющего сплайсинг молекул РНК в эукариотических клетках.

Дальнейшие эксперименты продемонстрировали, что погибающие во время лечения раковые клетки начинают экспрессировать необычные для себя сплайсосомные белки. Эти белки располагаются в ядре клетки, однако активация каспаз (цистеиновых протеаз), происходящая под действием терапии, вызывает диссоциацию сплайсосом от ядерного матрикса и их перемещение в цитоплазму. Оказавшись в цитоплазме, сплайсосомные белки и некодирующие РНК экспортируются из клетки с помощью экстраклеточных везикул. Эти везикулы захватываются соседними опухолевыми клетками, а сплайсосомные белки, содержащиеся в них, изменяют тип сплайсинга пре-мРНК в реципиентных клетках. Все это приводит к появлению новых изоформ белков и приобретению клеткой, поглотившей везикулы, более агрессивного и устойчивого к терапии мезенхимального фенотипа. В качестве одного из ключевых участников описанного выше процесса был определен белок RBM11. Этот белок может секретироваться с помощью везикул и изменять тип сплайсинга пре-мРНК в реципиентных клетках. Эти изменения в сплайсинге приводят к появлению более онкогенных изоформ белков — MDM4 и CyclinD1, что в конечном итоге повышает устойчивость опухолевых клеток к терапии и снижает срок жизни пациентов с глиобластомой.

Таким образом, в ходе данного исследования был продемонстрирован новый механизм коммуникации опухолевых клеток, основанный на межклеточном транспорте сплайсосомных белков. Такой обмен факторами сплайсинга проливает свет на причину появления агрессивных мезенхимальных клеток глиобластомы, обладающих высокой устойчивостью к ХТ и радиотерапии.

Идентификация вовлеченных в стимуляцию ангиогенеза белков и микроРНК в составе экзосом крови больных раком молочной железы

О.С. Тутанов¹, М.Ю. Коношенко¹, К.В. Проскура^{1,2},
Г.Д. Сагарадзе³, Н.В. Юнусова⁴, С.Н. Тамкович^{1,5}

¹ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск;

²ГБУЗ НО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер», Новосибирск;

³ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

⁴НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

⁵ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск

Введение. Известно, что экзосомы могут переносить некоторые факторы ангиогенеза и транспортировать их с током биологических жидкостей в отдаленные ткани и органы.

Цель исследования — идентификация вовлеченных в стимуляцию ангиогенеза белков и микроРНК в составе экзосом, циркулирующих в плазме, и суммарных экзосом крови (содержат экзосомы плазмы и ассоциированные с форменными элементами экзосомы) здоровых доноров (ЗД) и больных РМЖ.

Материалы и методы. Экзосомы выделены методом ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием и охарактеризованы в соответствии с рекомендациями Extracellular Vesicle Society. Ангиогенную активность везикул оценивали с использованием методики образования капилляроподобных структур эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC) на матрикеле, обедненном ростовыми факторами. Подсчет суммарной длины микротрубочек в лунке выполняли с помощью программного обеспечения ImageJ. Уровень ангиогенез-ассоциированных микроРНК в составе экзосом определяли с использованием количественной ПЦР, белки идентифицировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Результаты. Проточной цитофлуориметрией подтверждена экзосомальная природа выделенных везикул ($CD24/CD9 > CD9/CD81 > CD9/CD63 \approx CD24/CD63$). С помощью трекового анализа показано, что экзосомы плазмы ЗД имели размер 96 ± 16 нм, суммарные экзосомы крови — 130 ± 5 нм, у больных РМЖ — 127 ± 7 и 129 ± 12 нм соответственно. Впервые установлена ангиогенезингибирующая активность экзосом, ассоциированных с форменными элементами крови ЗД. Показано, что добавление суммарных экзосом крови ЗД к HUVEC в 4 раза снижает рост и формирование капилляроподобных структур в матрикеле по сравнению с эффектом, наблюдаемым от добавления экзосом плазмы ЗД. Уровень экспрессии ангиогенезингибирующей микроРНК miR-101 достоверно повышен в составе суммарных экзосом крови ЗД по сравнению

с экзосомами плазмы ЗД, экзосомами плазмы и суммарными экзосомами крови больных РМЖ.

Впервые установлена ангиогенезстимулирующая активность суммарных экзосом крови больных РМЖ на начальных стадиях заболевания. Показано, что при РМЖ экзосомы плазмы и суммарные экзосомы крови обладают сопоставимой ангиогенезстимулирующей активностью, усиливая рост и формирование капилляроподобных структур по сравнению с контролем на 83 и 69 % соответственно.

Показано, что ангиогенезстимулирующие микроРНК (miR-16-5p, miR-24-3p, miR-25-3p, miR-92a, miR-378a-3p, miR-425-5p) представлены в более высокой концентрации в составе экзосом больных РМЖ по сравнению с контрольной группой, однако статистически значимой разницы не обнаружено.

С помощью MALDI-TOF показано, что в экзосомах плазмы проангиогенные белки представлены в 2 раза чаще, чем в суммарных экзосомах крови как у ЗД, так и у больных РМЖ.

Заключение. Таким образом, секретируемые в кровотоке раковыми клетками экзосомы, по-видимому, вовлечены в активный ангиогенез, сопровождающий развитие опухоли.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-415-540012.

Белки липидных микродоменов в экстраклеточных везикулах

Е.М. Чевкина, Г.О. Скрыбин, А.В. Комельков,
С.А. Галецкий, М.Е. Аксельрод

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Экстраклеточные везикулы (ЭВ) — экзосомы и микровезикулы — играют важнейшую роль в межклеточной коммуникации, обеспечивая дистанционный обмен информацией и регулируя важнейшие процессы жизнедеятельности клеток и организма в целом. Микровезикулы формируются путем непосредственного отпочкования от плазматической мембраны, в то время как экзосомы формируются как интралюминальные везикулы в системе внутриклеточного везикулярного транспорта. Формирование интралюминальных везикул непосредственно связано с отбором биомолекул в состав будущих экзосом (экзосомального карго). Механизмы, лежащие в основе формирования экзосом и селекции экзосомального карго, до сих пор остаются до конца неясными. Предполагается, что существует несколько путей биогенеза экзосом, хотя вопрос об их независимости остается открытым. Наименее изученным является недавно обнаруженный механизм, связанный с липидными микродоменами или липидными рафтами (ЛР). Под ЛР понимают высокодинамичные

наноучастки плазматической мембраны, насыщенные стеролами, сфинголипидами, а также определенными белками, которые могут достигать метастабильного состояния за счет липид-липидных, липид-белковых или белок-белковых взаимодействий.

Помимо липидов большое значение в поддержании структуры ЛР имеют белки, среди которых заякоренные на внешнем слое белки GPI-AP, прикрепленные к внутреннему слою белки семейства SPFH (Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C), а также некоторые трансмембранные белки. Несмотря на крайне гетерогенную природу ЛР, различают их 2 основных морфологических типа: планарные (плоские ЛР) и инвагинированные ЛР, или кавеолы, в формировании которых принимают участие белки кавеолы. Отдельно выделяют рафтподобный подтип — тетраспанинобогатые микродомены. Сходные структуры присутствуют не только на плазматической мембране, но и на мембранах клеточных органелл. ЛР-зависимый механизм биогенеза экзосом до сих пор мало исследован. Еще меньше известно об участии рафтообразующих белков в этом процессе. Данные нескольких работ свидетельствуют об участии флотиллина-1, представителя SPFH-семейства, в отборе экзосомального карго. Присутствие флотиллина-1 в составе экзосом показано многократно, в то же время другие белки этого семейства, такие как стоматин, ранее почти не исследовались, также имеются лишь единичные данные об экзосомальном кавеолине-1.

В докладе представлены данные впервые проведенного исследования рафтообразующих белков (флотиллина-1, флотиллина-2, стоматина, кавеолы-1) и экзосомальных маркеров различных классов в составе ЭВ (экзосом и микровезикул), секретируемых опухолевыми клетками различного происхождения в культуре, а также экзосом в составе различных биологических жидкостей пациентов с онкологическими заболеваниями и здоровых доноров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-04-00038 А).

Металлопротеиназы экзосом при диссеминированном раке яичников

Н.В. Юнусова, М.Р. Патышева, Е.А. Замбалова,
Л.А. Коломиец, С.В. Молчанов, И.В. Кондакова

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Металлопротеиназы являются важными регуляторами передачи сигналов от рецепторов фактора роста и рецепторов адгезии, играют роль в регуляции подвижности клеток и метастазировании, однако их роль в ЭВ мало изучена.

Цель исследования — оценить уровень металлопротеиназ ADAM10, ADAM17, MMP9, MMP2 и EMMPRIN

в циркулирующих и асцитических экзосомах у больных РЯ во взаимосвязи с объемом асцита и индексом перитонеального канцероматоза.

Материалы и методы. Образцы крови и асцита у пациентов с пограничными опухолями яичников ($n = 10$; средний возраст — $38 \pm 2,5$ года) и больных диссеминированным РЯ стадии ППВ, С ($n = 35$, средний возраст — $56,5 \pm 2,5$ года) использовали для выделения экзосом методом ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Объем асцита и индекс канцероматоза оценивали с помощью УЗИ и МРТ, а также уточняли интраоперационно. Экзосомы были охарактеризованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Результаты. Уровень перечисленных металлопротеаз оценивали с помощью проточной цитометрии. В отношении металлопротеиназ субпопуляционный состав экзосом плазмы крови при пограничных опухолях яичников и РЯ сходен, преобладают популяции ADAM10–/ADAM17–

(до 92 %) и MMP9+/MMP2–/EMMPRIN– (до 90 %). В экзосомах из асцита при пограничных опухолях яичников в равной степени встречаются ADAM10+/ADAM17–ADAM10–/ADAM17+ (до 18 %), дабл-негативная популяция составляет около 38 %, дабл-позитивная — около 28 %. При РЯ доминирует дабл-негативная популяция (80 %). У больных РЯ субпопуляционный состав экзосом (ADAM-протеаз и MMPs) плазмы крови существенно зависел от объема асцита. Выявлена зависимость индекса перитонеального канцероматоза со встречаемостью популяции ADAM10–/ADAM17+ в экзосомах плазмы крови больных диссеминированным РЯ ($R = 0,66$; $p < 0,05$).

Заключение. Таким образом, уровень металлопротеиназ (ADAM10, ADAM17, MMP2, MMP9) и EMMPRIN в циркулирующих экзосомах, а также оценка отдельных субпопуляций экзосом являются перспективными подходами к оптимизации тактики лечения больных РЯ.

Постеры

Влияние режимов культивирования на особенности роста первичных культур глиомы человека и продукцию микровезикул

Н.Г. Преснухина¹, В.И. Першин^{1,2}, Н.С. Максимова¹,
О.М. Широкова¹, О.Г. Заборская^{1,2}, М.С. Гусева^{1,2},
Н.Г. Проданец¹, Т.Ф. Ковалева¹, И.А. Медяник¹,
И.В. Мухина^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

²ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород

Введение. Глиомы — наиболее распространенные первичные опухоли головного мозга. Традиционные способы диагностики и лечения глиом недостаточно эффективны, продолжительность жизни пациентов с глиомами не превышает 12–24 мес. Это связано с патогенетическими особенностями роста и локализации глиом, высокой вероятностью рецидивов и резистентностью к терапии. Поиск онкомаркеров для диагностики, прогноза и выбора терапии глиом является приоритетным направлением исследований в онкологии. Известно, что компоненты микровезикул, продуцируемых опухолевыми клетками, могут активировать рост и инвазию опухоли, влиять на ангиогенез и лекарственную резистентность. Однако эффективность исследования микровезикул и их состава в клинической практике в первую очередь зависит от используемых методов получения и очистки.

Цель исследования — разработка эффективных режимов культивирования первичных культур глиомы человека для выделения микровезикул.

Материалы и методы. Объектом исследования служил материал биопсий пациентов со злокачественными опухолями головного мозга (grade II–IV), диагноз верифицировали по результатам МРТ, патоморфологического, и ИГХ-исследований. Культивирование клеток проводили в стандартных условиях (5 % CO₂, 37 °C). Экзосомы выделяли методами дифференциального центрифугирования, Exosome Isolation Kit (Invitrogen) и магнитной сепарации (Miltenyi Biotec). Верификацию выделяемых экзосом выполняли методом просвечивающей электронной микроскопии и вестерн-блотт-анализа маркера CD63.

Результаты. Однофазная ферментативная диссоциация (трипсин + коллагеназа IV) недостаточно эффективна для разделения клеток опухоли, а культуральная среда контаминирована эритроцитами. Культивирование опухолевых клеток в среде DMEM/F12 с добавлением фетальной бычьей

сыворотки без экзосом (Fetal Bovine Serum exosome-depleted; Thermo Fisher) приводит к дифференциации клеток опухоли, потере пролиферативных и туморогенных свойств, что может искажать состав экзосом. Двухфазная ферментативная диссоциация (папаин + ДНКазы I; трипсин + коллагеназа IV) в сочетании с лизисом эритроцитов показала большую эффективность. Культивирование в среде DMEM/F12, обогащенной FGF2, EGF и B27, сохраняло способность опухолевых клеток к продолжительному делению и выделению экзосом, в процессе роста формировались глиосферы, способные образовывать новые колонии при пересеве.

Заключение. Культивирование опухолевых клеток в среде, обогащенной факторами роста, позволяет сохранить исходный фенотип опухоли и экстракцию микровезикул.

Работа поддержана внутренним грантом ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

Экзосомы и развитие лекарственной устойчивости в клетках миелолейкоза K-562

А.В. Шунаев, М.А. Красильников

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Цель исследования — изучение роли экзосом в развитии лекарственной резистентности клеток злокачественных опухолей.

Эксперименты проводили на клетках миелолейкоза K-562 и доксорубицин-резистентной линии K-562/is9. Клетки культивировали в течение 4 сут в стандартной среде, затем экзосомы выделяли из кондиционированной культуральной среды методом дифференциального ультрацентрифугирования. Для изучения роли экзосом в развитии резистентности родительские клетки K-562 культивировали в присутствии экзосом, полученных от резистентной сублинии K-562/is9. В качестве контроля использовали экзосомы собственных родительских клеток.

Предварительный анализ содержания в экзосомах Р-гликопротеина, одного из основных АВС-транспортеров, показал резкое увеличение содержания этого белка в экзосомах резистентных клеток. Мы обнаружили, что кратковременное (в течение 1–3 сут) культивирование родительских клеток с экзосомами резистентных клеток приводит к незначительному, в пределах 10 %, повышению устойчивости клеток к доксорубину по сравнению с клетками, обработанными только

экзосомами родительских клеток. Оказалось, что увеличение времени культивирования клеток с экзосомами до 15 сут приводит к заметному усилению резистентности таких клеток, сохраняющемуся не менее 30 сут после отмены добавления экзосом. Последнее наблюдение свидетельствовало о возможном подключении иных, помимо активации ABC-транспортеров, механизмов резистентности клеток в условиях длительной обработки экзосомами. Косвенным подтверждением этого предположения явилось обнаруженное нами заметное увеличение резистентности в клетках, обработанных только родительскими экзосомами, хотя и в меньшей степени, чем в клетках после обработки резистентными экзосомами. Дальнейший анализ изменений сигнальных белков показал, что экзосомы родительских клеток, а в большей степени резистентных клеток, вызывают выраженную активацию транскрипционного фактора AP-1 и повышение экспрессии эффекторов AP-1 в клетках-реципиентах.

Взяты вместе полученные результаты свидетельствуют, что механизм экзосомзависимой передачи лекарственной резистентности может и не ограничиваться временным увеличением уровня ABC-белков, но сопровождаться адаптивными изменениями внутриклеточного сигналинга, механизм которых еще требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09016).

Роль экзосом в развитии резистентности клеток рака молочной железы MCF-7 к рапамицину

Ю.Ю. Щеголев, М.А. Красильников

*ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва*

Цель исследования — изучение роли экзосом в развитии резистентности клеток злокачественных опухолей к ингибиторам mTOR — соединениям, на сегодняшний день активно используемым в клинической практике в качестве противоопухолевых агентов.

Экзосомы представляют собой микровезикулы размером 30–100 нм, продуцируемые клетками

в окружающую среду и содержащие целый спектр биологически активных молекул, включая различные типы РНК, ДНК, белков и липидов. Ключевой особенностью экзосом является их способность проникать внутрь клеток-реципиентов, вызывая каскад изменений на геномном (за счет интеграции ДНК) и эпигеномном (за счет изменения экспрессии/содержания белков, микроРНК и др.) уровнях.

Эксперименты проводили на клетках РМЖ MCF-7. В условиях длительного культивирования клеток MCF-7 с ингибитором mTOR рапамицином была получена рапамицинрезистентная сублиния MCF-7/Rap, сохраняющая повышенный уровень резистентности к рапамицину в течение не менее 30 сут после перевода в стандартную среду. Анализ ключевых сигнальных белков показал, что резистентные клетки характеризуются существенной активацией mTOR и гиперэкспрессией белка Raptor, одного из основных корегуляторов mTOR. Одновременно в резистентных клетках отмечаются повышенный уровень Akt — ключевого антиапоптотического белка PI3K-сигналинга — и конститутивная активация транскрипционных факторов, находящихся в том числе под контролем PI3K/Akt-сигналинга, — AP-1 и NF-κB.

Мы обнаружили, что длительное (в течение 15 сут) культивирование клеток MCF-7 с экзосомами резистентных клеток MCF-7/Rap приводит к развитию частичной резистентности клеток-реципиентов к рапамицину в отличие от экзосом собственных (родительских) клеток, которые не вызывают такого эффекта. Экзосоминдуцированная резистентность оказалась достаточно стабильной и сохранялась в клетках в течение не менее 30 сут после прекращения действия экзосом. Сравнительный анализ действия экзосом родительских и резистентных клеток на уровень внутриклеточных сигнальных белков выявил существенное повышение активности Akt и транскрипционных факторов AP-1 и NF-κB под действием экзосом резистентных, но не родительских клеток.

Таким образом, впервые продемонстрировано участие экзосом в распространении резистентности к рапамицину по пулу опухолевых клеток, установлены ключевые изменения внутриклеточного сигналинга, общие для первичной и экзосоминдуцированной резистентности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09016).

Тезисы

Тетраспанины экзосом плазмы крови при колоректальном раке

Е.А. Замбалова, Н.В. Юнусова, М.Р. Патышева,
А.А. Димча, С.Г. Афанасьев

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Экзосомы — наноразмерные внеклеточные везикулы — участвуют во многих физиологических и патологических процессах, таких как межклеточная передача сигналов, ремоделирование стромы, канцерогенез и т.д. Тетраспанины CD9, CD63, CD81 являются экзосомальными биомаркерами, так как их концентрация в мембранах экзосом достаточно высокая. Они, взаимодействуя с различными молекулами и формируя надмолекулярные комплексы, участвуют в биогенезе экзосом, сортировке экзосомальных белков, клеточной адгезии, поглощении экзосом клетками-реципиентами и презентации экзосомами антигенов с последующим иммунным ответом. Другими важными тетраспанинами являются Tspan8 и CD151. Tspan8 ответственен за подвижность клеток, CD151 вносит вклад в адгезию и деградацию матрикса, участвуя в метастазировании опухолей.

Цель исследования — оценка экспрессии тетраспанинов экзосом плазмы крови больных КРР с различной распространенностью опухолевого процесса.

Материалы и методы. В исследование были включены препараты экзосом плазмы крови пациентов контрольной группы ($n = 10$) и больных КРР ($n = 30$, T2–4N0–2M0–1), выделенных методом ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Экзосомы были охарактеризованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Уровни экспрессии тетраспанинов экзосом определяли методом проточной цитометрии.

Результаты. У пациентов контрольной группы и больных КРР с различной степенью распространенности опухолевого процесса популяции CD9/CD63 и CD9/CD81 представлены в равной степени.

Обнаружены статистически значимые различия в уровне медианы интенсивности флуоресценции CD9/CD24 **позитивных образцов экзосом** у больными локализованным КРР по сравнению с больными местно-распространенным КРР, а также между местно-распространенным и метастатическим КРР. Выявлены особенности белковой экспрессии тетраспанинов Tspan8, CD151 в выделенных экзосомах.

Заключение. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения роли тетраспанинового профиля экзосом в диагностике и прогнозировании КРР.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-415-703006.

Анализ белка стоматина в составе экстраклеточных везикул различных биологических жидкостей

Г.О. Скрябин¹, Е.Е. Савельева¹, А.В. Комельков¹,
С.А. Галецкий¹, Д.В. Багров², Е.Г. Евтушенко²,
И.И. Никишин², М.Е. Аксельрод¹, Е.М. Чевкина¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Введение. Мембранный белок стоматин является представителем семейства SPFH (Stomatin, Prohibitin, Flotillin, HflK/C) и компонентом плоских липидных рафтов. Как и другие белки, содержащие прохибиновый домен, стоматин связывает холестерол и участвует в образовании белковых комплексов, формирующих холестеролобогатые липидные микродомены на плазматической мембране. Этот белок на высоком уровне представлен на мембране эритроцитов. Известно, что стоматин и флотиллины могут колокализоваться в составе одних и тех же липидных рафтов. Однако в отличие от флотиллинов данный белок в составе ЭВ до настоящего времени не исследовался, за исключением везикул, секретируемых клетками крови.

Цель исследования — изучение присутствия и уровня представленности стоматина в составе ЭВ, выделенных из различных биологических жидкостей человека.

Материалы и методы. ЭВ, соответствующие по размерам экзосомам и микровезикулам, выделяли с помощью дифференциального ультрацентрифугирования. Биологические жидкости включали асцитическую жидкость от пациентов с РЯ ($n = 7$) и РМЖ ($n = 2$), плазму крови пациентов с РЯ ($n = 16$) и здоровых доноров ($n = 3$), смывы из полости матки пациентов с неонкологическими заболеваниями ($n = 3$), кондиционированную среду трансформированных клеток. Клеточные линии HMP1 (A549, H1299, H460), РМЖ (MCF-7) и РЯ (SCOV3) культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % безэкзосомной сыворотки. Верификацию экзосом выполняли с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и анализа траектории движения наночастиц (NTA). Анализ стоматина во всех образцах проводили методом вестерн-блотт-гибридизации параллельно с анализом экзосомальных маркеров CD9, TSG101, Alix, флотиллином-1.

Результаты. Впервые показано, что стоматин присутствует в составе ЭВ (во фракциях, соответствующих по размеру микровезикулам и экзосомам) во всех исследованных образцах. Отсутствие стоматина в отрицательном контроле (среда DMEM с 10 % безэкзосомной FBS,

подвергнутая процедуре выделения экзосом) подтверждает клеточное происхождение экзосомального стоматина. Соотношение уровня стоматина в ЭВ исследуемых образцов хорошо соответствовало таковому для CD9 и TSG101 и в меньшей степени — для флотиллинов и Alix. Важно отметить, что уровень стоматина в ЭВ всех клеточных линий значительно превышал таковой для соответствующих клеток-продуцентов, т.е. клеточное/везикулярное распределение стоматина соответствовало таковому для экзосомальных маркеров.

Заключение. Впервые показано присутствие стоматина в экзосомах, секретируемых эпителиальными клетками различного происхождения. Полученные данные указывают на перспективность использования стоматина в качестве нового экзосомального маркера.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-04-00038 А).

Кавеолин-1 дифференциально представлен в составе экзосом, секретируемых опухолевыми клетками различного происхождения

Г.О. Скрябин¹, Е.Е. Савельева¹, А.В. Комельков¹,
С.А. Галецкий¹, Д.В. Багров², Е.Г. Евтушенко²,
И.И. Никишин², М.Е. Аксельрод¹, Е.М. Чевкина¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Введение. Кавеолин-1 (Cav1) участвует в регуляции ряда процессов, включая реорганизацию мембраны, эндоцитоз и передачу сигналов. Множество данных свидетельствует о противоречивой роли Cav1 в опухолевой прогрессии, которая, по-видимому, зависит от типа опухоли, стадии прогрессии и др. В составе ЭВ Cav1 практически не исследовался, за исключением нескольких работ по анализу ЭВ при гепатоцеллюлярной карциноме, меланоме и РМЖ, причем для 2 последних случаев показана связь экзосомального Cav1 с уровнем малигнизации клеток.

Цель исследования — изучение Cav1 в составе ЭВ, секретируемых клетками различных типов опухолей — НМРЛ, РМЖ и РЯ.

Материалы и методы. Клеточные линии НМРЛ (H1299, A549 и H460), РМЖ (MCF-7) и РЯ (SCOV3) культивировали в среде DMEM с добавлением безэкзосомной FBS. Образцы экзосом выделяли методом дифференциального центрифугирования и верифицировали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и метода анализа траекторий движения наночастиц. Анализ Cav1 проводили методом вестерн-блотт-гибридизации параллельно с известными экзосомальными маркерами CD9, TSG101 и флотиллином-1. Визуализацию локализации Cav1 в клетках

осуществляли с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания.

Результаты. Показано, что в отличие от экзосомальных маркеров Cav1 дифференциально представлен в составе ЭВ различных клеток, причем его уровень варьирует от практически полного отсутствия (в экзосомах линий MCF-7 и H460) до очень высокого (SCOV3 и H1299). При этом в клетках всех исследованных линий Cav1 экспрессируется, хотя и на разном уровне. Сравнение уровней Cav1 и экзосомальных маркеров в экзосомах и клетках-продуцентах показало принципиальное различие. Так, если уровень CD9, TSG101 и флотиллина-1 в экзосомах был значительно выше клеточного во всех исследуемых линиях (так называемое обогащение везикул), то в случае Cav1 это соотношение значительно отличалось: наименее агрессивная линия НМРЛ H460 и малоинвазивная линия MCF-7 характеризовались очень низким уровнем Cav1 в клетках и полным отсутствием данного белка в экзосомах. В линиях A549 и SCOV3 уровень клеточного Cav1 был значительно выше по сравнению с таковым в H460 и MCF-7, однако и в этих линиях клеточный уровень Cav1 превышал экзосомальный. Наконец, в линии H1299 (метастаз карциномы легкого) уровень экзосомального Cav1 значительно превышал его уровень в клетках.

Заключение. В отличие от экзосомальных маркеров CD9, TSG101 и флотиллина-1 Cav1 дифференциально представлен в экзосомах, секретируемых клетками различного происхождения. Уровень экзосомального Cav1, а также его везикулярно-клеточное соотношение могут быть связаны со степенью агрессивности клеток. Полученные данные указывают на необходимость дальнейшего исследования экзосомального Cav1 в качестве потенциального маркера уровня малигнизации клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-04-00038 А).

Поведение нановезикул в двухфазных системах: перспективы разработки метода выделения экзосом в рамках решения клинических задач

М.А. Слюсаренко^{1,2}, Н.П. Евлампиева², А.В. Малек¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Внеклеточные везикулы, такие как экзосомы, являются объектом активных исследований в области фундаментальной онкологии. Активность этих исследований определяется возможностью разработки новых методов жидкостной биопсии в целях диагностики онкологических заболеваний и новых систем

доставки противоопухолевых лекарств. Нановезикулы продуцируются клетками организма и присутствуют во многих биологических жидкостях (плазма крови, моча, слюна и т. д.). Из существующих методов выделения экзосом из плазмы (ультрацентрифугирование, фильтрация, иммунопреципитация и др.) ни один нельзя назвать идеальным, для каждого характерно определенное сочетание качественных и количественных параметров выделенных везикул. Эти методы относительно трудоемки и не предполагают возможности стандартизации, что затрудняет их использование в клинической практике. В частности, разработка диагностических методов, основанных на анализе экзосомальных микроРНК, предполагает необходимость эффективного выделения экзосом с минимальной контаминацией белками плазмы, которые связывают диагностически неинформативные формы циркулирующих микроРНК.

Решение этой задачи может быть найдено путем использования разницы физико-химических характеристик везикул и белков плазмы, которые определяют характер их поведения в двухфазной системе водных растворов полимеров. В представленной работе были

исследованы характеристики различных (по концентрации и соотношению) полимеров: полиэтиленгликоля и декстран; определены условия образования двухфазной системы, и проведен анализ поведения экзосом в этой системе. Исследование размеров экзосом, выделенных предложенным методом, было выполнено с использованием динамического рассеяния света и атомно-силовой микроскопии. Подтверждение и анализ содержания экзосом в пробах были проведены с помощью дот-блоттинга. Присутствие полимеров в пробах было проанализировано с помощью Рамановской спектроскопии. Для оценки эффективности выделения экзосомальной фракции микроРНК анализ относительной концентрации нескольких молекул (miR-451, miR-126) в образцах выделенных экзосом был проведен с помощью ОТ-ПЦР.

Полученные результаты показали эффективность разработанного метода по сравнению с рядом существующих коммерческих наборов для выделения экзосом. С учетом высокой эффективности, низкой стоимости и относительной простоты разработанный метод может быть рекомендован для применения в лабораторной и клинической практике.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОПУХОЛЕЙ

Доклады

Молекула повреждения почек (KIM-1) — возможный патогенетический фактор и маркер для ранней диагностики почечно-клеточного рака

Е.С. Герштейн¹, Д.С. Набережнов¹, Е.А. Короткова¹,
Н.Ф. Фролова², С.Л. Теодорович¹, В.Б. Матвеев¹,
Н.Е. Кушлинский¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ГБУЗ г. Москвы «ГКБ № 52 ДЗМ», Москва

Введение. Одними из наиболее актуальных задач в области улучшения результатов лечения рака почки являются поиск и валидация молекулярных маркеров для его ранней неинвазивной диагностики, которых в клинической практике пока не существует. В июле 2018 г. опубликованы результаты международного популяционного исследования, показавшего, что еще до возникновения и/или выявления рака почки значимо повышается уровень KIM-1 (kidney injury molecule) — молекулы (маркера) повреждения почек в плазме крови.

Цель исследования — сравнительная оценка содержания KIM-1 в плазме крови практически здоровых людей, пациентов с неопухолевыми патологиями почек и больных опухолями почки, анализ взаимосвязи уровня маркера с клинико-морфологическими особенностями ПКР, его диагностических и прогностических характеристик.

Материалы и методы. Обследованы 125 больных раком и 14 — доброкачественными опухолями почки. В контрольную группу вошли 36 практически здоровых доноров, в группу патологического контроля — 80 пациентов с нефритами различной природы и степени тяжести. Концентрацию KIM-1 в плазме крови определяли с помощью наборов реактивов Human Serum TIM-1/KIM-1/NAVCAR Quantikine® ELISA (R&D Systems Biotechnique®).

Результаты. Содержание KIM-1 в плазме крови больных раком и доброкачественными опухолями почки значимо повышено по сравнению со здоровым контролем ($p < 0,000001$ и $p < 0,01$ соответственно),

но достоверно не отличается от уровня маркера у пациентов с нефритами. Показатели пациентов с доброкачественными новообразованиями ниже, чем у больных раком ($p < 0,0001$). При пороговом уровне 85 пг/мл, соответствующем 90 % специфичности относительно «здорового» контроля, чувствительность выявления первичного рака почки составляет 79 %. Уровень KIM-1 возрастает с увеличением распространенности рака почки и уже на I стадии заболевания высоко достоверно превышает показатели группы контроля и пациентов с доброкачественными опухолями ($p < 0,0001$ и $p < 0,05$ соответственно). Чувствительность выявления I стадии рака почки при вышеуказанном пороговом уровне составляет 71 %, II стадии — 73 %, III–IV — 92–94 %. Высокий (> 163 пг/мл) уровень KIM-1 в плазме крови достоверно ухудшает общую выживаемость больных раком почки не только в общей группе, но и при I стадии заболевания.

Заключение. KIM-1 плазмы крови может стать первым высокочувствительным маркером для раннего выявления ПКР. У больных с подтвержденным раком почки повышенный уровень KIM-1 в плазме крови является также фактором неблагоприятного прогноза.

Исследование концентрации мутантной опухолевой ДНК в плазме крови у детей с диффузными опухолями ствола головного мозга в процессе радиотерапии

Е.Л. Джикия, О.С. Регентова, М.В. Захарченко,
Т.М. Кулинич, В.К. Боженко, Н.И. Зелинская,
Е.В. Аббасова, О.Г. Желудкова, Ф.Ф. Антоненко
ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

Введение. Проведение радиотерапии (РТ) при опухолях ствола головного мозга (ОСГМ) у детей в настоящее время является единственным методом помощи этой категории пациентов. Из-за близости расположения опухоли к ядрам черепно-мозговых нервов и проводящим путям радикальное хирургическое лечение сопряжено с риском тяжелой инвалидизации,

различные варианты биопсий используются редко. Показано, что ряд молекулярно-генетических маркеров (мутации в генах *BRAF*, *IDH 1–2*, *H3*, *ATRX*) имеют диагностическую ценность при определении лечебной тактики для данной категории больных, однако отсутствие морфологической верификации опухоли в большинстве случаев существенно затрудняет использование данных маркеров в клинической практике. Методы жидкостной биопсии позволяют с высокой точностью определять опухолевую ДНК в периферической крови, могут быть использованы для определения молекулярных маркеров и выбора тактики лечения, а также оценки прогноза у пациентов с ОСГМ.

Цель исследования — определение диагностической значимости концентрации опухолевой ДНК, содержащей мутацию *BRAFV600E* в плазме крови у детей с ОСГМ в процессе радиотерапии.

Материалы и методы. С помощью цифровой капельной ПЦР (ddPCR) определялась концентрация мутантной опухолевой ДНК (мутация *BRAFV600E*) в 110 образцах плазмы крови (31 пациент). Образцы получали до начала курса РТ, в процессе РТ (3–5-й и 14–18-й дни) и после окончания РТ. По результатам проведенной лучевой терапии пациенты были разделены на две группы: 1-я — наступление рецидива опухоли менее чем через 6 мес после окончания курса РТ; 2-я — стабилизация процесса в течение 6 мес и более после окончания курса РТ.

Результаты. Показаны достоверное увеличение относительной концентрации мутантной (*V600E*) ДНК гена *BRAF* в периферической крови в начале курса РТ и ее снижение к концу курса в безрецидивной группе (2-я группа). Отсутствие изменений или увеличение уровня *BRAFV600E* к концу курса РТ было характерно для пациентов с рецидивом в ранние сроки (1-я группа). Достоверность отличий $<0,05$.

Заключение. Методы жидкостной биопсии позволяют оценить изменения количества мутантной (опухолевой) ДНК в плазме периферической крови у детей с ОСГМ при РТ, причем увеличение уровня мутантной ДНК коррелирует с хорошим прогнозом заболевания. Динамический контроль концентрации опухолевой ДНК, содержащей мутацию *BRAFV600E*, в плазме крови у детей с ОСГМ в процессе РТ может быть использован для прогноза эффективности РТ.

Новый метод дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы путем анализа микроРНК

М.С. Князева^{1,2}, А.В. Малек¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

²ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург

Узловые образования ЩЖ (УОЩЖ) являются распространенной патологией органов эндокринной системы. В большинстве случаев УОЩЖ имеют доброкачественную природу, но часть узлов являются злокачественными и требуют оперативного лечения. В настоящее время в качестве диагностического стандарта принято проведение тонкоигольной аспирационной биопсии с цитологическим анализом полученного биоптата. По ряду объективных причин цитологическое исследование не всегда позволяет получить информативный ответ, который должен определять тактику лечения. Поэтому разработка дополнительных методов анализа биопсийного материала является актуальной задачей. В ряде исследований было показано, что изменение концентрации некоторых типов молекул микроРНК в клетках ЩЖ имеет диагностическое значение. На основе этих данных ведутся разработки методов уточняющей диагностики.

В исследование были включены архивные гистологические образцы, полученные от пациентов с различными формами узловых заболеваний ЩЖ, проходивших лечение в МНИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Из каждого образца были получены тонкие срезы, была выделена тотальная РНК. Для анализа уровня экспрессии отдельных молекул микроРНК использовался метод обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в режиме реального времени. Дизайн исследования включал: широкий профайлинг пулов образцов одного гистологического типа, анализ данных и выбор маркерных микроРНК, анализ таких микроРНК в коллекции образцов, оценка показателей диагностической значимости. В рамках исследования был использован оригинальный алгоритм для дифференциальной диагностики 2 групп заболеваний. С помощью данного алгоритма были предложены подходы к дифференциальной диагностике.

1. Нетоксического зоба и злокачественных новообразований ЩЖ.

2. Папиллярного рака и фолликулярного варианта папиллярного рака.

3. Фолликулярной аденомы и фолликулярной карциномы.

Анализ микроРНК в образцах биопсийного материала, полученного при тонкоигольной аспирационной биопсии, представляется перспективным методом уточняющей диагностики УОЩЖ на дооперационном этапе.

Прогностическое значение молекулярных фенотипов колоректального рака

Т.В. Крашихина, В.К. Боженко, М.В. Захаренко,
В.А. Солодкий, С.В. Гончаров, У.С. Станоевич

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»
Минздрава России, Москва

Введение. Несмотря на улучшающиеся результаты лечения КРР, остается целая группа пациентов, прогрессирующие у которых наступает достаточно рано и непрогнозируемо, даже при I–II стадиях заболевания. Причиной такого состояния может явиться отсутствие учета в лечении пациентов молекулярно-генетической гетерогенности опухолей при КРР, которая определяет эффективность системной терапии, прогноз и скорость прогрессирования. С целью внедрения в практику существующих фенотипов КРР необходимо их более подробное изучение и дополнение с целью формирования клинического алгоритма для групп пациентов с наихудшим прогнозом.

Цель исследования — определить клинико-молекулярные фенотипы КРР на основе уровня экспрессии изучаемых генов в ткани опухоли с формированием группы неблагоприятного прогноза.

Материалы и методы. Методом ПЦР в реальном времени проанализирован уровень экспрессии 64 генов в ткани опухоли в образцах, полученных от 172 пациентов с I–III стадиями КРР. Средние сроки наблюдения — $28,15 \pm 14,70$ мес. Прогрессирование отмечено у 21,3 % пациентов. Лечение всех пациентов осуществлялось согласно последним клиническим рекомендациям. Статистический анализ проводили с помощью программного пакета StatSoft Statistica 13.

Результаты. Методом факторного анализа изученные гены сгруппированы в 4 фактора в зависимости от величин экспрессии и закономерностей содружественного изменения уровней экспрессии. В дальнейшем 172 образца ткани опухоли согласно молекулярному профилю были распределены по факторам. Статистически достоверно группы не отличались по полу, возрасту, стадии заболевания. Вместе с тем наибольшее количество образцов попало во 2-й фактор (условно-канонический) — 65 образцов (37,79 %). В 1-й фактор (условно-иммунный) — 32 образца (18,6 %). В 3-й и 4-й (метаболический и мезенхимальный) — 35 и 40 образцов (20,35 и 23,26 % соответственно). При анализе полученных данных отмечено, что в большей степени полученные результаты соответствовали существующим молекулярным фенотипам КРР. Прогрессирование заболевания наступило у 35 пациентов (20,35 %). При этом наихудший прогноз наблюдался в 4-м факторе, где прогрессирование наступило у 21 (52,5 %) пациента, тогда как в 1, 2 и 3-м — не более чем у 12 %.

Заключение. В формировании наиболее агрессивного фенотипа опухоли при КРР (мезенхимальном,

или 4-м), по результатам исследования, участвуют гены *MYC*, *CCND1*, *CD68*, *P16*, *MMP11*, *MMP7*, *MMP8*, *IL-8*, *VEGFA121*, *LIFR*. Данная группа генов так или иначе коррелирует с высокой инвазивностью и метастатическим потенциалом опухоли. Таким образом, исследование уровня экспрессии перечисленных генов в ткани опухоли может стать базой для формирования группы пациентов неблагоприятного прогноза течения КРР.

Спектр мутаций в гене *NF1* у детей с нейрофиброматозом и опухолями головного мозга

Т.С. Лисица^{1,2}, Т.В. Наседкина^{1,3}, Е.В. Жуковская³

¹ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

²ГБУЗ «МКНЦ им. А.С. Логинова ДЗМ», Москва;

³ЛРНЦ «Русское поле» ФГБУ «НМИЦ ДГОИ
им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Введение. Нейрофиброматоз 1-го типа является заболеванием с аутосомно-доминантным типом наследования, вызванным мутацией в гене нейрофибрина (*NF1*). Около 50 % пациентов с нейрофиброматозом не имеют отягощенного семейного анамнеза, при этом заболевание возникает в результате *de novo* мутации *NF1*. Клинические проявления нейрофиброматоза вариабельны. Известно, что у пациентов повышен риск развития плексиформных нейрофибром, глиомы зрительного тракта, вторичных глиом центральной нервной системы, пилоидной астроцитомы, ювенильного хронического миелоидного лейкоза, миелодиспластических синдромов и т.д. Механизмы, лежащие в основе различных проявлений *NF1*, на сегодняшний день недостаточно исследованы. Однако известно, что *NF1*-ассоциированные опухоли имеют свои особенности клинического течения.

Цель исследования — провести поиск герминальных вариантов в гене *NF1* у российских детей с опухолями головного мозга и клиническими проявлениями нейрофиброматоза 1-го типа.

Материалы и методы. Всего в исследовании приняли участие 9 детей от 5 до 16 лет (4 мальчика и 5 девочек), находившихся на реабилитации в ЛРНЦ «Русское поле» в период с августа 2017 г. по март 2019 г. У 3 пациентов была диагностирована пилоидная астроцитома, у 3 пациентов — глиома хиазмально-селлярной области, у 1 пациента — пиломиксоидная астроцитома, у 1 пациента — краниофарингиома, у 1 пациента — опухоль ствола головного мозга. Семейный анамнез 1 пациентки был отягощен нейрофиброматозом 1-го типа у матери.

ДНК пациентов выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора QIAamp DNA Blood Mini Kit согласно инструкции производителя. Анализ ДНК проводили методом массового параллельного

секвенирования (next generation sequencing, NGS) на платформе MiSeq Illumina. Для пробоподготовки была использована методика гибридизационного обогащения с применением зондов NimbleGen (Roche).

Результаты. Всего было выявлено 6 вариантов в гене *NF1* — 3 делеции со сдвигом рамки считывания, 2 несинонимичных замены, 1 замена, приводящая к формированию стоп-кодона. Результаты исследования были валидированы секвенированием по Сэнгеру. В 1 семье проведен сегрегационный анализ. У 3 пациентов с клиническими признаками нейрофиброматоза и отсутствием точечных мутаций в гене *NF1* был проведен поиск делеции дупликаций методом MLPA.

Закключение. Мутации в гене *NF1* имеют значительный плеiotропный эффект. Молекулярная верификация диагноза нейрофиброматоза 1-го типа является важным шагом на пути персонализированного подхода к диагностике и лечению опухолей центральной нервной системы у данной группы пациентов. Кроме того, ингибиторы MEK, которые действуют на пути RAS/MAPK, продолжают изучаться как рациональные мишени для таргетного лечения *NF1*-ассоциированных опухолей центральной нервной системы.

Молекулярные маркеры и факторы прогноза светлоклеточного рака почки

Н.Н. Мазуренко¹, Д.М. Максимович¹, С.Д. Бежанова¹,
В.В. Стрельников², И.В. Цыганова¹, Т.Ф. Маливанова¹,
А.В. Балбуцкий¹, В.А. Драудин¹, О.В. Шаньгина¹,
А.Ф. Мукерия¹, В.Б. Матвеев¹, Д.Г. Заридзе¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр
им. Н.П. Бочкова», Москва

Введение. Спорадический светлоклеточный ПКР (скПКР) — наиболее распространенный подтип рака почки, заболеваемость которым постоянно растет. Для скПКР характерен особый спектр генетических нарушений, наиболее часто изменены гены, расположенные на 3p21-p25 (*VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*). Важную роль в канцерогенезе скПКР играет активация PI3K-сигнального пути, приводящая к нарушению апоптоза.

Цель исследования — изучение влияния генетических нарушений, экспрессии белковых продуктов и курения на продолжительность жизни пациентов с скПКР.

Материалы и методы. Мутации *VHL* выявляли секвенированием по Сэнгеру в 92 образцах опухолевой ДНК. Для 61 скПКР провели NGS-анализ 100 экзонов *VHL*, *PBRM1*, *BAP1*, *SETD2*, *KDM5C*, *PTEN*. Экспрессию генов в 138 скПКР оценивали ИГХ-методом с антителами к *PBRM1* (GeneTex 32464) и *BAP1* (Santa-Cruz Biotechnology sc-28383 C-4), общую 5-летнюю выживаемость оценивали по методу Каплана–Майера. Для сравнения

10-летней выживаемости пациентов с различной экспрессией белков использовали *long-rank*-тест.

Результаты. В ДНК скПКР обнаружены мутации *VHL* (77 %), *PBRM1* (26 %), *BAP1* (20 %), *SETD2* (16 %), *KDM5C* (15 %), *PTEN* (6 %). Выживаемость пациентов не зависела от нарушений *VHL*, *SETD2* или *KDM5C*. Курение не влияло на выживаемость пациентов с скПКР с мутацией *VHL*, но снижало выживаемость больных с диким типом *VHL*. Наихудшая выживаемость отмечена у пациентов с мутацией *PTEN* ($p = 0,001$), что подчеркивает важность инактивации этого гена-супрессора для развития скПКР. Мутации *BAP1* и отсутствие ядерной экспрессии *BAP1* негативно влияли на больных скПКР, причем курение ухудшало выживаемость ($p = 0,03$). Не выявлено связи между мутационным статусом *PBRM1* и общей выживаемостью пациентов с скПКР, а наличие диффузной (но не фокальной) ядерной экспрессии белка *PBRM1* коррелировало с лучшей 10-летней выживаемостью ($p = 0,001$). У больных скПКР I–II стадий с ядерной экспрессией *PBRM1* наблюдалась 100 % 5-летняя выживаемость.

Закключение. Мутации *PTEN* и *BAP1* снижают выживаемость пациентов с скПКР. Показано негативное влияние курения на выживаемость пациентов с различным мутантным статусом. Прогностическое значение может иметь определение ядерной экспрессии *PBRM1*, поскольку ее отсутствие характерно для агрессивной формы скПКР и низкой выживаемости пациентов, а простота и доступность метода позволяют широко использовать его в клинической практике.

Новые данные о прогностическом значении экспрессии гена *PRAME* у больных злокачественными лимфомами

В.А. Мисюрин¹, А.Е. Мисюрина², Н.А. Лыжко¹,
Ю.П. Финашутин¹, Д.С. Марьин², Е.С. Нестерова²,
Л.Г. Горенкова², Л.В. Пластинина², Е.А. Пенская²,
М.А. Барышникова¹, С.К. Кравченко², А.В. Мисюрин³

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва;
³ООО «ГеноТехнология», Москва

Введение. Активность гена *PRAME* в опухолевых клетках связана с ухудшением параметров выживаемости при множестве онкологических и онкогематологических заболеваний. При злокачественных лимфомах активность *PRAME* ранее наблюдалась в единичных исследованных случаях, но ее значение остается неизвестным.

Цель исследования — определить прогностическую значимость экспрессии гена *PRAME* у больных В-клеточными лимфомами на примере фолликулярной

лимфомы (ФЛ) и больных Т-клеточными лимфомами (Т-кЛ).

Материалы и методы. Исследовали образцы опухоли 34 больных ФЛ и 35 больных Т-кЛ, в которых оценивали уровень экспрессии гена *PRAME*. Исследовалась связь уровня экспрессии *PRAME* с параметрами выживаемости данных больных. Проводилось сопоставление уровня экспрессии гена *PRAME* и клинико-лабораторных признаков, используемых для расчетов прогностических индексов FLIPI-1 и FLIPI-2 у больных ФЛ, а также с эффективностью выполнения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) у больных Т-кЛ.

Результаты. Высокий уровень экспрессии *PRAME* коррелирует с большей активностью Ki-67 ($p = 0,043$), более высокой степенью распространенности опухоли ($p = 0,04$) и значимым ухудшением параметров бессобытийной выживаемости больных ФЛ ($p = 0,04$). Установлено, что у больных ФЛ высокий уровень экспрессии гена *PRAME* в опухолевых клетках имеет отрицательное прогностическое значение, но только при наличии параметров, определяющих высокий риск по FLIPI-1 и FLIPI-2. При Т-кЛ гиперэкспрессия *PRAME* связана с более распространенными стадиями заболевания ($p = 0,07$), поражением костного мозга ($p = 0,03$), опухолевым лейкоцитозом ($p = 0,02$) и высоким уровнем экспрессии Ki-67 ($p = 0,0155$). Общая выживаемость больных Т-кЛ после проведения ТГСК в случае экспрессии *PRAME* ухудшалась.

Заключение. Активность гена *PRAME* ухудшает прогноз у больных ФЛ и Т-кЛ, в том числе результаты проведения ТГСК при Т-кЛ. Сопоставление уровня экспрессии *PRAME* и индексов FLIPI-1 и FLIPI-2 позволяет точнее рассчитать риск ранней летальности у больных ФЛ.

Герминальные мутации в гене *APC* среди пациентов со спорадическими десмоидными опухолями: особенности фенотипа

Т.А. Музаффарова¹, О.В. Новикова², И.Ю. Сачков³,
Ф.М. Кипкеева¹, Е.К. Гинтер¹, А.В. Карпухин¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им.
Н.П. Бочкова», Москва;

²МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ
радиологии» Минздрава России, Москва;

³ФГБНУ «ГНЦ колопроктологии им. А.Н. Рыжих», Москва

Десмоидные опухоли (ДО) — редкие опухоли мезенхимальной природы. ДО не метастазируют, но характеризуются непредсказуемой прогрессией и высоким риском рецидивов (25–65 %). Эти опухоли могут как возникать спорадически, так и быть связаны с семейным аденоматозным полипозом (САП).

Генетические причины спорадических ДО и их связь с клиническими проявлениями этого заболевания в настоящее время не изучены. Поскольку ДО с высокой частотой возникают при САП, который, в свою очередь, является следствием мутаций в гене *APC*, естественным кандидатом, обуславливающим предрасположенность и к спорадическим случаям десмоидных фибром, выступает ген *APC*.

Изучена выборка пациентов со спорадическими случаями ДО (51 человек). ДНК, выделенная из лимфоцитов крови, была исследована на наличие мутаций в гене *APC* методом ПЦР и конформационно-чувствительного электрофореза с последующим секвенированием по Сэнгеру. Впервые охарактеризована частота герминальных мутаций в гене *APC* при спорадических случаях ДО: мутации выявлены в 6 случаях (12 %). Для пациентов с мутацией в гене *APC* характерны ранняя манифестация, мультифокальный рост ДО, тяжелое течение заболевания. Средний возраст начала заболевания ДО у пациентов с мутацией в гене *APC* составлял 5,8 года, в то время как у пациентов без мутаций он составлял 19 лет ($p = 0,02$). В группе пациентов со спорадическими ДО выявленные мутации локализовались в области 3'-конца гена *APC*. Для сравнения исследованы мутации в гене *APC* и клинические характеристики ДО при САП. У пациентов с САП при мутации в гене *APC* ДО развивались позже, чем у пациентов из группы спорадических ДО, также имевших мутацию в гене *APC* ($p = 0,004$). У пациентов с САП не было выявлено случаев множественных ДО, в то время как из 6 случаев с мутациями среди пациентов со спорадическими ДО у 5 больных наблюдались множественные ДО ($p = 0,01$). Следовательно, спорадический десмоидный фиброматоз и фиброматоз, ассоциированный с САП, различаются фенотипически среди пациентов с мутациями в гене *APC*.

Таким образом, впервые среди спорадических ДО охарактеризован подтип с молекулярно-генетическими и фенотипическими особенностями. Эта информация может быть полезна для выбора тактики лечения таких больных и мер профилактики полипоза, а также открывает возможности изучения механизмов, приводящих к развитию мультифокальных десмоидных фибром, но не САП.

Определение молекулярных подтипов рака молочной железы на основе анализа репертуара циркулирующих антител с помощью пептидных микрочипов

С.В. Подлесных¹, Е.А. Колосова^{1,2}, Д.Н. Щербаков^{1,2},
Я.Н. Шойхет³, А.Ф. Лазарев³, И.В. Вихлянов⁴,
Т.В. Синкина⁴, С.А. Джонстон⁵, А.А. Ильичев^{1,2},
А.И. Шаповал^{1,5}

¹РАПЦ ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, Барнаул;

²ФБУН «ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская обл.;

³ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, Барнаул;

⁴ГБУЗ АО «Алтайский краевой онкологический диспансер», Барнаул;

⁵Центр инноваций в медицине, Институт биодизайна, Университет штата Аризона, США

Изменения в репертуаре циркулирующих антител являются перспективным биомаркером различных заболеваний. Нами разработаны микрочипы, содержащие более 330 тыс. пептидов со случайными аминокислотными последовательностями, которые позволяют исследовать весь репертуар циркулирующих антител. Наши исследования показали, что в крови пациентов с диагнозом РМЖ содержатся антитела, комплементарные определенным пептидам, представленным на микрочипах. Более того, антитела плазмы крови пациентов с различными молекулярными подтипами РМЖ (люминальный А, люминальный В и базальноподобный) взаимодействуют с различными, но перекрывающимися панелями пептидов. Всего выявлено 634 пептида, взаимодействие циркулирующих антител с которыми характеризует различные подтипы РМЖ. Панели пептидов, специфически взаимодействующих с плазмой крови пациентов, могут служить основой для создания неинвазивных диагностических тест-систем. В то же время микрочипы, содержащие тысячи пептидов, могут быть использованы для скрининга групп риска различных заболеваний и «молекулярной диспансеризации» населения. Возможность одновременной идентификации различных заболеваний с помощью анализа репертуара циркулирующих антител (биомаркер) делает технологию пептидных микрочипов одной из самых перспективных и востребованных для совершенствования иммунодиагностики.

Таким образом, пептидные микрочипы могут быть использованы для создания нового инструмента для изучения репертуара циркулирующих антител в норме и при патологии, а также для исследования и оценки белок-белковых взаимодействий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 17-04-00321/19 и 17-54-33003/18) и в рамках государственного задания Минобрнауки России (№ 6.3892.2017/4.6).

Простатический специфический антиген в сыворотке крови женщин, в том числе больных раком молочной железы

Н.С. Сергеева^{1,2}, И.И. Алентов¹, Д.Р. Ортабаева¹,
Н.В. Маршуткина¹, А.Д. Зикиряходжаев¹

¹МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Введение. Простатический специфический антиген (ПСА), несмотря на свое название, уже давно не считается специфичным для предстательной железы антигеном. Так, он был выявлен и у женщин, причем основной вклад в его содержание в сыворотке крови (СК) вносит молочная железа. Усиление его синтеза наблюдается в фолликулиновой фазе менструального цикла, при приеме гормональных контрацептивов, при беременности и лактации.

В ряде исследований показано, что у женщин ПСА — маркер андрогенной активности, активирующийся при гиперандрогении и снижающийся при антиандрогенной терапии.

В отдельных исследованиях показано, что ПСА может повышаться в СК женщин с доброкачественными и злокачественными процессами в молочной железе, причем его уровни на ранних стадиях РМЖ выше, чем на поздних. В отдельных работах приводятся данные о том, что доминирующей при РМЖ (в отличие от доноров) является фракция свободного ПСА. Наиболее значительные различия в ПСА у доноров и больных РМЖ представлены в публикациях из стран Ближнего Востока.

Цель исследования — анализ уровней ПСА у больных РМЖ разных возрастных и клинических групп.

Материалы и методы. Уровни ПСА оценили в СК 25 условно здоровых женщин и 99 больных РМЖ. ПСА исследовали иммунохемилюминесцентным методом на анализаторе ARCHITECT i1000 SR (Abbott, США).

Результаты. Выявлены случаи (не более 15 %) существенно отличающихся от средних концентраций ПСА при РМЖ. Наиболее высокий уровень ПСА был у пациентки с BRCA-положительным раком. Концентрации ПСА в младшей возрастной группе (моложе 45 лет) оказались достоверно выше как у доноров, так и у больных РМЖ. С возрастом средние значения ПСА сходным образом снижались как у доноров, так и у больных РМЖ.

Заключение. В популяции российских женщин ПСА сравнительно редко повышается при развитии злокачественного новообразования в молочной железе. Дальнейшие исследования позволят установить, можно ли использовать оценку ПСА в СК при РМЖ для отбора пациенток для антиандрогенной терапии.

Постеры

Протеины супернатантов иммунокомпетентных клеток крови и биоптатов при злокачественных и доброкачественных заболеваниях молочной железы

А.В. Бернадо, А.А. Студеникина

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск

Введение. Белки, выделяемые опухолевыми клетками, попадая в кровь, могут быть биомаркерами заболеваний. В нашей работе изучены концентрации 8 протеинов: PgR, ЭРα, Е-кадгерина (CDH1), гисти-динбогатого гликопротеина (HRGP), ингибитора активатора плазминогена 1, белка теплового шока 90αA1, муцина 1 и ИЛ-12.

Цель исследования — сравнение концентрации исследуемых протеинов в супернатантах клеток крови и биоптатов при инвазивной карциноме неспецифического типа (ИКНТ) и незлокачественных заболеваниях молочной железы (НЗМЖ) при влиянии на них поликлонального активатора (ПА).

Материалы и методы. Материалом служили кровь и биоптаты молочной железы 35 пациентов. Из них 23 — с ИКНТ, 12 — с НЗМЖ. Для определения спонтанной продукции (СП) протеина иммунокомпетентными клетками крови (ИКК) и биоптатом их инкубировали в питательной среде DMEM-F12, а для определения индуцированной продукции (ИП) другую часть биоптата — в таком же объеме среды с комплексом ПА (Вектор-Бест, Россия), после чего клетки осаждали и получали супернатант. Концентрации протеинов в супернатантах определяли ИФА-анализом с использованием наборов производства Cloud-Clone Corp. (США). Индекс влияния ПА на продукцию протеинов биоптатами опухолей высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А — концентрация при ИП, а Б — концентрация при СП. Статистическую обработку выполняли при помощи Statistica V6.0.

Результаты. Группы пациентов с ИКНТ и НЗМЖ сравнивали по 4 показателям для каждого протеина: концентрация в супернатанте ИКК, концентрация в супернатанте протеина при СП и ИП биоптатами, а также по ИВПА на продукцию протеина биоптатами:

1) при сравнении концентрации протеинов в супернатанте ИКК статистически более высокие концентрации HRGP наблюдались у пациентов с ИКНТ ($p = 0,004$) по сравнению с НЗМЖ;

2) при сравнении концентрации протеинов при СП биоптатами статистически значимо выше была

концентрация ИЛ-12 у пациентов с ИКНТ ($p = 0,039$) по сравнению с НЗМЖ;

3) при сравнении концентрации протеинов при ИП биоптатами статистически значимо выше была концентрация PgR при НЗМЖ ($p = 0,01$) по сравнению с ИКНТ;

4) при сравнении ИВПА на продукции протеинов биоптатами статистически более высокие значения ИВПА на продукцию CDH1 наблюдались у пациентов с НЗМЖ ($p = 0,029$) по сравнению с ИКНТ.

Заключение. Таким образом, результаты исследования перечисленных выше протеинов могут иметь диагностическую и прогностическую ценность при заболеваниях молочной железы.

Разработка молекулярно-генетического метода дифференциальной диагностики острых лейкозов неоднозначного происхождения

Ю.А. Веряскина^{1,2}, С.Е. Титов^{2,3}, И.Б. Ковынев⁴,
Т.И. Поспелова⁴, И.Ф. Жимулев²

¹ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск;

²ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», Новосибирск;

³АО «Вектор-Бест», Новосибирск;

⁴ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск

Анализ иммунологических маркеров позволяет дифференцировать острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ) и острые миелобластные лейкозы (ОМЛ). Однако практически существует группа опухолей, характеризующаяся наличием как лимфоидных, так и миелоидных молекулярных маркеров, а также подгруппа бластных опухолей с наличием признаков вторичной миелодисплазии, аберрантного иммунофенотипа и множественных цитогенетических аномалий. Прогноз для этой группы пациентов значительно хуже, чем для классических вариантов лейкозов, ввиду отсутствия эффективных схем лечения. Принципиальные различия в терапии между ОЛЛ и ОМЛ обуславливают необходимость разработки дополнительных молекулярных методов дифференциальной диагностики острых лейкозов (ОЛ). Хорошо известно, что генетические изменения составляют основу этиологии ОЛ. Однако в онкогенезе участвуют не только генетические, но и эпигенетические модификации. МикроРНК

(миРНК) регулируют как нормальный гемопоэз, так и развитие неоплазии. Одним из перспективных направлений онкодиагностики является разработка диагностических панелей на основе профилей экспрессии миРНК. В качестве материала для исследования использованы препараты костного мозга, полученные от пациентов с верифицированными диагнозами ОМЛ ($n = 50$) и ОЛЛ ($n = 25$), а также от больных с недифференцированными, мультилинейными и бифенотипическими вариантами ОЛ ($n = 50$). Выделение нуклеиновых кислот из клинических образцов, полученных экстракцией материала мазков костного мозга, нанесенного на цитологические стекла, проводилось с использованием набора реагентов «РеалБест экстракция 100» (Вектор-Бест, Россия). Анализ уровней экспрессии миРНК проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Статистическая обработка данных выполнена с использованием непараметрического коэффициента Манна—Уитни, критический уровень значимости был принят равным 0,05. В результате исследования получены данные статистически достоверных различий относительных уровней экспрессии миРНК-128, -150, -196b, -210 и -26a между группами ОЛЛ и ОМЛ. Сравнительный анализ профилей экспрессии миРНК позволил выделить миРНК-150, -223, -221 и -451 в качестве молекулярных маркеров, позволяющих статистически достоверно дифференцировать ОЛ с преимущественно миелоидной либо лимфоидной дифференцировкой бластных клеток. Таким образом, мы предполагаем, что дифференциальная диагностика ОЛЛ от ОМЛ в случае неспецифических иммунофенотипических и цитогенетических характеристик бластных клеток на основе профилей экспрессии миРНК позволит повысить точность и информативность диагностики ОЛ неоднозначного происхождения и, следовательно, повысить эффективность проводимой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-34-60024).

Методика выделения циркулирующих опухолевых клеток из образцов в периферической крови больных диссеминированным немелкоклеточным раком легкого

А.Б. Воловецкий¹, П.А. Малинина², А.В. Масленникова^{2,3}

¹ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

³ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород

Введение. Изучение молекулярно-генетических характеристик циркулирующих опухолевых клеток

(ЦОК) является на сегодняшний день одним из наиболее перспективных подходов к реализации персонализированного подхода к лечению больных злокачественными новообразованиями. Его внедрению в клинику препятствует отсутствие технологии, позволяющей в условиях рутинной лабораторной практики проводить выделение и характеризацию ЦОК, а также наличие противоречивых данных относительно их предиктивной и прогностической роли у онкологических больных.

Цель исследования — отработка методики сепарации ЦОК из образцов крови пациентов с использованием микрофлюидной технологии, а также апробация методики характеристики опухолевых клеток.

Материалы и методы. Для исследования использовалась периферическая кровь (9–10 мл) 10 пациентов с диссеминированным НМРЛ. Кровь больных лизировали буфером (MACS® Separation Buffer, Miltenyi Biotec) в соотношении кровь: буфер как 1: 3 и центрифугировали с сохранением осадка. Далее осадок разбавляли раствором PBS и сепарировали полученную суспензию с помощью спирального микрофлюидного чипа из силикона. Обогащенную ЦОК суспензию с использованием цитоцентрифуги (500g, 9 мин) наносили на предметное стекло для окраски в модификации Романовского. В другом случае обогащенную ЦОК суспензию окрашивали флуоресцентными антителами (Anti-Cytokeratin (CK3-6H5) — FITC и CD45 — APC, Miltenyi Biotec).

Результаты. Данная методика позволяет эффективно выделять ЦОК из периферической крови больных. Изучение препаратов крови показало, что данные клетки (ЦОК) легко идентифицируются при использовании как классического метода окраски (по Романовскому), так и иммуноцитохимического метода, позволяющего более точно выявить их природу.

Заключение. Дальнейшее исследование будет направлено на усовершенствование технологии иммуноцитохимического окрашивания ЦОК, а также разработку и апробацию методики выделения опухолевой ДНК из ЦОК с помощью ПЦР.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-34-60034).

Мутации генов PTEN, RAD51D, MSH6 и ATM у пациенток монголоидного происхождения с диагнозом рака молочной железы

П.А. Гервас, А.Ю. Молоков, А.А. Щеголева, Н.В. Чердынцева

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

В настоящее время к числу РМЖ-ассоциированных генов относят *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *NBS1*, *p53*, *ATM*

и др., наследственные мутации в которых драматически повышают вероятность развития заболевания до 85–100 %. Для монголоидного населения Российской Федерации (буряты, якуты, алтайцы, тувинцы, хакасы и др.) мутации генов, обуславливающие риск развития наследственных форм РМЖ, остаются неизученными. Методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) были проанализированы лейкоциты периферической крови 63 пациенток монголоидного происхождения с признаками наследственного РМЖ (тувинки, бурятки и др.). Для подготовки библиотек использовали набор Hereditary Cancer Solution™ (SOPHiA GENETICS, Швейцария) с целью обогащения 27 генов, ассоциированных с наследственными онкологическими синдромами. Секвенирование выполнялось на платформе NextSeq500 (Illumina, США).

Различные молекулярно-генетические нарушения (32 SNV, 5 Indel и 21 ранее не описанный вариант в dbSNP) были найдены по результатам анализа данных NGS среди 63 неродственных пациенток монголоидного происхождения с признаками наследственного РМЖ. Впервые у пациенток бурятской национальности с РМЖ в возрасте до 50 лет в генах *PTEN* и *RAD51D* найдены клинически значимые мутации (highly pathogenic). Также впервые у тувинок с диагнозом РМЖ в возрасте до 50 лет впервые найдены клинически значимые (highly pathogenic) мутации генов *MSH6* и *ATM*. Таким образом, нами впервые выявлены молекулярно-генетические нарушения генов (*PTEN*, *RAD51D*, *MSH6* и *ATM*), ассоциированные с наследственными формами РМЖ у пациенток монголоидного происхождения. Мутации генов *PTEN*, *RAD51D*, *MSH6* и *ATM* будут протестированы на расширенной выборке пациенток с наследственными формами РМЖ монголоидного происхождения, а также на здоровых добровольцах, что, вероятно, позволит в дальнейшем разработать стратегии по ранней диагностике и профилактике наследственных форм РМЖ у вышеперечисленных этносов РФ.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (проект № 18-29-09046).*

Ассоциация молекулярно-генетических маркеров генов репарации ДНК и контроля клеточного цикла с длительностью времени без прогрессирования рака яичников после платиносодержащей химиотерапии

Т.М. Заварыкина¹, А.С. Тюляндина², С.В. Хохлова³,
Г.Н. Хабас³, А.В. Асатурова³, П.К. Бреннер¹,
М.А. Капралова^{1,4}, Ю.А. Носова³, М.В. Аткарская¹,
Д.С. Ходырев⁵, А.М. Бурденный^{1,6}, В.И. Логинов⁶,
М.Б. Стенина², Г.Т. Сухих³

¹ФГБУН «Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

³ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии
им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва;

⁴ФГБОУ ВО «МГАВМиБ — МВА им. К.И. Скрябина», Москва;

⁵ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий ФМБА России, Москва;

⁶ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва

Рак яичника является одним из наиболее распространенных заболеваний в онкогинекологии, он занимает 2-е место по заболеваемости и 1-е — по смертности. Производные платины, являющиеся основным химиотерапевтическим препаратом при лечении РЯ, сочетают высокую эффективность и столь же высокую токсичность, поэтому поиск маркеров чувствительности к платиносодержащей ХТ является важной задачей.

Цель исследования — изучение связи полиморфных маркеров генов контроля клеточного цикла (Arg72Pro гена *TP53*, T(-410)G гена *MDM2* и Ser31Arg гена *CDKN1A*) и репарации ДНК (Gln399Arg гена *XRCC1*, Lys751Gln гена *ERCC2*) при РЯ с длительностью времени без прогрессирования (ВБП) после платиносодержащей ХТ. Известно, что ВБП является суррогатным клиническим маркером эффективности платиносодержащей ХТ.

Были изучены образцы опухолевой ткани 50 больных РЯ. Забор образцов проводился до начала ХТ при первичной циторедуктивной операции, после чего больные получили стандартную ХТ на основе препаратов платины в комбинации с паклитакселом. Далее больные наблюдались до прогрессирования заболевания. Полиморфные маркеры генов были исследованы методом ПЦР-ПДРФ с подтверждением результата методом ПЦР в реальном времени и последующим анализом кривых плавления. Результаты определения маркеров были сопоставлены с длительностью ВБП методом Каплана—Майера.

Обнаружена тенденция к увеличению медианы ВБП при носительстве аллеля Gln маркера Gln399Arg

XRCC1 ($p = 0,06$), а также к уменьшению медианы ВБП при носительстве аллеля G маркера T(-410)G MDM2 ($p = 0,06$). Для маркера гена TP53 обнаружен тренд к увеличению медианы ВБП для носителей аллеля Pro ($p = 0,15$), при этом у носителей минорной гомозиготы Pro/Pro рецидивов заболевания зафиксировано не было (4 человека).

В подгруппе больных, которым была проведена оптимальная циторедуктивная операция, носительство минорного аллеля Arg маркера Ser31Arg гена CDKN1A ассоциировалось с уменьшением медианы ВБП ($p = 0,004$).

Таким образом, в нашем исследовании выявлена связь полиморфных маркеров генов CDKN1A, XRCC1, MDM2 и TP53 с продолжительностью ВБП при РЯ. Это говорит о целесообразности дальнейшего изучения связи данных маркеров с длительностью ремиссии после платиносодержащей ХТ РЯ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-08-01258).

Идентификация и выделение опухолевых Т-лимфоцитов к меланоме B16F0

А.В. Изосимова¹, Д.В. Южакова¹, Л.Н. Барбашова¹, Г.В. Шаронов^{1,2}, Е.В. Загайнова¹, Д.М. Чудаков^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Клеточная иммунотерапия является одним из перспективных современных подходов к лечению опухолей. Ключевым этапом терапии является получение опухолевых Т-лимфоцитов, нацеленных уничтожать конкретную опухоль.

Цель исследования — идентификация и выделение опухолевых Т-лимфоцитов к меланоме B16F0.

Эксперименты проводились на мышах C57BL/6 с подкожной моделью мышинной меланомы B16F0. Т-лимфоциты получали из опухолевых узлов либо из селезенки методом магнитной сепарации. Опухолевую специфичность Т-лимфоцитов оценивали по их активации на основе продукции IFN γ методом внутриклеточного окрашивания фиксированных клеток либо путем анализа репертуара живых IFN γ -секретирующих клеток после их сортировки с помощью клеточного сортера FACSAria III.

Для получения опухолевых Т-лимфоцитов мы выделяли опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты и сортировали живые активированные IFN γ + Т-клетки для дальнейшего биоинформатического анализа репертуаров их Т-клеточных рецепторов. С помощью нового алгоритма в IFN γ + фракции удалось

выявить кластеры Т-клеточных рецепторов. Внутри кластера клоны имеют похожую последовательность гипервариабельного участка и предположительно распознают один антиген. Мы предполагаем, что данные кластеры могут быть обогащены опухолевоспецифичными Т-лимфоцитами. Для проверки и расширения этих данных была проведена *in vitro* стимуляция Т-клеток из селезенки мышей с противоопухолевым иммунитетом путем сокультивирования их с дендритными клетками, нагруженными опухолевым лизатом либо пептидными неоантигенами меланомы. После оптимизации протокола, включающего дополнительную иммунизацию мышей, увеличение времени сокультивирования и иммуногенности лизата, мы достоверно зарегистрировали 1 % B16F0-специфичных Т-лимфоцитов. В будущем планируется создание базы данных Т-клеточных рецепторов, распознающих конкретные антигены меланомы B16, нового и информативного инструмента для анализа противоопухолевого иммунитета.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Российской Федерации (грант № 14.W03.31.0005).

Идентификация потенциальных маркеров агрессивного фенотипа клеток мультиформной глиобластомы после действия гипоксии

Т.И. Кушнир, И.А. Кудрявцев, Н.Е. Арноцкая, В.Е. Шевченко

НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Несмотря на прогресс в лечении многих видов рака, прогноз для больных мультиформной глиобластомой (МГБ) — один из самых неблагоприятных в онкологии. Неэффективность существующих методов лечения связывают с гетерогенностью раковых клеток (РК) и наличием в клеточной популяции раковых стволовых клеток (РСК). МГБ развивается на фоне сильной гипоксии, играющей важную роль в патогенезе заболевания и тесно связанной с ростом, развитием опухоли и плохим прогнозом. Гипоксия усиливает пролиферацию РК, их инвазивный потенциал, стимулирует ангиогенез, ингибирует дифференцировку РСК. Гипоксия повышает резистентность РК к лучевой терапии и ХТ, способствует возникновению агрессивного фенотипа РСК, приводящего к рецидиву заболевания. В связи с этим актуальным становится идентификация потенциальных биомаркеров гипоксического фенотипа клеток МГБ, которые могли бы использоваться для персонального контроля и повышения эффективности терапии МГБ.

Цель исследования — идентифицировать потенциальные маркеры агрессивного гипоксического фенотипа клеток МГБ.

Материалы и методы. Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения исследовали секретомы клеточной линии U-251 МГБ, культивируемой в условиях гипоксии и нормоксии.

Результаты. Среди 1342 идентифицированных протеинов 151 увеличивал экспрессию более чем в 2 раза ($p < 0,05$) после действия гипоксии и считался дифференциально экспрессированным белком. Изучение *in silico* механизмов секреции показало, что по классическому типу секретировалось 20, по неклассическому — 27, по другому механизму — 57, интегрированными в цитоплазматическую мембрану были 6 протеинов. В составе экзосом секретировались 57 белков. Для отбора потенциальных маркеров провели анализ данных «Атласа протеома человека» (HPA), базы протеома плазмы крови человека (HPP) и данных литературы по протеому ликвора. В результате были отобраны 10 протеинов (S100A6, BAG6, ATP11A, S100A4, BAZ2B, PSMA1, ZEB2, ANXA5, RASGRF2, STIP1), которые имели повышенную экспрессию в опухолевой ткани и определялись в плазме и/или ликворе.

Заключение. Обнаружены значительные изменения в метаболических процессах клеток U251 после действия гипоксии. Предварительная валидация 10 ДЭГ, по данным базы TCGA (200 больных), показала корреляцию высоких уровней их экспрессии с плохим прогнозом для больных разными подтипами МГБ.

Гиперметилирование генов микроРНК и группы генов апоптоза: комбинации маркеров для диагностики рака молочной железы, включая ранние стадии

В.И. Логинов^{1,2}, И.В. Пронина¹, А.М. Бурденный¹,
Е.А. Филиппова¹, Т.П. Казубская³, Д.С. Ходырев⁴,
Э.А. Брага^{1,2}

¹ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр
им. Н.П. Бочкова», Москва;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

⁴ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий ФМБА России, Москва

Ранее мы обнаружили aberrантное метилирование группы генов микроРНК в опухолях яичников и молочной железы, а также потенциальную возможность использования гиперметилированных генов микроРНК для диагностики РЯ. В данной работе исследован диагностический потенциал группы гиперметируемых генов микроРНК и проапоптотических генов

на представительной выборке из 70 образцов РМЖ и 17 образцов тканей молочной железы — доноров, умерших от неонкологических заболеваний. Методом метилспецифичной ПЦР выявлено значительное повышение частоты метилирования в опухоли против парной нормы для 7 генов микроРНК: *MIR-124-1*, *-125b-1*, *-129-2*, *-132*, *-148a*, *-34b/c*, *-9-3* (36–76 % против 6–27 %) и 5 белок-кодирующих генов: *RASSF1A*, *APAF1*, *BAX*, *BIM/BCL2L11*, *DAPK1* (34–61 % против 4–24 %). На выборке из 38 образцов РМЖ методом количественной ОТ-ПЦР показано снижение уровней экспрессии этих генов и выявлена корреляция снижения с их гиперметилированием, что подтверждает функциональное значение метилирования и возможность его применения в качестве диагностического теста. Анализ выборки из 46 образцов от пациенток на I и II клинических стадиях с помощью ROC-анализа позволил составить две системы маркеров на основе микроРНК (*MIR-124-1*, *-125b-1*, *-129-2*, *-132/-148a*, *-34b/c*, *-9-3*), которые позволяют выявлять РМЖ на I–II стадиях с высокой чувствительностью (89 и 91 %) и специфичностью (88 %) при AUC = 0,92–0,93. Наилучших результатов достигли при комбинации 4 генов апоптоза (*APAF1*, *BAX*, *BIM/BCL2L11*, *DAPK1*) и гена *MIR-125b-1*, а именно методом ROC-анализа составлена высокоэффективная 5-маркерная система со 100 % специфичностью и 96 % чувствительностью при AUC = 0,98. Система высокостойка для больных РМЖ с I и II клиническими стадиями: специфичность — 100 %, чувствительность — 93,5 %, AUC = 0,97. Обнаружение метилирования хотя бы 1 гена из данных наборов в биопсийном или послеоперационном материале достаточно для отнесения образца к злокачественной опухоли молочной железы. Кроме того, обнаружено, что ген *MIR-127* гиперметилирован только в образцах опухолей от пациенток с метастазами, т.е. он представляет собой потенциальный высокоспецифичный маркер метастазирования РМЖ. Выявленные особенности метилирования генов микроРНК могут найти применение в разработке подходов к диагностике, прогнозированию и выбору тактики лечения РМЖ.

Новый количественный метод для определения профилей метилирования индивидуальных копий транспозонов L1 в циркулирующей ДНК онкологических больных

И.З. Мамедов^{1,2}, А.Ю. Комков^{1,2}, М.А. Салютин¹,
А.А. Пономарева³, Ю.Б. Лебедев¹, Е.Ю. Рыкова^{4,5},
Т.Л. Ажикина¹

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;

²ЛРНИЦ «Русское поле» ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва;

³НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

⁴ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск;

⁵ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный технический университет», Новосибирск

Онкологические заболевания являются многофакторными: формирование, прогрессия, исход определяются взаимодействием генетических и эпигенетических факторов. Актуальным подходом для диагностики, оптимального выбора и коррекции лечения является анализ циркулирующей ДНК (цирДНК), состав которой отражает процессы, происходящие в клетках опухоли и ее микроокружении. Ранее методом глубокого локус-направленного бисульфитного секвенирования нами получены данные о гипометилировании 1 из 4 семейств L1 ретротранспозонов, «молодого» человека-специфичного семейства L1Ns в цирДНК крови при раке легкого (Gainetdinov и соавт., Lung Cancer 2016).

Для детального количественного описания нами разработан метод определения статуса метилирования отдельных копий L1 в цирДНК. Метод объединяет бисульфитную модификацию цирДНК, ее обогащение целевыми L1-фрагментами и высокопроизводительное секвенирование. Уникальные молекулярные идентификаторы (UMI) вводятся на 1-м этапе подготовки библиотеки и используются для прямого количественного определения метилированных/гипометилированных молекул для каждого отдельного L1. Этот метод был использован для сравнения профилей метилирования набора активных полноразмерных копий L1 в образцах плазмы крови нескольких пациентов с раком легкого и здоровых доноров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 18-29-09124 и 18-315-20038), GACR (грант № 19-11299S) и РНФ (грант № 18-14-00244).

Роль белка p66ShcA в программе эпителиально-мезенхимального перехода в карциномах молочной железы

М.В. Мнихович^{1,2}, Т.В. Безуглова¹, А.Г. Эрзиева³,
Ю.Г. Павлова^{4,5}, И.В. Васин^{4,5}, Камаль Халави Скафи⁶,
С.В. Снегур⁴, В.А. Балаянц², Д.С. Куш², Н.Г. Малюгин²,
А.В. Романов², К.В. Буньков³

¹ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России», Москва;

³ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии», Смоленск;

⁴ГБУ РО «Рязанская областная клиническая больница», Рязань;

⁵ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань;

⁶Медицинский центр «Клалит», Иерусалим, Израиль

Введение. Белок p66Shc в разных видах опухолей может выступать как супрессор и стимулятор канцерогенеза. Он вовлечен в регуляцию отдельных типов клеточной гибели, и его участие в патогенезе злокачественных опухолей не вызывает сомнения.

Цель исследования — изучить экспрессию белка p66Shc в of invasive carcinoma of no special type (IC NST).

Материалы и методы. Исследованы материалы 35 пациенток с IC NST после операции радикальной мастэктомии: 30 пациенток с метастазами в регионарные лимфатические узлы, печень, легкие и головной мозг; 5 пациенток без метастатического поражения. Возраст пациенток — 35–85 лет. Пациентки до операции не получали неоадьювантную терапию. Диаметр опухолевого узла — 0,8–4,0 см. Степень злокачественности IC NST G₂–G₃. Исследование проведено с помощью световой микроскопии и ИГХ-методом с белком p66ShcA (Abcam) и Е-кадгерином (Dako, Lab Vision Flex) с полуквантитативной оценкой.

Результаты. При IC NST с подтвержденными метастазами ($n = 30$) в лимфатические узлы, печень и головной мозг экспрессия белка p66ShcA выше, нежели с РМЖ без метастазов ($n = 5$). В анапластическом компоненте опухоли (зона эпителиально-мезенхимального перехода) выраженность мембранно-цитоплазматической экспрессии составила (+++) в отличие от полей опухоли с более дифференцированным компонентом параллельно с изменением экспрессии Е-кадгерина (снижением изменения экспрессии, вплоть до полного исчезновения).

Заключение. Высокий уровень экспрессии p66Shc коррелирует с неблагоприятным прогнозом при РМЖ, что показано нами в участках инвазивного роста (зоны эпителиально-мезенхимального перехода) при изучении морфогенеза карцином неспецифического типа. Белок p66ShcA — один из первых диагностических биомаркеров для идентификации злокачественных опухолей с неблагоприятным прогнозом и агрессивным течением вне зависимости от молекулярного субтипа.

Сравнительная оценка маркеров стромальной инвазии CD44, тенасцина С и ламинина при фоновых, предраковых процессах и в карциномах молочной железы

М.В. Мнихович^{1,2}, Т.В. Безуглова¹, Н.Г. Малогин², Д.С. Куш²,
Камаль Халави Скафи³, А.Н. Романов², К.В. Буньков⁴

¹ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России,
Москва;

³Медицинский центр «Клалит», Иерусалим, Израиль;

⁴ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии», Смоленск

Введение. Идентификация инвазии в карциномах молочной железы крайне сложна, нужно четко различать железистые структуры с карциномой *in situ*, вовлекающей впоследствии и инвазивные железы.

Цель исследования — попытка оценить возможности применения в качестве маркеров инвазии следующие стромальные белки и молекулы адгезии: CD44, тенаascin С и ламинин.

Материалы и методы. Изучали 15 случаев доброкачественных железистых гиперплазий (фиброзно-кистозная болезнь молочной железы), 25 случаев дисплазий (Ductal intraepithelial neoplasia, DIN) и карцином *in situ* (*In situ* carcinoma DCIS) и 47 — инвазивной карциномы. Проводили ИГХ-исследование с антителами к Е-кадгерину и β-катенину, CD44, ламинину и тенасцину С с полуквантитативной оценкой результатов.

Результаты. В карциномах молочной железы экспрессия тенасцина С верифицировалась исключительно в строме опухоли. Тенаascin-позитивные волокна формировали крупные септы, разделяющие опухоль на отдельные дольки; в толще последних выявлялись волокна, тесно связанные с септами и оплетающие отдельные клетки. Внутри долек и в цитоплазме клеток экспрессия тенасцина не выявлялась. При фоновых и предраковых изменениях молочной железы отмечалась умеренная внеклеточная экспрессия тенасцина с окрашиванием волокон, базальных мембран и стенок сосудов. Ламинин при доброкачественных и предраковых изменениях в молочной железе экспрессировался вдоль базальной мембраны эпителия. В карциномах молочной железы наблюдалась цитоплазматическая экспрессия опухолевыми клетками, расположенными в зоне инвазивного роста. При доброкачественных изменениях в молочной железе наблюдалась гетерогенная мембранная экспрессия CD44. Реакция в клетках стромы отсутствовала. В случае с карциномами молочной железы экспрессию CD44 выявляли в 97 % случаев, отмечая некоторое снижение этого показателя (отрицательная реакция — в 3 % наблюдений). Наряду со снижением экспрессии CD44 в опухолевых клетках наблюдались перераспределение белка в строме опухоли и обнаружение его в фокусах ранней стромальной инвазии.

Заключение. CD44 и тенаascin представляют диагностическую ценность при исследовании инвазивных карцином молочной железы. Также данные маркеры можно использовать для выявления ранней стромальной инвазии и диагностики инвазивного рака с очень высокодифференцированными железистыми структурами.

Исследование маркеров множественной лекарственной устойчивости при саркоме мягких тканей

Н.И. Моисеева, Л.А. Лалетина, Д.А. Климова, Т.И. Фетисов,
А.М. Щербаков, Б.Ю. Бохян, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Саркомы мягких тканей (СМТ) — редкая и очень гетерогенная группа злокачественных опухолей, развивающаяся из разных типов соединительной ткани. Применение ХТ при СМТ ограничено как ее невысокой чувствительностью, так и развитием множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Наша работа направлена на определение факторов МЛУ — экспрессии ABC-транспортеров (*MDR1* и его продукта Pgp, *BCRP* и *MVP/LRP*) и 1 из предикторов ее развития — белка YB-1, транскрипционного фактора для генов МЛУ, чья транлокация в ядро рассматривается как неблагоприятный маркер.

В 10 образцах СМТ методом ПЦР в реальном времени была проанализирована экспрессия генов *MDR1*, *BCRP*, *MVP*, *YB-1*. Более высокая экспрессия гена *MDR1* чаще выявлялась при плеоморфной саркоме ($p = 0,02$), а гена *MVP* — при синовиальной саркоме. Экспрессия гена *YB-1* коррелировала с экспрессией *MDR1* ($r = 0,72$; $p = 0,02$), но не с *BCRP* ($r = 0,61$; $p = 0,06$), а гены *MDR1* и *BCRP* по экспрессии коррелировали друг с другом ($r = 0,74$; $p = 0,01$).

Экспрессия Pgp на поверхности клеток была обнаружена с помощью проточной цитофлуориметрии только в 2 из 30 образцов (7 %), в 1 из которых 13,2 % клеток экспрессировали Pgp, а в другом определялись 2 субпопуляции клеток — негативная по Pgp и слабopозитивная по Pgp (16,1 % его экспрессировали). Также отсутствие экспрессии Pgp было подтверждено методом вестерн-блоттинга в 5 образцах. По характеру локализации белка YB-1 в клетках СМТ (иммуноцитохимия) можно выделить 3 типа клеток: с цитоплазматической (3 образца), ядерной (1 образец) и диффузной (7 образцов) (одинаковая интенсивность окраски цитоплазмы и ядра) локализацией. Доксорубин после 24-й инкубации приводил к увеличению диффузной и ядерной локализации YB-1 во всех образцах, в том числе в образце, на который не действовал ни один из других препаратов. Доцетаксел повлиял на изменение локализации YB-1 в половине образцов, в которых он

способствовал увеличению цитоплазматической локализации этого белка, и только в 1 образце привел к увеличению диффузной и ядерной локализации. Для гем-цитабина и его комбинации с доцетакселом четких закономерностей на данной выборке не выявлено.

Первичный анализ позволяет выделить образцы, в которых одновременно обнаруживается более высокая экспрессия всех изучаемых генов, однако экспрессия Pgr наблюдалась всего в 7 % случаев. Только доксорубин приводит к перемещению YB-1 в ядра клеток во всех образцах, доцетаксел действует разнонаправленно, в том числе наблюдается переход YB-1 в цитоплазму клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09095 мк).

Наследственный рак молочной железы, ассоциированный с мутацией гена *RAD51D*, у пациенток бурятской национальности

А.Ю. Молоков^{1,2}, П.А. Гервас², Н.В. Чердынцева²

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Ежегодно в мире диагностируется более 1 млн новых случаев РМЖ, из них более 60 тыс. — в России. В 5–10 % случаев РМЖ носит наследственный характер и связан с накоплением в семьях мутаций генов *BRCA1/2*, *CHEK*, *BLM* и др. На данный момент идет активный поиск мутаций генов, ассоциированных с наследственными формами РМЖ, у коренных народов Сибири, принадлежащих к монголоидной расе.

Материалы и методы. В исследование были включены 62 пациентки монголоидного происхождения (бурятки, тувинки) в возрасте от 25 до 55 лет с признаками наследственного РМЖ. Одним из основных критериев включения пациентов было отсутствие РМЖ-ассоциированных мутаций генов *BRCA1/2*.

ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови. Подготовка ДНК-библиотек проводилась с использованием набора Hereditary Cancer Solution™ (SOPHiA GENETICS) с целью обогащения 27 генов (*ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51D*, *TP53* и др.). Секвенирование выполнялось на платформе NextSeq500 (Illumina, США).

Результаты. По результатам анализа данных NGS среди 62 неродственных пациенток монголоидного происхождения с признаками наследственного РМЖ были выявлены 32 SNV, 5 Indel и 21 ранее не описанный вариант в dbSNP и др. В нашем исследовании обнаружена высокопатогенная мутация гена репарации *RAD51D* (с.757C>T, rs137886232), приводящая к стоп-кодону и преждевременной терминации трансляции. Высокопатогенная мутация гена *RAD51D*

обнаружена у 2 неродственных пациенток бурятской национальности в возрасте до 45 лет с диагнозом РМЖ.

Заключение. Нами впервые обнаружена высокопатогенная мутация гена *RAD51D* (rs137886232) у молодых пациенток бурятской национальности с признаками наследственного РМЖ. Полученные данные требуют изучения частоты встречаемости описанного аллельного варианта гена *RAD51D* на расширенной выборке пациенток с наследственными формами РМЖ, а также на здоровых добровольцах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09046).

Диагностическая значимость мутаций в генах *BRAF*, *TERT* и генах семейства *RAS* при раке щитовидной железы в цитологическом материале категорий Bethesda IV и V

А.А. Мусаелян¹, В.Д. Назаров¹, С.Л. Воробьев²,
Е.С. Козорезова², С.В. Лапин¹

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова»

Минздрава России, Санкт-Петербург;

²ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», Санкт-Петербург

Введение. Узлы ЩЖ выявляются в ходе УЗИ у 60–70 % людей в возрасте более 50 лет. При наличии подозрительных ультразвуковых признаков выполняется тонкоигольная аспирационная биопсия с последующим исследованием цитологического материала для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных образований. Однако 10–40 % всех результатов цитологического исследования представляют собой неинформативный материал либо цитологию промежуточного риска злокачественности (по Bethesda III–V).

Цель исследования — изучение диагностической значимости aberrаций в генах *BRAF*, *TERT* и генах семейства *RAS* при РЩЖ в цитологическом материале Bethesda IV и V.

Материалы и методы. Был собран 51 цитологический материал категории Bethesda IV и 8 — категории Bethesda V. Из группы Bethesda IV в 29 случаях гистологические образования представляли собой фолликулярную аденому, в 8 — фолликулярный вариант папиллярной карциномы, в 6 — папиллярную карциному, в 2 — солидный вариант папиллярной карциномы, в 3 — фолликулярную карциному и в 3 случаях — NIFTP. А из группы Bethesda V все случаи представлены папиллярной карциномой. Всем пациентам, включенным в исследование, проведено генотипирование гистологических образцов. Выделение ДНК из материала, фиксированного формалином и залитого парафином, осуществлялось с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия).

Для создания комплексной диагностической панели использован метод мультитаргетной одноклеточной элонгации. Панель включала aberrации в следующих генах: V600E гена *BRAF*, C228T и C250T в промоторном регионе гена *TERT*, кодоны 12, 13, 61 генов *KRAS*, *NRAS* и *HRAS*.

Результаты. Распространенность мутаций, исследуемых в составе комплексной панели, при РПЖ достигла 33,3 %. Aberrация V600E в гене *BRAF* детектирована только при ПК с частотой 38,5 %. Исследование цитологического материала на наличие мутаций в генах семейства RAS дает возможность выявлять 66,7 % случаев NIFTP: были детектированы 2 аналогичные мутации — Q61R — в генах *HRAS* и *KRAS*. При фолликулярном варианте папиллярной карциномы aberrации были обнаружены в генах *NRAS* и *HRAS* с частотой 37,5 %. Ген *HRAS* был наиболее часто выявляемым геном семейства RAS при РПЖ. Но специфичность данного маркера уступала другим генам семейства RAS — 96,67 % (95 % ДИ 81,83–99,87 %). Так, обнаружена мутация Q61R в гене *HRAS* при фолликулярной аденоме. Aberrаций в промоторном регионе гена *TERT* в исследуемом материале не выявлено. Молекулярно-генетическая панель для диагностики РПЖ в цитологических образцах категорий Bethesda IV и V обладает чувствительностью 33,3 % (95 % ДИ 17,94–52,86 %) и специфичностью 96,67 % (95 % ДИ 80,95–99,83 %).

Заключение. Разработанная высокоспецифичная комплексная молекулярно-генетическая панель, включающая aberrации в генах *BRAF*, *TERT* и генах семейства RAS, позволит дополнить цитологическую диагностику материала категорий Bethesda IV и V.

Сравнительный анализ диагностической значимости маркеров на основе простатического специфического антигена, его дериватов (плотность простатического специфического антигена, индекс здоровья предстательной железы) и молекулярно-генетических маркеров (PCA3 и TMPRSS2-ERG)

А.А. Мусаелян¹, В.Д. Назаров¹, А.Г. Борискин¹, С.А. Рева¹,
Д.Г. Лебедев², С.В. Лапин¹, С.Б. Петров¹

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург;
²СПб ГБУЗ «Александровская больница», Санкт-Петербург

Введение. РПЖ является вторым наиболее часто диагностируемым злокачественным новообразованием у мужчин во всем мире. Раннее выявление РПЖ основано на определении уровня ПСА в крови и/или обнаружении патологических изменений

при пальцевом ректальном исследовании, трансректальном УЗИ и проведении биопсии с последующим патоморфологическим исследованием. Однако прогностическая ценность положительных результатов при данном подходе остается низкой.

Цель исследования — определение диагностической значимости маркеров на основе уровня ПСА и молекулярно-генетических маркеров для определения показаний к проведению первичной биопсии у пациентов с подозрением на РПЖ: плотность ПСА (PCAD), индекс здоровья предстательной железы (ИЗП), PCA3 и TMPRSS2-ERG.

Материалы и методы. Исследование включало 62 пациента с подозрением на РПЖ. Критерием включения являлись повышение сывороточного ПСА, патологические участки, выявленные по результатам пальцевого ректального исследования либо трансректального УЗИ. У всех пациентов был проведен забор образцов мочи, полученных после пальцевого ректального массажа, для последующего определения экспрессии PCA3 и наличия перестройки TMPRSS2-ERG. Экстракция РНК проводилась с помощью набора «РеалБест экстракция» (Вектор-Бест, Россия). Обнаружение экспрессии PCA3 проводилось с использованием «Проста-Тест» (ТестГен, Россия), а выявление перестройки осуществлялось с TaqMan®-пробами (Thermo Fisher Scientific, США). У всех пациентов, включенных в исследование, были собраны следующие лабораторные данные: PCAD и ИЗП.

Результаты. После проведенного гистологического исследования образцов биопсии пациенты с подозрением на РПЖ были разделены на 2 группы: верифицированный РПЖ ($n = 37$) и группа, включавшая простатическую интраэпителиальную неоплазию (ПИН) различной степени, атипическую мелкоацинарную пролиферацию (ASAP), доброкачественную гиперплазию и хронический простатит ($n = 25$). Был применен ROC-анализ для определения чувствительности и специфичности при оптимальном пороговом уровне используемых маркеров. При пороговом значении PCAD ($n = 36$) >14 % чувствительность и специфичность составили 48 % (95 % ДИ 27,8–68,69 %) и 90,91 % (95 % ДИ 58,72–99,77 %) соответственно; при ИЗП ($n = 33$) >45 –52,38 % (95 % ДИ 29,78–74,29 %) и 91,67 % (95 % ДИ 61,52–99,79 %) соответственно; при PCA3 ($n = 62$) >35 –97,3 % (95 % ДИ 85,84–99,93 %) и 68 % (95 % ДИ 46,5–85,05 %) соответственно. Площадь под ROC-кривой (AUC) составила 0,6582 ($p = 0,1353$), 0,754 ($p = 0,01665$) и 0,7892 ($p = 0,0001253$) для PCAD, ИЗП и PCA3 соответственно. Прогностическая ценность отрицательного результата определения PCA3 составила 93,86 % (95 % ДИ 71,35–99,76 %). Перестройка TMPRSS2-ERG выявлена в 26,32 % случаев РПЖ и у 2 пациентов с ПИН высокой степени и ASAP.

Заключение. Выявление показателя PCA3 и наличия TMPRSS2-ERG дает возможность с высокой точностью определять необходимость первичной биопсии.

Особенности профиля экспрессии микроРНК клетками анапластической карциномы щитовидной железы

Н.А. Назмиева¹, М.С. Князева^{1,2}, А.С. Артемьева¹,
С.Л. Воробьев³, А.В. Малек^{1,4}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

²ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург;

³ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики», Санкт-Петербург;

⁴ООО «Онко-система», Москва

Введение. Развитие злокачественных образований из фолликулярного эпителия ЩЖ сопровождается специфическими изменениями профиля экспрессии внутриклеточных микроРНК. Оценка этих изменений находит практическое применение в ходе первичной или дифференциальной диагностики узловых образований ЩЖ. Анапластическая карцинома ЩЖ (АКЩЖ) является относительно редкой формой заболевания, характеризуется злокачественным течением и высокой летальностью. Эта ситуация определяет необходимость поиска и внедрения в клиническую практику новых методов ранней диагностики. Исследование роли микроРНК в процессе развития данного заболевания создает основу для разработки новых диагностических и лечебных подходов.

Цель исследования — проведение анализа экспрессии микроРНК в клетках АКЩЖ, идентификация микроРНК, потенциально вовлеченных в патогенез заболевания.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы ткани АКЩЖ ($n = 20$) и образцы нормальной ткани ЩЖ ($n = 22$). В каждом клиническом случае диагноз был поставлен после гистологического исследования операционного материала. Дизайн исследования включал широкий профайлинг пулов образцов с последующим анализом выбранных маркерных молекул в каждом образце отдельно. Тотальная РНК выделялась из архивных образцов (FFPE). В работе были использованы две технологии ОТ-ПЦР-анализа микроРНК, предполагающие универсальную ОТ (после полиаденилирования микроРНК) или микроРНК-специфичную ОТ (с two-tailed праймером).

Результаты. Было показано, что в клетках АКЩЖ активирована экспрессия miR-375, -1246 и -21, снижена экспрессия miR-Let7b, miR-125b и miR-181a. Применение оригинальной методики интерпретации результатов ОТ-ПЦР (оценка соотношения концентрации молекул с реципрокным характером экспрессионных изменений) позволило проводить диагностику АКЩЖ с показателями чувствительности, лежащими в диапазоне 90,91–95,45 %, и специфичности 85,71–100 % для выбранных реципрокных пар: miR-21 и -125b; miR-375 и -125b; miR-375 и miR-Let7b.

Заключение. Дальнейшие исследования роли микроРНК в карциногенезе АКЩЖ необходимы для разработки новых подходов к диагностике и терапии заболевания.

Анализ мутационного статуса генов KRAS и NRAS у пациентов с диагнозом колоректального рака

Е.П. Омельчук, Д.Ю. Гвалдин, Д.С. Потемкин,
Н.Г. Васильченко, М.Ю. Мещерякова, М.А. Кожушко
ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. КРР является 3-й по распространенности онкопатологией среди обоих полов. Согласно клиническим рекомендациям Ассоциации онкологов России для пациентов с предположительно метастатической аденокарциномой толстой кишки необходимо выполнить анализ на мутацию в *RAS* (экзоны 2–4 генов *KRAS* и *NRAS*). Наличие мутаций генов *RAS* позволяет предсказать отсутствие ответа на терапию МА против *EGFR*.

Цель исследования — изучить частоту мутаций генов *KRAS* и *NRAS* у пациентов с диагнозом КРР, получавших лечение на базе ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России.

Материалы и методы. В исследование включены 927 пациентов с КРР, из них 48,4 % — мужчины. Медиана возраста — 61 (15–89) год. Выделение геномной ДНК из парафиновых блоков проводили с помощью набора GeneJET FFPE DNA Purification Kit, Thermo Scientific. Детекцию соматических мутаций генов *KRAS* и *NRAS* (2, 3, 4-й экзоны) осуществляли посредством методики HRM-PCR. Для подтверждения наличия мутаций во 2-м экзоне гена *KRAS* использовали набор Real-time-PCR-KRAS-7M, Bioline. Анализ остальных локусов проводили секвенированием по Сэнгеру с праймерами собственного дизайна.

Результаты. Дикий тип генов *KRAS* и *NRAS* был зафиксирован у 469 (50,6 %) пациентов. У 3 пациентов наблюдалось одновременное наличие полиморфизмов во 2-м экзоне *KRAS* и во 2-м/3-м экзоне *NRAS*. Наиболее часто встречались мутации во 2-м экзоне *KRAS* (46,8 %), в 3-м и 4-м экзонах *KRAS* мутации были обнаружены соответственно у 4 (0,4 %) и 8 (0,8 %) пациентов. Единичные полиморфизмы гена *NRAS* детектированы у 12 пациентов (1,3 %): во 2-м экзоне — у 7 больных (0,8 %), в 3-м — у 5 (0,5 %), причем только в 61-м положении. Мутации в 4-м экзоне *NRAS* не идентифицированы.

Заключение. В настоящем исследовании в 50,6 % случаев метастатического КРР была показана таргетная анти-EGFR-терапия для пациентов с диким типом *KRAS* и *NRAS*. Распределение частоты встречаемости мутаций *RAS* в целом соответствовало данным базы My Cancer Genome.

Возможности применения Раман-спектроскопии в диагностике рака мочевого пузыря *in vitro*

В.Н. Павлов, В.В. Королёв, Р.Ф. Гильманова,
М.Ф. Урманцев

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа

Введение. Рак мочевого пузыря — наиболее часто встречаемая злокачественная опухоль мочевыводящих путей: и по распространенности занимает 7-е место в структуре онкопатологии у мужчин и 17-е — у женщин. В России отмечается тенденция к росту заболеваемости раком мочевого пузыря, а также большое число больных с поздними стадиями. Так, в 2017 г. III клиническая стадия была зарегистрирована у 12,9 % всех выявленных больных, а IV — у 9,9 %. Остается высокой смертность в течение 1 года с момента выявления заболевания — 14,9 %. Целью исследований последних десятилетий является изучение биологии опухоли и ее патогенеза, разработка новых технологий диагностики и лечения. Раман-спектроскопия — это метод, позволяющий с высокой специфичностью исследовать ткани на молекулярном уровне во время патологической трансформации.

Цель исследования — оценить диагностические возможности метода рамановской спектроскопии в выявлении рака мочевого пузыря.

Материалы и методы. Изучены 20 образцов тканей мочевого пузыря с гистологически подтвержденным диагнозом рака мочевого пузыря и 13 образцов нормальной ткани мочевого пузыря. Исследование образцов проводилось на аппарате Horiba Scientific. Конфигурация: длина волны — 785 нм, решетка — 1200 штр/мм, фильтр — 100 %, конфокальное отверстие — 300 мкм. Время интегрирования — 50 с. Анализ спектральных данных проводился с использованием программного обеспечения Spectragraph.

Результаты. Анализ полученных данных фрагментов тканей рака мочевого пузыря и нормальной ткани мочевого пузыря показал, что в спектрах комбинационного рассеяния имеются значительные различия. Так, раман-флуоресцентные спектры образцов рака мочевого пузыря содержат ярко выраженные пики в диапазоне 500–2500 см^{-1} . Следует отметить высокую интенсивность пиков в области 750 см^{-1} (тимин), 1000 см^{-1} (фенилаланин), 1100 см^{-1} (комплекс жирных кислот), которые отсутствуют в спектрах образцов нормальных тканей. Кроме того, наблюдается существенное увеличение интенсивности пиков в областях 850 и 1250 см^{-1} (связь C-NH₂ в молекулах аденина, гуанина и цитозина) в спектрах рака мочевого пузыря по сравнению со спектрами нормальной ткани, а также появление группы пиков низкой интенсивности в области 2800–3000 см^{-1} (липиды и белки).

Заключение. Проведенное исследование образцов тканей с подтвержденным диагнозом рака мочевого

пузыря показало, что в них имеется увеличение интенсивности рамановского рассеяния света по сравнению с образцами нормальной ткани мочевого пузыря, что подтверждает спектральные различия в биохимическом составе этих образцов.

Чувствительность и специфичность для нормальных тканей мочевого пузыря и рака мочевого пузыря составляют 88,3 и 95 % и 97,4 и 96,1 % соответственно. Эти результаты демонстрируют потенциал использования спектроскопии комбинационного рассеяния света для диагностики рака мочевого пузыря *in vitro*.

Ассоциация полиморфных маркеров гена *ABCB1* с начальной меланомой хориоидеи

С.В. Саакян¹, М.Р. Хлгатын¹, А.Ю. Цыганков¹,
А.М. Бурденный², В.И. Логинов²

¹ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца»
Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва

Введение. Увеальная меланома (УМ) является злокачественной внутриглазной опухолью меланоцитарного генеза, которая несет угрозу для жизни пациента. Частота встречаемости начальной меланомы хориоидеи (НМХ) составляет 24 %, а выживаемость при 10-летнем наблюдении — 89 %. УМ является мультифакторным заболеванием с полиморфной клинической картиной. В настоящее время основной акцент направлен на выявление молекулярно-генетических факторов. Полиморфизм гена *ABCB1/MDR1* представляет особый интерес в связи с риском развития и прогностической значимостью УМ.

Цель исследования — определить ассоциацию гена *ABCB1* с риском развития НМХ и изучить частоту распределения генотипов гена *ABCB1* пациентов с НМХ.

Материалы и методы. В проспективное исследование были включены 26 пациентов с НМХ (7 мужчин и 19 женщин) в возрасте от 32 до 80 лет (средний возраст — 59,0 ± 14,3 года). Диагноз НМХ устанавливали на основании клинко-инструментальных методов исследования. В качестве популяционного контроля использовали выборку лиц без онкологических заболеваний, сопоставимую по возрасту и полу ($n = 60$). Материалом для исследования служила геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови с помощью протеиназы К с последующей фенольно-хороформной экстракцией и осаждением этанолом. Выделенные образцы ДНК хранили при температуре –20 °С. Идентификацию аллелей полиморфного маркера C3435T (rs1045642) гена *ABCB1* проводили с помощью ПЦР-ПДРФ.

Результаты. Показаны статистически значимая ассоциация генотипа CC гена *ABCB1* с риском развития НМХ (ОШ = 4,86 (1,7–13,84), $F = 0,005052$, $\xi^2 = 9,54$) и значимая связь генотипа TT гена *ABCB1* с низким

риском развития опухоли (ОШ = 0,18 (0,04–0,84), $F = 0,026742$, $\xi^2 = 5,65$). Выявлена достоверная ассоциация генотипа СТ маркера С3435Т гена *ABCB1* с наличием очагов оранжевого пигмента на поверхности опухоли (ОШ = 14 (0,83–235,09), $F = 0,097007$, $\xi^2 = 4,46$) и отягощенным онкологическим семейным анамнезом (ОШ = 6 (0,9–39,19), $F = 0,089519$, $\xi^2 = 3,87$).

Заключение. Выявленные результаты в перспективе можно использовать для скрининга пациентов с НМХ.

Выявление и оценка прогностических факторов посредством морфологического аудита при раке прямой кишки

С.В. Снегур¹, Ю.Г. Павлова^{1,2}, М.В. Мнихович^{3,4},
И.В. Васин^{1,2}, Т.В. Безуглова³, Камаль Халави Скафи⁵,
Д.С. Куш⁴, Н.Г. Малюгин⁴, А.В. Романов⁴, К.В. Буньков⁶

¹ГБУ РО «Рязанская областная клиническая больница», Рязань;

²ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань;

³ФГБНУ «НИИ морфологии человека», Москва;

⁴ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

⁵Медицинский центр «Клалит», Иерусалим, Израиль;

⁶ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии», Смоленск

Введение. В настоящее время имеются проблемы с выявлением прогностически неблагоприятных групп больных раком прямой кишки (РПК). Это связано с гетерогенностью опухоли. Прогноз заболевания зависит от морфологического аудита участков резекции и метастазов. В настоящее время стандартом лечения РПК становится удаление кишки с применением тотальной мезоректумэктомии. Это снижает местные рецидивы и улучшает результаты лечения.

Цель исследования — изучить морфологию участков резекции кишки с РПК, дать рекомендации по морфологическому аудиту РПК.

Материалы и методы. В исследование включили 56 больных РПК в возрасте 44–79 лет. Средний возраст 62 года, мужчин было меньше, чем женщин (23:33). Среди пациентов с поздними стадиями (IVB) количество пациентов разных полов равно 30: 26. У 14 пациентов отмечались метастазы в лимфатические узлы, у 9 — в печень. Радикальность операции оценивали, исследуя циркулярный край резекции кишки (ЦКР). Важный показатель в оценке качества оперативного лечения — отсутствие рака в ЦКР. Изучение качества мезоректумэктомии включает оценку качества операции (ТМЕ) и ЦКР при фиксации в формалине с последующим исследованием серийных поперечных срезов красителем. Задача 2-го этапа — изучение ЦКР и параметров опухоли (рТ). На 3-м этапе производилось изучение лимфатических узлов (рН). Третий этап определяет прогноз и тактику последующего лечения.

Результаты. Во время работы был определен минимум ИГХ антител для адекватного морфологического аудита РПК: Ki-67, Е-кадгерин, β -катанин, Col4, CK-19, -20, CDX2, villin и CK 7.

Заключение. Данные алгоритмы и подходы к исследованию РПК позволяют оценить качество оперативного лечения, точное стадирование и обнаружение морфологически неблагоприятных прогностических факторов. Полученные при аудите результаты позволяют прогнозировать болезнь и выбрать тактику лечения для каждого пациента с РПК.

Effectiveness of detection mutation in promoter region of telomerase catalytic subunit

A.I. Ogurtsova¹, V.M. Farzan², I.A. Veselova¹, T.S. Zatsepin^{1,2},
M.I. Zvereva^{1,3}

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, the Russian Federation;

²Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, the Russian Federation;

³International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

Use of circulating tumor DNA (ctDNA) released by tumor cells in body liquids significantly enhanced potential for development of non-invasive molecular diagnostics of cancer. So, mutations in the promoter of telomerase catalytic subunit gene are highly specific for bladder cancer and determination of such mutations can improve diagnostics, monitoring of progression and treatment (Avogbe P.H. et al., 2019, EBioMedicine, 44:431–8). One of limitations for ctDNA detection in body fluids are high fragmentation that stronger for ctDNA then cell free DNA and influence on mutant allelic fraction determination (Zvereva M.I. et al., 2019, EBioMedicine, in press). In this regard, development of novel approaches for specific detection of tumor DNA without amplification in sort fragments is required. Technology based on Spectroscopy Resonance Raman scattering allows development of detection of short target molecules at fM concentrations due to the resonant enhancement of the signal (Eremina O.E. et al., 2019, Mendelev Comm., in press).

To compare the effectiveness of different methods for determining the mutation in the sequence of the promoter of the telomerase catalytic subunit gene, a method for detection of the absolute concentration for specific nucleic acid sequence is selected. This method was developed based on quantitative droplet PCR (ddPCR) for determining the C228T or C250T mutation in the sequence of promoter for the telomerase catalytic subunit gene. To determine the analytical sensitivity and error rate we need samples containing a different ratio of sequences carrying mutations and not. We used cell line DNA and created by cloning artificial control DNA samples.

The study was supported by Russian Foundation of Basic Research (grant № 18-29-08040).

Тезисы

Возрастные особенности мутаций гена *TP53* при острых миелоидных лейкозах взрослых

А.В. Виноградов

ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница №1», Екатеринбург

Исследованы образцы костного мозга и периферической крови 108 больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ), проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре (г. Екатеринбург). Выявление мутаций в экзонах 4–11 гена *TP53* проводили методом прямого автоматического секвенирования. Пациенты в зависимости от возраста были распределены на 3 подгруппы (по классификации ВОЗ): 15–39, 40–60 и старше 60 лет. В 1-й подгруппе с морфологическим подтипом ОМЛ M0 были 3 пациента, с M1 – 1, M2 – 13, M3 – 1, M4 – 8, M4эо – 2, M5 – 1, с бластной плазмцитоидной дендритно-клеточной опухолью – 1. Во 2-й подгруппе с ОМЛ M0 были 2 пациента, с M1 – 2, M2 – 15, M3 – 6, M4 – 8, M4эо – 1, M5 – 1, M6 – 2, M7 – 1. В 3-й подгруппе ОМЛ M0 диагностировали в 1 случае, M1 – в 4, M2 – в 21, M3 – в 1, M4 – в 8, M5 – в 1, M6 – в 2, острый миелофиброз – в 1, бластную плазмцитоидную дендритно-клеточную опухоль – в 1.

Мутации в экзонах 4–11 гена *TP53* были выявлены только в возрастных подгруппах ОМЛ 45–60 и старше 60 лет. В 1-й подгруппе (пациенты с ОМЛ в возрасте 15–39 лет) мутации гена *TP53* не обнаружены. Во 2-й подгруппе выявлена 1 несинонимичная замена C569G (2,6 %, больной ОМЛ M2, 48 лет). В 3-й подгруппе были выявлены 8 различных мутаций (20,0 %) у больных с подтипами ОМЛ M2 ($n = 5$), M6 ($n = 2$) и M4 ($n = 1$). В общей сложности у пациентов с ОМЛ в возрасте старше 60 лет определялись 5 несинонимичных замен (A377G, C569G, G733T, C817T и G841C), 1 делеция (с.645delG) и 1 тандемная дупликация. В 1 случае (1 пациент с ОМЛ M2) в пробе одновременно обнаруживались 2 несинонимичные замены (C292T + C817T). Во всех случаях мутации приводили к функциональным изменениям в ДНК-связывающем домене белка p53.

Таким образом, выявлено статистически значимое увеличение частоты мутаций гена *TP53* в возрастной группе больных ОМЛ старше 60 лет ($F = 0,03$, $p < 0,05$).

Меланома кожи у ребенка

Г.М. Волгарева¹, Т.С. Бельшева¹, Л.Э. Завалишина²,
Я.В. Вишневская¹, Д.Б. Хестанов¹, О.С. Бурова¹,
М.Д. Алиев¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва

Введение. Меланома кожи (МК) у детей встречается крайне редко и по характеру роста, метастазированию, а также по выживаемости больных отличается от МК у взрослых. Ранняя диагностика этой высокозлокачественной опухоли является главным условием успешного лечения ребенка. При невысокой заболеваемости МК детей и подростков в России (0,03 на 100 тыс. в возрастной группе до 14 лет) смертность от нее в 6 раз превышает данный показатель для США, Канады и Австралии, что связано обычно с запущенностью опухолевого процесса на момент его обнаружения. При диагностике МК у детей используют те же методы, что и у взрослых. Адекватность такого подхода требует проверки.

Цель исследования — описание процедур постановки диагноза для крупного врожденного пигментного новообразования кожи у ребенка.

Материалы и методы. Девочка 5 мес поступила в клинику НИИ ДОГ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с врожденной опухолью багрового цвета в области лучезапястного сустава, возвышающейся над поверхностью кожи на 2 см, поперечным размером 3 × 4 см. По месту жительства высказано предположение о гемангиоме. При диагностике в НИИ ДОГ использованы УЗИ, МРТ, трепанобиопсия, открытая биопсия, материалы которой исследованы гистологически на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, и с помощью ИГХ-исследования путем детекции индикаторов пролиферации клеток (Ki67, циклина D1, p16^{INK4a}), антигенов меланоцитарного ряда дифференцировки (Melan A, HMB45, тирозиназы, MITF), белков, используемых как маркеры собственно МК (белка микрофиламентов виментина, кальций-связывающего белка S100 a), антигенов тканевой совместимости (HLA-антигенов 1-го класса). Опухоль представлена участками врожденного невуса, содержащего пигмент в гнездных скоплениях невоидных клеток юнкциональной зоны, в более глубоких отделах невоидные клетки мельче, растут солидно или в виде мелкоальвеолярных структур, не содержат пигмент. Отмечаются зоны малигнизации, где преобладают веретеновидные плотно лежащие беспигментные клетки с высокой митотической

активностью, 2–3 митоза в поле зрения при увеличении в 400 раз. Сосудистая инвазия и периневральный рост не обнаружены. Уровень инвазии по Кларку — 5, толщина по Бреслоу — 22 мм. При ИГХ-диагностике чаще встречающейся и лучше изученной МК у взрослых обычно используют панель маркеров, включающую белки, специфичность и чувствительность которых не являются стопроцентными; для заключения о МК рекомендуют учитывать именно комплекс данных, получаемых с несколькими маркерами. В нашей работе экспрессия всех перечисленных белков совпала с описанной другими авторами в случаях МК у взрослых больных.

Заключение. Установлен диагноз: узловая пигментная МК. Проведено иссечение опухоли. Безрецидивный период на момент подготовки сообщения — 12 мес. Для подтверждения адекватности использованных в работе методов и маркеров при диагностике МК у детей целесообразно продолжение исследований в данном направлении.

Прокатепсин В, цистатины В и С при опухолях репродуктивной системы

Е.А. Гашенко¹, В.А. Лебедева², Г.С. Русских³, И.В. Брак¹, Т.А. Короленко¹

¹Лаборатория экспериментальных моделей нейродегенеративных процессов, лаборатория психофизиологии ФНГБУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск;

²ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск;

³лаборатория медицинской биотехнологии НИИ биохимии ФГБНУ «Федеральный научный центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск

Введение. Цистеиновые катепсины В, L, H, K, S, их проформы и эндогенные ингибиторы цистатины вовлечены в процессе опухолевого роста и метастазирования. Цистатин С и цистатин В также вовлечены в пролиферацию клеток. Цистатины суперсемейства 1-й (цистатины А, В) и 2-й групп (цистатины С, SA, SN, S и D) перспективны для их использования в терапии опухолей. До настоящего времени роль цистатинов В и С в онкологии исследована недостаточно. Полагают, что цистатин В играет защитную роль против повреждающего действия цистеиновых протеаз. Цистатин С вовлечен в регуляцию клеточной пролиферации, дифференцировку и миграцию клеток. Поиск новых биомаркеров опухолей среди ингибиторов протеаз и неактивных проформ ферментов представляет определенный интерес при раке легкого, РМЖ и других опухолях.

Цель исследования — изучить роль прокатепсина В, цистатинов В и С в биологических жидкостях

как возможных биомаркеров при злокачественных и доброкачественных опухолях яичников в сравнении со стандартным сывороточным маркером РЯ СА-125. Нами проведено изучение проформ цистеиновых протеаз и цистатинов В и С при опухолях репродуктивной системы. Прокатепсин В можно рассматривать как новый опухолевый биомаркер при РЯ, как более специфичный биомаркер по сравнению с СА-125, цистатин В при толерантности лечения.

Материалы и методы. Использовали сыворотку крови больных РЯ ($n = 29$), доброкачественными опухолями яичников ($n = 9$), раком эндометрия ($n = 29$). В качестве контроля использовали сыворотку крови практически здоровых женщин в возрасте 18–80 лет ($n = 82$). Концентрацию прокатепсина В оценивали ИФА-методом с использованием коммерческих наборов ELISA (R&D, США) для человека; цистатина С — BioVendor (Чехия); цистатина В — USCN Life Science Inc. (Wuhan, Китай), стандартный биомаркер СА-125 («Вектор», Кольцово, Новосибирская обл.). Статистический анализ выполнен методом ANOVA, Statistics 12.

Результаты. Наблюдали резкое увеличение уровня прокатепсина В ($p < 0,0001$) в сыворотке крови больных РЯ по сравнению с контролем; концентрация цистатина В умеренно повышена ($p < 0,05$), а цистатина С — не изменена. В асците при РЯ уровень прокатепсина В повышен более значительно ($p < 0,0001$), чем при доброкачественных опухолях ($p < 0,05$). СА-125 повышен в обеих группах ($p < 0,0001$). После проведения противоопухолевой терапии при РЯ и раке эндометрия концентрация прокатепсина В сыворотки крови снижается ($p < 0,05$).

Заключение. Повышенный уровень прокатепсина В в сыворотке крови можно рассматривать как новый биомаркер опухоли при РЯ и важен в дифференциальной диагностике опухолей яичников и толерантности к противоопухолевой терапии.

Применение иммуногистохимического метода в диагностике цервикальной интраэпителиальной неоплазии

Т.А. Димитриади^{1,2}, Д.В. Бурцев^{1,2}, Е.А. Дженкова³, А.Ф. Михельсон², Е.Ю. Лебеденко²

¹ГАОУ РО «Областной консультативно-диагностический центр», Ростов-на-Дону;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

³ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. РШМ является широко распространенной в мире патологией, ежегодная заболеваемость составляет 13,2 случая на 100 тыс. женщин, а смертность — 5,9 случая

на 100 тыс. женщин. К заболеваниям шейки матки, предшествующим инвазивному РШМ, относят дисплазии эпителия или цервикальные интраэпителиальные неоплазии (CIN). Концепция канцерогенеза предполагает последовательную прогрессию от CIN1 до CIN2 и CIN3, *cancer in situ* (CIS) и развития инвазивного рака на фоне персистирующей ВПЧ-инфекции высокого канцерогенного риска.

Цель исследования — оценить ИГХ-профили различных стадий диспластической трансформации шейки матки.

Материалы и методы. ИГХ-исследование по оценке экспрессии маркеров P16 INK4a, Cyclin D1, Ki-67. Взято 56 депарафинированных срезов с блоков тканей шейки матки, полученных от препаратов петлевой экцизии (конизации) зоны трансформации. В качестве контроля использован 31 образец ткани шейки матки больных с ВПЧ-инфекцией, но не имеющих CIN/CIS.

Результаты. Были получены следующие уровни экспрессии биомаркеров: CIN1: Ki-67 в покровном эпителии — 11–20 %, в железах — 7–13 %, P16 INK4a в покровном эпителии — 4–8 %, Cyclin D1 в покровном эпителии и железах — 10–11 %; CIN2: Ki-67 в покровном эпителии — 55–75 %, в железах — 73–91 %; P16 INK4a в покровном эпителии — 50–60 %, в железах — 80–95 %, Cyclin D1 в покровном эпителии и железах — 8–9 %; CIN3: Ki-67 в покровном эпителии — 85–95 %, в железах — 92–95 %, P16 INK4a в покровном эпителии — 70–80 %, в железах — 96–98 %, Cyclin D1 в покровном эпителии и железах — 5–6 %; CIS: Ki-67 в покровном эпителии — 96–100 %, в железах — 96–100 %, P16 INK4a в покровном эпителии — 96–100 %, в железах — 96–100 %, Cyclin D1 в покровном эпителии и железах — 3–4 %.

Заключение. ИГХ-исследование с определением экспрессии маркеров P16 INK4a, Cyclin D1, Ki-67 в диспластических клетках обеспечивает выявление прогностических признаков клеточной пролиферации с неблагоприятным прогнозом еще на стадии ранних клеточных изменений, когда кольпоскопия, цитологическое и гистологическое исследования недостаточно эффективны, и позволяет уточнять диагностику степени дисплазии шейки матки.

Исследование ассоциации полиморфного варианта rs2276109 гена *MMP12* с риском развития рака желудка в Республике Башкортостан

Г.М. Зекриева, Л.Ф. Галлямова, А.Х. Нургалиева,
Э.К. Хуснутдинова

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа

Введение. Рак желудка (РЖ) — злокачественная опухоль слизистой оболочки желудка, характеризующаяся

высоким метастатическим потенциалом и плохим прогнозом. Данное заболевание является многофакторным, и в его основе лежит наследственная предрасположенность.

Матриксные металлопротеиназы (ММР) — семейство цинкосодержащих эндопептидаз, катализирующих реакции деградации компонентов внеклеточного матрикса. ММР играют центральную роль в обмене белков соединительной ткани, в процессах нормального развития и ремоделирования клеточного матрикса, опухолевой трансформации и метастазирования и др.

Одним из первых шагов в метастазировании является деградация базальной мембраны — процесс, в котором участвуют ММР. Для генов ММР, как и для многих других генов, характерен полиморфизм. Так, полиморфный локус rs2276109 гена *MMP12* оказывает влияние на связывание транскрипционного фактора AP-1 со своим респонсивным элементом в промоторе гена. Выявлено, что для участка, содержащего аллель А, это связывание более эффективно. Для аллеля G показана ассоциация со сниженным уровнем транскрипции гена *MMP12*.

Цель исследования — поиск ассоциаций полиморфного варианта rs2276109 гена *MMP12* с риском развития РЖ для жителей Республики Башкортостан (РБ).

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы ДНК 314 пациентов с РЖ и 324 здоровых донора. ДНК была выделена из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Генотипирование проводилось с помощью метода ПЦР-ПДРФ.

В распределении частот аллелей и генотипов полиморфного локуса rs2276109 гена *MMP12* среди больных РЖ и здоровых индивидов выявлены этнические различия: аллель А и генотип АА являются для татар маркерами повышенного риска развития изучаемой патологии ($\chi^2 = 6,76$; $p = 0,009$; ОШ 2,06; 95 % ДИ 1,22–3,49 и $\chi^2 = 9,64$; $p = 0,002$; ОШ 2,55; 95 % ДИ 1,43–4,53 соответственно), а маркерами пониженного риска для этой же группы испытуемых — аллель G и генотип AG ($\chi^2 = 6,76$; $p = 0,009$; ОШ 0,49; 95 % ДИ 0,29–0,82 и $\chi^2 = 11,75$; $p = 0,001$; ОШ 0,35; 95 % ДИ 0,19–0,63 соответственно).

Также проведенный нами анализ выявил, что у пациентов с III стадией развития опухоли достоверно чаще обнаруживаются аллель А и генотип АА по сравнению с контрольной выборкой ($\chi^2 = 4,52$; $p = 0,034$; ОШ 1,65; 95 % ДИ 1,06–2,57 и $\chi^2 = 4,66$; $p = 0,031$; ОШ 1,72; 95 % ДИ 1,07–2,76 соответственно). Кроме того, показано, что эти же аллельные варианты достоверно чаще встречаются у пациентов с высоко- и умеренно-дифференцированным РЖ по сравнению с группой здоровых доноров ($\chi^2 = 4,26$; $p = 0,039$; ОШ 1,80; 95 % ДИ 1,06–3,08 и $\chi^2 = 4,76$; $p = 0,029$; ОШ 1,95; 95 % ДИ 1,10–3,45 соответственно).

Заключение. Таким образом, показано, что полиморфный вариант rs2276109 гена *MMP12* может

вносить вклад в структуру генетической предрасположенности населения РБ к развитию РЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-44-020497 p_a) и в рамках программы поддержки биоресурсных коллекций ФАНО.

Экспрессия мРНК раково-тестикулярных генов при разных формах роста опухоли у больных раком эндометрия

А.В. Калугин¹, Д.В. Новиков^{1,2}, Е.Ю. Конторщикова³,
В.В. Новиков^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород;

²ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной», Нижний Новгород;

³ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», Нижний Новгород

Несвоевременная диагностика и неадекватный мониторинг новообразований влияют на увеличение заболеваемости раком и смертности от него. Известна группа раково-тестикулярных (РТ) генов, экспрессируемых только зародышевыми и опухолевыми клетками различного генеза. В клетках рака эндометрия (РЭ) экспрессия РТ-генов слабо изучена.

Цель исследования — сравнить частоту детекции мРНК РТ-генов *MAGEA(1-6)*, *SSX1*, 2, 4, *XAGE1*, *NY-ESO1*, *MAGEC1* с формой макроскопического роста РЭ.

С помощью ОТ-ПЦР выявляли мРНК РТ-генов в 52 образцах опухолей и 54 образцах крови больных РЭ. Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия χ^2 .

В экзофитных опухолях выявлены мРНК *MAGEA(1-6)* (50 %), *SSX1*, 2, 4 (30 %), *XAGE1* (10 %) и *NY-ESO1* (10 %), а в эндофитных — мРНК *SSX1*, 2, 4 (38 %), *MAGEA(1-6)* (33 %), *XAGE1* (33 %), *NY-ESO1* (10 %), *MAGEC1* (5 %). В опухолях со смешанным (экзо- и эндофитным) ростом выявлялись мРНК *MAGEA(1-6)* (76 %), *SSX1*, 2, 4 (43 %), *XAGE1* (19 %), *MAGEC1* (10 %), *NY-ESO1* (5 %). Суммарная частота детекции мРНК РТ-генов в экзофитных опухолях — 70 %, в эндофитных — 62 %, в смешанных — 91 %. В крови при экзофитном росте опухоли обнаружены только мРНК *MAGEA(1-6)* (10 %) и *NY-ESO1* (10 %), при эндофитном росте — мРНК *XAGE1* (19 %), *MAGEA(1-6)* (14 %), *SSX1*, 2, 4 (10 %) и *MAGEC1* (5 %). При смешанном росте опухоли в крови выявлены мРНК *NY-ESO1* (22 %), *XAGE1* (17 %), *MAGEA(1-6)* (17 %), *SSX1*, 2, 4 (13 %), *MAGEC1* (5 %). Суммарная частота детекции мРНК РТ-генов в крови при экзофитном росте — 20 %, при эндофитном росте — 33 %, при смешанном — 65 %. При сравнении больных с разными формами роста опухоли обнаружено, что в опухолях со смешанным ростом частота детекции мРНК *MAGEA(1-6)* ($p = 0,005$) и суммарная частота детекции мРНК РТ-генов ($p = 0,03$)

статистически значимо выше, чем в эндофитных опухолях. В крови тех же больных выявлены статистически значимые различия по суммарной частоте детекции мРНК РТ-генов между смешанным и экзофитным ростом ($p = 0,02$), а также между смешанным и эндофитным ростом опухоли ($p = 0,03$). Таким образом, более высокая частота выявления мРНК *MAGEA(1-6)*, *SSX1*, 2, 4, *XAGE1*, *NY-ESO1*, *MAGEC1* в крови и опухолях наблюдается при смешанной форме макроскопического роста РЭ.

Экспрессия мРНК раково-тестикулярных генов при различных размерах узлов у больных с миомой матки

А.В. Калугин¹, Д.В. Новиков^{1,2}, Е.Ю. Конторщикова³,
М.Е. Мамаева⁴, В.В. Новиков^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород;

²ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной», Нижний Новгород;

³ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н.А. Семашко», Нижний Новгород;

⁴ФБУЗ «Приволжский областной медицинский центр» ФМБА России, Нижний Новгород

Этиология и патогенез миомы матки (ММ) окончательно не установлены. В их уточнении может помочь исследование экспрессии раково-тестикулярных (РТ) генов, активных только в эмбриональных, гаметогенных и опухолевых клетках. В клетках ММ их экспрессия практически не изучена.

Цель исследования — сравнить частоту выявления мРНК РТ-генов *MAGEA(1-6)*, *SSX1*, 2, 4, *XAGE1*, *NY-ESO1*, *MAGEC1* с диаметром узлов ММ.

Матричные РНК РТ-генов выявляли в образцах узлов и крови 61 пациентки с ММ методом ОТ-ПЦР. Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия χ^2 .

В миоматозных узлах диаметром менее 5 см обнаружены мРНК *MAGEA(1-6)* (61 %), *SSX1*, 2, 4 (22 %), *XAGE1* (17 %), *MAGEC1* (11 %), а в узлах диаметром 5 см и более — мРНК *MAGEA(1-6)* (67 %), *SSX1*, 2, 4 (42 %), *XAGE1* (16 %), *MAGEC1* (14 %). Суммарная частота детекции мРНК РТ-генов в узлах диаметром менее 5 см — 83 %, а в узлах диаметром 5 см и более — 86 %. В крови больных с узлами диаметром менее 5 см выявлены мРНК *MAGEA(1-6)* (22 %), *XAGE1* (11 %), *SSX1*, 2, 4 (5 %), *MAGEC1* (5 %), а в крови больных с узлами диаметром 5 см и более — мРНК *MAGEA(1-6)* (32 %), *SSX1*, 2, 4 (23 %), *XAGE1* (21 %), *NY-ESO1* (7 %), *MAGEC1* (2 %). Суммарная частота детекции мРНК РТ-генов в крови больных с узлами диаметром менее 5 см — 39 %, а в узлах диаметром 5 см и более — 49 %. При увеличении диаметра узлов у больных ММ обнаружена тенденция к повышению частоты детекции мРНК *MAGEA(1-6)*, *SSX1*, 2, 4, *MAGEC1* и суммарной

частоты детекции тестированных мРНК в узлах. При этом в крови выявлена тенденция к повышению частоты детекции мРНК *MAGEA(1-6)*, *SSX1*, 2, 4, *XAGE1* и к снижению частоты детекции мРНК *MAGEC1* у больных с диаметром узла 5 см и более. Матричная РНК *NY-ESO1* выявлялась в крови только тех больных ММ, у которых диаметр узлов достигал 5 см и более. Суммарная частота детекции мРНК РТ-генов в крови имела тенденцию к повышению при увеличении диаметра узлов, но статистически значимой связи между частотой детекции мРНК РТ-генов в крови и диаметром узлов у больных ММ не выявлено.

Определение аффинности панели моноклональных антител к мимотопу W275–L287 трансмембранного андроген-индуцированного белка предстательной железы I

М.С. Карбышев¹, П.К. Кузьмичев², К.В. Смирнова^{1,3},
А.М. Власов⁴

¹ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

⁴ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Введение. На современном этапе развития диагностики и терапии злокачественных новообразований все более актуальным становится поиск новых прогностических и предиктивных биомаркеров, как геномных, так и белковых. Одним из таких новых потенциальных биомаркеров является трансмембранный андроген-индуцированный белок предстательной железы (ТМЕРАI) — монотопический интегральный белок 1-го типа, вовлеченный в целый ряд значимых внутриклеточных сигнальных путей, в частности TGF- β , Wnt и EGF. По данным источников литературы и собственных исследований необходимо отметить органоспецифические особенности представленности ТМЕРАI в тканях в зависимости от локализации процесса малигнизации.

Цель исследования — определить кинетические параметры и константы аффинности МА к синтетическому мимотопу W275–L287 трансмембранного антигена ТМЕРАI.

Материалы и методы. Эксперименты выполняли с использованием прибора Biacore T200 (GE Healthcare) при 25 °С. Пептидные лиганды (мимотоп W275–L287 ТМЕРАI) иммобилизовали на CM5-чипах (GE Healthcare), применяя NHS-EDC-метод. Относительный уровень

иммобилизации составлял ~2500 RU. В качестве анализов использовались препараты аффинно-очищенных МА (2E1, 6C6 и 10A7) в диапазоне концентраций 1 нМ — 100 мкМ. Анализ полученных сенсограмм для определения динамических констант (k_{on} , k_{off} и K_d) проводили, применяя кинетическую модель связывания Langmuir 1: 1.

Результаты. Анализ связывания исследуемых МА с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса позволил количественно определить сродство к синтетическому пептиду — мимотопу W275–L287 белка ТМЕРАI. Наиболее высокой аффинностью обладало МА 10A7 (K_d $1,90 \pm 0,21 \times 10^{-8}$ М), в свою очередь, для антител 2E1 (K_d $4,30 \pm 0,84 \times 10^{-7}$ М) и 6C6 (K_d $7,90 \pm 0,21 \times 10^{-6}$ М) экспериментально установлено более низкое сродство к исследуемому антигену.

Заключение. Получение, валидация и характеристика МА для качественного и количественного определения ТМЕРАI в образцах тканей являются перспективным направлением совершенствования системы предиктивной диагностики.

Выявление мутаций генов TP53, BRAF и семейства Ras при плоскоклеточном раке языка

А.В. Мурзаева, М.В. Конова, Р.Ф. Зибиров,
А.П. Шинкаркина

МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск

Введение. Злокачественные опухоли органов и тканей головы и шеи составляют не более 20 % общей структуры онкологической заболеваемости (Каприн А.Д. и соавт., 2018). Плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта составляет 95 % всех злокачественных новообразований полости рта, 65 % занимают опухоли языка и дна ротовой полости, которые характеризуются резистентностью к ХТ, частыми рецидивами и плохим прогнозом (Chaturvedi A.K. и соавт., 2013).

Несмотря на многочисленные исследования мутационных и экспрессионных характеристик опухолей головы и шеи, по-прежнему отсутствуют чувствительные предиктивные маркеры как для раннего выявления, так и для персонализированного лечения этих раков (Nakagaki E. и соавт., 2017).

Цель исследования — проведение анализа мутаций генов семейства RAS (KRAS, NRAS, HRAS), *BRAF* и *TP53* у пациентов с плоскоклеточным раком языка.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты с морфологически верифицированным плоскоклеточным раком языка с T2–T4 стадией до проведения противоопухолевой терапии, получавшие оперативное лечение в МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

Выделение ДНК из фиксированной в формалине и заключенной в парафин ткани проводили

с использованием набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия).

Для выявления мутаций использовали секвенирование по Сэнгеру на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, США).

Результаты. В исследование были включены 17 человек в возрасте от 33 до 77 лет (средний возраст — 57 лет), среди них 4 (24 %) — женщины и 13 (76 %) — мужчины. У всех был определен статус генов *BRAF* (15-й экзон), *KRAS* (2-й экзон) и *NRAS* (2-й и 3-й экзоны). Мутационный статус 3-го экзона гена *HRAS* и 4–9-го экзона гена *TP53* был определен только у 10 из них.

В 1 случае была выявлена мутация V600E гена *BRAF* (6 %) и также в 1 случае — мутация G12D гена *NRAS*. В исследуемых экзонах генов *KRAS* и *HRAS* мутаций не было обнаружено.

Мутации в гене *TP53* были выявлены у 7 пациентов из 10 (70 %). Нонсенс-мутация 4-го экзона K319* обнаружена у 2 человек, у 1 из них также выявлена миссенс-мутация 5-го экзона H179R. В 1 случае отмечалась миссенс-мутация 4-го экзона L111Q, в 1 случае — делеция 5-го экзона P152Rfs*24. Миссенс-мутация 8-го экзона R273H выявлена в 2 случаях, R282W — в 1 случае.

У 2 пациентов выявлен полиморфизм в 6-м экзоне p.R213R (с. 639A>G).

Заключение. Мутации гена-супрессора *TP53* являются наиболее частым генетическим событием при плоскоклеточном раке языка и могут рассматриваться как потенциальный молекулярный фактор для диагностики, прогноза и оценки клинического ответа на терапию у данных пациентов.

Анализ экспрессии генов семейства *MAGE* у больных с впервые диагностированной множественной миеломой

А.М. Сергеева, В.Л. Сурин, Л.П. Менделеева

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва

Введение. Высокий уровень экспрессии генов семейства melanoma antigen (*MAGE*) наблюдается в образцах опухоли у больных с первично диагностированной множественной миеломой (ММ) и во время прогрессии заболевания. Семейство белков *MAGE* обладает высокой иммуногенностью, поэтому представляет собой перспективную мишень для таргетных иммунотерапевтических препаратов. В данной работе мы сопоставили уровень экспрессии генов семейства *MAGE* (*MAGEC1*, *MAGEC2*, *MAGEC3*, *MAGEA3*) с показателями общей выживаемости и временем до прогрессирования/рецидива ММ.

Материалы и методы. Анализ экспрессии генов проводился на тотальной фракции РНК, выделенной из CD138⁺-клеток костного мозга 52 больных множественной миеломой и 10 доноров. Количественно

оценивали экспрессию генов с помощью метода РНК-секвенирования (HiSeq, Illumina, США) с последующим анализом полученных данных с помощью программ STAR и DESeq2. Статистическую обработку выполняли с помощью программного пакета Statistica 10.0.

Результаты. Экспрессия генов *MAGEC1*, *MAGEC2*, *MAGEC3*, *MAGEA3* была повышена в 82,7, 90,4, 73,1 и 39,6 % случаев соответственно по сравнению с уровнем экспрессии этих генов у доноров. Сравнение групп доноров и больных ММ с помощью критерия Манна—Уитни показало, что различия в экспрессии всех 4 генов статистически значимы ($p < 0,05$). Согласно анализу выживаемости повышенная экспрессия генов семейства *MAGE* оказывает влияние на выживаемость и время до прогрессии больных ММ.

Заключение. Данный критерий может быть использован как прогностический признак для больных с впервые диагностированной ММ.

Экспрессия молекулярных маркеров в опухоли желудка, связь с эффективностью неоадьювантной химиотерапии

Л.В. Спирина^{1,2}, А.В. Августининович¹, С.Г. Афанасьев¹,
А.Ю. Добродеев¹, М.Ю. Волков¹, У.Б. Урмонов¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Введение. Наиболее универсальным подходом для оценки эффективности противоопухолевой терапии является изучение компонентов сигнальных каскадов, активирующихся под влиянием ростовых факторов.

Цель исследования — оценка экспрессии транскрипционных факторов NF-κB p65 и NF-κB p50, HIF-1α, HIF-2α, ростовых факторов VEGF, CAIX и VEGFR2, компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути и экспрессии PD, PD-L1, PD-L2 у больных раком желудка в зависимости от эффекта комбинированного лечения.

Материалы и методы. В исследование были включены 20 больных аденокарциномой желудка. Частичная регрессия опухоли была выявлена у 9 пациентов, стабилизация — у 6 и прогрессирование — у 5. Материалом исследования были нормальная и опухолевая ткани, полученные при проведении диагностической гастроскопии у пациентов. Уровень мРНК изучаемых показателей определялся методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. В результате проведенного исследования выявлена связь эффективности НХТ с экспрессией киназ GSK-3β (тест Краскела—Уоллиса, $p = 0,003$), 70s 6 (тест Краскела—Уоллиса, $p = 0,0048$), ядерного фактора NF-κB p65 (тест Краскела—Уоллиса, $p = 0,0025$). Увеличение уровня мРНК данных

маркеров было отмечено у пациентов со стабилизацией процесса и прогрессированием по сравнению с пациентами с частичной регрессией. Выявлено повышение уровня мРНК PD-L1 (тест Краскела—Уоллиса, $p = 0,047$), PD-L2 (тест Краскела—Уоллиса, $p = 0,0004$) у пациентов по мере снижения эффекта от лечения.

Имеются данные, что ядерный фактор NF-κB способен индуцировать трансформацию нормальных клеток в опухолевые, влияя на прогноз заболевания и эффективность противоопухолевой терапии. При этом ингибирование активности GSK-3β способно стимулировать апоптоз.

Закключение. Таким образом, выявлено, что прогрессирование рака желудка протекает на фоне высоких уровней GSK-3β, киназы 70s 6 и NF-κB, что сопровождается гиперэкспрессией PD-L1 и PD-L2 в опухоли.

Связь молекулярных маркеров с длительностью андроген-депривационной терапии у пациентов с раком предстательной железы

Л.В. Спирина^{1,2}, Е.А. Уснин¹, А.К. Горбунов¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Введение. РПЖ является одной из актуальных проблем современной онкологии. Согласно современным рекомендациям андроген-депривационная терапия (АДТ) является стандартом в лечении пациентов с местно-распространенным и метастатическим РПЖ.

Цель исследования — изучение роли молекулярных маркеров в прогнозировании ожидаемой продолжительности эффекта на АДТ у пациентов с местно-распространенным и диссеминированным РПЖ.

Материалы и методы. В исследование включены 48 больных местно-распространенным и метастатическим РПЖ, которые были разделены на 2 группы в зависимости от длительности проведения АДТ. Эффект терапии, реализующийся в сроки до 12 мес от ее начала, был отмечен у 23 пациентов (1-я группа) и у 25 больных — более 12 мес (2-я группа). Экспрессия AR, ERα, ERβ оценивалась методом ПЦР в реальном времени. Уровень ПСА и тестостерона определяли ИФА-методом.

Результаты. В исследовании показано, что высокая экспрессия в ткани опухоли AR на фоне низкой экспрессии ERα характерна для пациентов, у которых эффект от проводимой АДТ отмечался в течение 12 мес. Выявлена совокупность параметров, позволяющая спрогнозировать продолжительность ответа на АДТ у больных РПЖ, к которым относят возраст пациента, уровень тестостерона, ПСА, уровень экспрессии AR, ERα в опухоли. Эти данные позволяют

рассматривать эти факторы в качестве дополнительных информативных маркеров для прогнозирования не только ожидаемого эффекта, но и его продолжительности.

Закключение. Таким образом, определена совокупность информативных параметров, анализ которых позволяет прогнозировать продолжительность ожидаемого ответа на АДТ у больных РПЖ. Эти данные необходимо учитывать при планировании адекватной тактики лечения, сроков ее проведения и динамического наблюдения у больных с местно-распространенным и метастатическим РПЖ.

Антигликановые антитела в диагностике колоректального рака

А.А. Тихонов¹, М.А. Черниченко², В.И. Бутвиловская¹,
Г.У. Фейзханова¹, Д.В. Сидоров², Н.Е. Кушлинский³,
А.Ю. Рубина¹

¹ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

²МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал

ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. КРР на ранних стадиях диагностируется довольно редко из-за бессимптомного клинического течения, поэтому проблема выявления этого заболевания на начальных этапах с помощью минимально инвазивных методов в настоящее время является чрезвычайно актуальной. Одним из методов обнаружения опухоли является определение серологических молекулярных маркеров. Известно, что паттерн гликозилирования клеток изменяется во время злокачественной трансформации. В таких случаях опухольассоциированные гликаны могут распознаваться антигликановыми антителами, которые могут быть обнаружены в сыворотке крови на ранних стадиях рака.

Цель исследования — оценка профилей антигликановых антител различных классов с целью выявления возможных диагностических биомаркеров КРР.

Материалы и методы. Нами был разработан подход на основе гидрогелевых микрочипов для одновременного определения антител IgG и IgM к 51-му гликану в образцах сыворотки 44 пациентов с КРР с I—III стадиями заболевания и 53 здоровых доноров. ROC-анализ, логистическая регрессия, тест Краскела—Уоллиса и расчет 95 % ДИ проводились с использованием программного обеспечения MedCalc 14.8.1. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Мы обнаружили, что уровень антител IgG к гликану 3'O-su-Lea позволяет идентифицировать пациентов с КРР с чувствительностью 70 % и специфичностью 63 %. Доля верно предсказанных случаев КРР с использованием комбинации 2 маркеров, IgM-антител против гликанов 3'Sialyl-TF и 3'O-su-Lea,

составила 75 %. Наряду с этим уровень IgM-антител к гликану 3'O-su-Lea значительно отличался у пациентов с регионарными метастазами по сравнению с пациентами без них. Уровни антител изотипов М или G значительно различались также у пациентов с разной локализацией опухоли и различной дифференцировкой.

Заключение. В результате исследования нами определены профили антител IgM и IgG к гликанам в разных популяциях пациентов, а также найдены потенциальные биомаркеры и их комбинации для диагностики заболевания и возможного контроля терапии.

Изучение экспрессии маркеров ангиогенеза при почечно-клеточном раке

Ю.А. Хоченкова, Ю.С. Мачкова, Э.Ш. Соломко,
С.А. Ашуба

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Опухолевый ангиогенез играет ключевую роль в развитии метастатического ПКР, а сигнальные пути ангиогенеза являются одной из основных мишеней при таргетной терапии ингибиторами рецепторных тирозинкиназ (РТК), такими как сунитиниб, нацеленный на VEGF- и PDGF-зависимые ангиогенные пути. Несмотря на достигнутые результаты в молекулярной диагностике ПКР, гетерогенность метастатической опухоли может нивелировать данные, полученные при исследовании точечного образца опухоли.

Цель исследования — изучить влияние экспрессии рецепторных тирозинкиназ: VEGFR1, VEGFR2, PDGFR α , PDGFR β — на характеристики первичной опухоли.

Материалы и методы. В исследование были включены 52 пациента с установленным диагнозом ПКР. Экспрессию РТК определяли методом ИГХ-анализа с использованием антител к VEGFR1–2, FGFR1–2, PDGFR α и - β и системой визуализации Histostain plus (Invitrogen). Экспрессию маркеров определяли полуквантитетным методом с оценкой интенсивности окрашивания.

Результаты. Изучение экспрессии РТК на опухолевых клетках было выполнено на 52 образцах опухоли. Экспрессия РТК была обнаружена в цитоплазме и ядрах опухолевых клеток всех исследованных образцов. Не установлено корреляции между экспрессией РТК и возрастом пациентов с ПКР, размером опухоли, стадией заболевания или гистологическим типом опухоли. При этом экспрессия VEGFR1, VEGFR2 была определена на большем количестве опухолевых клеток (80–85 %), чем экспрессия других исследованных РТК. Экспрессия PDGFR α , PDGFR β , FGFR1 и FGFR2 была установлена на 50–65 % опухолей. Интенсивность окраски и количество VEGFR1, VEGFR2 позитивно

окрашенных клеток коррелировали с количеством пораженных метастазами органов. Не было установлено корреляции между экспрессией PDGFR α , PDGFR β , FGFR1 и FGFR2 и метастатическим поражением.

Заключение. Определение высокой экспрессии VEGFR1 и VEGFR2 в первичных опухолях пациентов с ПКР может являться прогностическим фактором наличия метастазов при ПКР.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (проект № 19-015-00476).*

Копийность генов метаболизма и рецепции эстрогенов во внеклеточной ДНК — потенциальный маркер диагностики серозной аденокарциномы яичника

М.Р. Цандекова, Д.С. Кутилин

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. РЯ — ведущая причина смерти от гинекологических злокачественных опухолей. Серозная аденокарцинома является наиболее распространенным подтипом РЯ. В настоящее время не существует установленного скринингового теста на серозную аденокарциному яичников, что препятствует выявлению этого заболевания на ранней стадии. Для разработки эффективных и малоинвазивных методов ранней диагностики необходим скрининг молекулярных маркеров во внеклеточной ДНК плазмы крови. Ранее нами было показано изменение копийности генов, регулирующих метаболизм эстрогена в опухолевых клетках серозной аденокарциномы.

Цель исследования — анализ копийности генов метаболизма и рецепции эстрогенов во внеклеточной ДНК больных серозной аденокарциномой яичников и в крови условно здоровых доноров.

Материалы и методы. Клиническим материалом для исследования послужила плазма крови 50 больных серозной аденокарциномой яичников, взятая до операции, а также плазма крови 30 условно здоровых доноров (без онкологических заболеваний). Образцы крови разделяли на плазму и фракцию клеток центрифугированием, из плазмы крови выделяли ДНК фенол-хлороформным методом. Определение копийности 10 генов (*CYP11A1*, *CYP11A2*, *CYP11B1*, *CYP19A*, *ESR1*, *ESR2*, *GPER*, *STS*, *SULT1A*, *SULT1E1*) проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (референсные гены — *B2M*, *GAPDH*). Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна—Уитни.

Результаты. Обнаружены статистически значимое ($p < 0,005$) увеличение копийности генов *CYP11B1* и *ESR1* в 3 и 5 раз соответственно и снижение копийности гена *ESR2* в 2 раза во внеклеточной ДНК плазмы крови

у 85 % обследованных больных серозной аденокарциномой яичников относительно внеклеточной ДНК плазмы крови условно здоровых доноров. У 20 % больных во внеклеточной ДНК наблюдалось только снижение копийности гена *ESR2* в 1,8 раза ($p < 0,05$), а у 5 % больных отсутствовали изменения в копийности генов относительно условно здоровых доноров.

Заключение. Анализ копийности генов во внеклеточной ДНК больных серозной аденокарциномой яичников позволил выявить наиболее характерные малоинвазивные маркеры этого заболевания — *CYP1B1*, *ESR1* и *ESR2*.

ОНКОВИРУСОЛОГИЯ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

Доклады

Физический статус вируса папилломы человека в прогнозе рецидивирования цервикальных интраэпителиальных неоплазий

М.К. Ибрагимова^{1,2}, О.Н. Чуруксаева¹, М.М. Цыганов^{1,2},
Л.А. Коломиец^{1,3}, Н.В. Литвяков^{1,2}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

Введение. Согласно результатам предыдущих исследований показано, что физический статус ВПЧ является прогностическим фактором при РШМ и с помощью его определения можно прогнозировать исход заболевания у больных. Для формирования групп риска и планирования агрессивности терапии прогноз возникновения рецидивов важен не только при опухолевых заболеваниях шейки матки, но и при интраэпителиальной неоплазии низкой и высокой степени (LSIL/HSIL). Мы предположили, что физический статус ВПЧ, как и при РШМ, будет иметь прогностическую значимость при LSIL/HSIL.

Цель исследования — изучение прогностической значимости физического статуса ВПЧ 16-го типа в отношении возникновения рецидивов интраэпителиальных неоплазий.

Материалы и методы. В исследование были включены 208 пациенток с ВПЧ16: 76 — без морфологических изменений шейки матки, 20 — с LSIL, 112 — с HSIL. Материалом служили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки. Всем пациенткам было проведено комплексное обследование: гинекологический осмотр, кольпоскопия, цитологическое и гистологическое исследования, вирусологическое исследование (определение физического статуса ДНК ВПЧ).

Результаты. По мере изменения морфологической перестройки эпителия шейки матки: от пациенток без морфологических изменений эпителия к пациенткам с HSIL увеличивалась частота встречаемости интегрированных и смешанных форм ВПЧ, тогда

как частота эписомальных форм ВПЧ снижалась по аналогичному принципу ($p = 0,0002$). Далее был проведен анализ риска возникновения рецидивов при LSIL и HSIL в зависимости от степени дисплазии и вирусологических показателей (вирусной нагрузки и физического статуса вируса). Статистический анализ (*log-rank-test*) показал, что среди ВПЧ16-положительных пациенток частота рецидивирования зависит от степени тяжести дисплазии ($p = 0,021$) и интеграции вируса ($p = 0,000$). В связи с этим было построено уравнение регрессии Кокса, позволяющее создать прогностическую модель возникновения рецидивов у ВПЧ-положительных пациенток, которое учитывало оба статистически значимых показателя в качестве переменных. Критерий Кокса выявил, что значимый вклад в частоту рецидивирования вносит только статус ВПЧ ($p = 0,006$), степень дисплазии оказалась незначимой ($p = 0,126$). Таким образом, несмотря на то что в клиническом плане тяжесть дисплазии определяет в последующем риск рецидивирования, согласно результатам проведенного исследования достоверным фактором для определения частоты возникновения рецидива признан физический статус ВПЧ 16-го генотипа.

Применение логистической регрессии для предсказания вероятности возникновения риска рецидивирования при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях различной степени тяжести в зависимости от степени дисплазии и физического статуса вируса:

$$f(y) = 1/(1 + e^{-y}) — \text{логистическая функция};$$

$$y = 0,594 \times a1 + 1,196 \times a2,$$

где: $a1$ — степень дисплазии; $a2$ — физический статус ВПЧ.

Заключение. Установлено, что частота возникновения рецидивов при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях различной степени тяжести определяется физическим статусом ВПЧ16.

Результаты метаанализов ассоциации вируса папилломы человека с риском развития колоректального рака, рака гортани и ротоглотки, рака молочной железы и рака легкого

Н.В. Литвяков, М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов,
В.А. Бычков, А.М. Певзнер

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Вирус папилломы человека все более активно рассматривается в качестве этиологического фактора не только РШМ, но также и опухолей других локализаций. Нами проведены метаанализы ассоциации ВПЧ с риском развития опухолей 4 локализаций: толстого кишечника, гортани и ротоглотки, молочной железы и легкого. Анализ выполняли с помощью программы Comprehensive Meta-Analysis 3.0. Исследования в метаанализ отбирали в том случае, если определение ВПЧ в опухоли проводили методом ПЦР и был контроль в виде нормальной ткани этого же органа.

В метаанализ по КРР было включено 19 публикаций (2049 опухолей и 830 образцов нормальной ткани). Частота ВПЧ в опухоли составила 16 %, в нормальной ткани — 3 %. В результате метаанализа установлен статистически значимый уровень распространенности ВПЧ в опухолевой ткани, результирующий относительный риск развития КРР при ВПЧ-инфекции составил 2,97 (95 % ДИ 1,42–6,22; $p = 0,0039$) (Ибрагимова М.К. и соавт., 2018).

Для рака гортани и ротоглотки был проведен анализ 18 метаанализов (Bychkov V.A. и соавт., 2016) с общим числом больных 57 695. Показана высокая частота инфицированности ВПЧ карцином головы и шеи — 43 (26–73) %.

Метаанализ для РМЖ включал 28 исследований (2446 опухолей молочной железы и 1144 образца нормальной ткани). Показатель относительного риска развития РМЖ при ВПЧ-инфекции составил 3,6 (95 % ДИ 2,3–5,6; $p = 2,82 \times 10^{-8}$) (Ибрагимова М.К. и соавт., 2018).

Метаанализ для рака легкого включал 26 публикаций (2625 опухолей и 1338 образцов нормальной ткани легких) (Tsyganov M.M. и соавт., 2019). Установлен статистически значимый уровень распространенности ВПЧ в опухолевой ткани легкого по сравнению с таковым в нормальной ткани легкого, результирующий относительный риск развития рака легкого при любом типе ВПЧ составил 3,49 (95 % ДИ 2,43–5,01; $p = 0,000001$).

Таким образом, метаанализы показывают значительный относительный риск развития рака легкого, гортани и ротоглотки, прямой и толстой кишки и РМЖ при инфекции ВПЧ. Предполагают, что ВПЧ может быть этиологическим фактором для всех опухолей, развивающихся из эпителия эктодермального происхождения. Возможен прямой путь проникновения

вируса, например при сексуальных контактах (шейка матки, толстый кишечник, ротовая полость, легкие, пищевод), и непрямой — через кровь (молочная железа).

Вирус Эпштейна–Барр в России, особенности молекулярной диагностики ВЭБ-ассоциированных заболеваний человека

К.В. Смирнова, А.К. Лубенская, Н.Б. Сениута,
В.Э. Гуревич

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Причиной поздней диагностики рака носоглотки (РНГ) являются длительное бессимптомное течение патологического процесса, анатомическое строение носоглотки, часто маленькое, визуальное и эндоскопически не обнаруживаемое новообразование и другие факторы. При этом доказано, что этиологическим агентом при наиболее часто встречающемся недифференцированном неороговевающем гистологическом типе РНГ (нРНГ) является ВЭБ.

Цель исследования — использование маркеров ВЭБ для первичной диагностики нРНГ в группе больных с невыявленным первичным очагом опухоли.

Материалы и методы. Материалом для исследования служила плазма крови 83 больных с метастатическим поражением шейных лимфатических узлов и не установленной локализацией первичной опухоли, которую тестировали на содержание и титры IgG- и IgA-антител к вирусному капсидному антигену ВЭБ и концентрацию вирусной ДНК.

Результаты. Полученные результаты свидетельствуют о том, что совместное тестирование плазмы крови на ВЭБ-специфические антитела и вирусную нагрузку является полезным инструментом для предварительного скрининга нРНГ, что подтверждается данными последующих морфологических и инструментальных исследований, устанавливающих окончательный диагноз. На нескольких примерах также показано, что концентрация вирусной ДНК в плазме крови больных нРНГ отражает эффект проведенной терапии и прогноз заболевания: ремиссию, стабилизацию опухолевого процесса, рецидив или метастазирование.

Заключение. Обнаружено, что, хотя титры вирус-специфических антител менее точно, чем концентрация вирусной ДНК в плазме, отражают клинические проявления заболевания, серологические маркеры чрезвычайно важны для предварительной диагностики нРНГ в случаях невыявленного первичного очага опухоли. Они также полезны для первичного скрининга этого новообразования среди лиц из группы риска.

Работа выполнена при финансовой поддержке
РНФ (грант № 18-015-00505А).

Селективная доставка целевых генов в клетки нейронального происхождения с помощью лентивирусных частиц, псевдотипированных белком оболочки эндогенного ретровируса мышей *Mus caroli*

П.В. Спирин¹, А.А. Шульгин^{1,2}, О.О. Асташкова²,
Е.Ю. Григорук², Т.Д. Лебедев¹, Э.Р. Ваганова^{1,2},
О.Г. Леонова¹, В.И. Попенко¹, П.М. Рубцов¹, С. Stocking³,
V.S. Prassolov¹

¹ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)», Москва;

³Департамент клеточной трансплантологии, Медицинский
центр университета Гамбурга-Эппендорф,
Гамбург, Германия

Разработка новых эффективных подходов к селективной доставке терапевтических генов в злокачественные клетки является актуальной задачей, поскольку представляет существенный интерес как для фундаментальной науки, так и для прикладной биомедицины.

Нами были сконструированы рекомбинантные лентивирусные векторные частицы, псевдотипированные с помощью белка оболочки эндогенного ретровируса мыши *Mus caroli* (McERV). Было показано, что использование таких частиц может обеспечивать селективное введение целевых генов (маркерных или терапевтических) в клетки, экспрессирующие протеолипид плазмолипид (PLLP) *in vitro*. Экспрессия данного белка является характерной для клеток глиальной природы и злокачественных клеток глиального происхождения, в частности глиобластомы и астроцитомы. Также на модели ксенографтной опухоли, индуцированной у мыши, было показано, что сконструированные лентивирусные частицы позволяют осуществлять селективную доставку маркерных генов в клетки глиобластомы *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (проекты № 17-29-06049 и № 17-04-01555).

Тезисы

ВПЧ-статус пациенток с преинвазивными повреждениями эпителия шейки матки

Т.А. Димитриади^{1,2}, Д.В. Бурцев^{1,2}, Е. А. Дженкова³,
А.Ф. Михельсон², Е.Ю. Лебеденко², Т.О. Холодная¹

¹ГАОУ РО «Областной консультативно-диагностический центр», Ростов-на-Дону;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

³ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. ВПЧ является одной из наиболее распространенных инфекций в мире и относится к инфекционным агентам с достоверно доказанной ролью в возникновении специфических злокачественных новообразований шейки матки, полового члена, вульвы, влагалища, анального канала, полости рта, глотки, гортани и др. В России РШМ занимает 2-е место в структуре онкологических заболеваний среди женщин в возрасте до 45 лет и 1-е место в структуре смертности от рака среди женщин в возрасте 30–35 лет. У 70 % девушек в возрасте до 25 лет РШМ диагностируется только на поздних стадиях (III и IV).

Цель исследования — оценить ВПЧ-статус пациенток с плоскоклеточными интраэпителиальными поражениями низкого (LSIL) и высокого (HSIL) риска в цитологических мазках.

Материалы и методы. В исследование были включены 2162 ВПЧ-положительные пациентки в возрасте 19–39 лет, обследованные в рамках региональной программы скрининга РШМ в Ростовской области в период с 2014 по 2017 г. Методы исследования: жидкостная цитология, ВПЧ-тест ПЦР в реальном времени, кольпоскопия с видеорегистрацией, биопсия шейки матки методом петлевой электрорадиохирургической эксцизии.

Результаты. С 2014 по 2017 г. было выполнено 188 641 цитологическое исследование. РШМ выявлен у 0,1 % женщин, HSIL — у 0,3 %, атипические клетки неясного значения (ASCUS) — у 0,2 %, LSIL — у 12,2 %, отсутствие внутриклеточного поражения или злокачественности (NILM) — у 87,2 %.

У 1162 пациенток с гистологически подтвержденным HSIL (средний возраст $40,3 \pm 11,7$ года) средняя вирусная нагрузка составила $4,8 \pm 1,08$ Lg, клинически значимая вирусная нагрузка (2–5 Lg) наблюдалась в 74 % случаев, очень высокая вирусная нагрузка (>5 Lg) — в 26 %. ВПЧ16 отмечен в 39 % случаев, ВПЧ33 — в 15 %, ВПЧ31 — в 11 %, ВПЧ51 — в 8 %, ВПЧ56 — в 7 %, ВПЧ52 — в 6 %, ВПЧ45 — в 4 %, ВПЧ59, -58, -35 — по 2 %, ВПЧ39 — в 1 %.

Моноинфекция ВПЧ имела место у 68 % пациенток, сочетание 2 типов ВПЧ — у 27 %, 3 и более типов ВПЧ — у 5 %.

У 290 обследованных пациенток с LSIL (средний возраст $41,8 \pm 10,2$ года) в биоптатах средний показатель количественной вирусной нагрузки составил $4,6 \pm 1,7$ Lg, клинически значимая вирусная нагрузка (2–5 Lg) наблюдалась в 73 % случаев, очень высокая вирусная нагрузка (>5 Lg) — в 27 %. Преобладал ВПЧ16 — в 73 % случаев, ВПЧ52, -33 — по 6 %, ВПЧ56, -58 — по 4 %, ВПЧ18 — в 2 %, ВПЧ31 — в 3 %, ВПЧ45, -35 — по 1 %. Моноинфекция ВПЧ имела место у 57 % пациенток, сочетание 2 типов ВПЧ — у 38 %, 3 и более типов ВПЧ — у 5 %.

Заключение. Тяжесть интраэпителиальных повреждений шейки матки не играет ключевую роль в величине количественной вирусной нагрузки и частоте встречаемости более агрессивных типов ВПЧ. Необходим анализ таких данных, как возраст начала половой жизни, число половых партнеров, время последней смены партнера у пациентки к моменту обследования.

Диагностика преинвазивных и инвазивных поражений шейки матки в скрининге и ранней диагностике рака шейки матки

Т.А. Димитриади^{1,2}, Д.В. Бурцев^{1,2}, Е. А. Дженкова³,
А.Ф. Михельсон², Е.Ю. Лебеденко², Т.О. Холодная¹

¹ГАОУ РО «Областной консультативно-диагностический центр», Ростов-на-Дону;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

³ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. В последние десятилетия заболеваемость РШМ в России стабильно возрастает и в 2017 г. составила 25,2 на 100 тыс. населения. В 2017 г. средний возраст больных с впервые установленным диагнозом цервикального рака в нашей стране составил 52,1 года, средний возраст умерших — 57,4 года.

Цель исследования — оценить эффективность региональной программы скрининга РШМ методом жидкостной цитологии в Ростовской области за 5-летний период.

Материалы и методы. В лаборатории молекулярно-генетических патоморфологических исследований областного консультативно-диагностического центра выполняются исследования биоматериала из 54 медицинских

организаций, что составляет 35 % по Ростовской области. Пациенткам по месту жительства проводится забор мазков с шейки матки, биоматериал централизованно курьерской службой доставляется в лабораторию областного консультативно-диагностического центра. Второй этап диагностики — определение в клеточном материале ВПЧ высокого канцерогенного риска. ВПЧ-положительные пациентки с патологическими цитологическими мазками приглашаются в областной центр патологии шейки матки для диагностики и лечения. Методы исследования: жидкостная цитология, ВПЧ-тест ПЦР в реальном времени, кольпоскопия с видеорегистрацией, биопсия шейки матки методом петлевой электрорадиохирургической эксцизии.

Результаты. С 2014 по 2018 г. были определены патологические цитологические мазки у 54 604 пациенток. Из них обследованы в целях ранней диагностики РШМ в связи с наличием жалоб на выделения из половых путей и контактные кровомазания 30 719 женщин. РШМ был выявлен у 207 (0,7 %) женщин, плоскоклеточные интраэпителиальные поражения высокого риска (HSIL) — у 718 (2,3 %), атипические клетки неясного значения (ASCUS) — у 192 (0,6 %), плоскоклеточные интраэпителиальные поражения низкого риска (LSIL) — у 29 602 (96,4 %).

За 5-летний период были обследованы в связи с отсутствием цитологического исследования в течение года не имеющие жалоб 23 885 женщин. РШМ был выявлен у 174 (0,7 %) пациенток, HSIL — у 513 (2,1 %), ASCUS — у 195 (0,8 %), LSIL — у 23 003 (96,3 %).

На прием к гинекологу в областной центр патологии шейки матки были приглашены 2162 женщины в возрасте 18–69 лет. Лечение методами конизации ($n = 622$) и эксцизии ($n = 830$) шейки матки выполнено 1452 пациенткам. HSIL и карцинома *in situ* выявлены у 1162 (78 %) женщин.

Заключение. Использование таких современных диагностических методов, как жидкостная цитология и ВПЧ-тестирование, а также преимущество в оказании необходимой медицинской помощи между врачами первичного звена и специализированными центрами позволяют консолидировать пациенток с преинвазивными и инвазивными поражениями шейки матки, обследованных в рамках скрининговой программы или в целях ранней диагностики РШМ при наличии жалоб.

Роль микроРНК-135 в регуляции экспрессии онкогенов ВПЧ16 и клеточных генов при раке шейки матки

Д.С. Елкин, Н.В. Елкина, Р.С. Фасхутдинов,
С.В. Винокурова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Персистенция ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВПЧ16, -18, -31, -33 и др.) в 99 % случаев — основная причина развития РШМ. Ключевым этапом прогрессирования ВПЧ-ассоциированных поражений является увеличение экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7*, что приводит к нарушению процессов роста и дифференцировки клеток эпителия. Молекулярные механизмы, приводящие к нарушению профиля экспрессии вирусных генов, изучены недостаточно. Нарушение эпигенетической регуляции экспрессии генов, осуществляемой, в частности, с вовлечением клеточных микроРНК, может являться основной причиной опухолевой прогрессии при РШМ.

Цель исследования — выявление дифференциально экспрессирующихся микроРНК, вовлеченных в регуляцию экспрессии вирусных онкогенов при РШМ.

Материалы и методы. Для выявления дифференциально экспрессирующихся микроРНК методом секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) использовали трансформированный и прилежащий нормальный эпителий ВПЧ16-положительных плоскоклеточных карцином шейки матки, полученный с помощью микродиссекции. Поиск потенциальных сайтов связывания микроРНК с геномом ВПЧ16 проводили с использованием программы RegRNA 2.0. Для оценки влияния исследуемых микроРНК на экспрессию вирусных и клеточных генов выполняли трансфекцию клеток цервикальной ВПЧ16-положительной клеточной линии SiHa синтетическими аналогами микроРНК. Оценку изменения экспрессии вирусных и клеточных генов проводили с применением количественной ПЦР и NGS. Изменение уровня белка p53 оценивали с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты. В результате сравнения паттерна экспрессии микроРНК трансформированного и нормального прилежащего эпителия шейки матки выявлена микроРНК-135, которая характеризуется наиболее низким уровнем экспрессии в опухолевой ткани и наличием множества потенциальных сайтов взаимодействия с ВПЧ16, в том числе с мРНК онкогена *E6*. Трансфекция 4 зрелых изоформ микроРНК-135 (микроРНК-135a-3p, -a-5p, -b-3p и -b-5p) в клеточную линию SiHa приводит к снижению уровня экспрессии мРНК онкогена *E6*, а также к увеличению уровня белка p53 (микроРНК-135a-3p, -a-5p). В результате

анализа данных дифференциальной экспрессии клеточных генов, полученных с помощью NGS, выявлено изменение экспрессии нескольких групп генов под влиянием всех 4 изоформ микроРНК-135, среди которых наиболее обогащенную функциональную категорию представляют гены, вовлеченные в противовирусный ответ. Показано, что результатом трансфекции микроРНК-135 в клетки линии SiHa является увеличение экспрессии интерферонстимулируемых генов (*OASL*, *OAS1*, *OAS3*, *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT3*, *IFITM1*).

Заключение. Впервые показано, что экспрессия микроРНК-135 снижена в трансформированном эпителии ВПЧ16-положительных карцином шейки матки. Показано, что микроРНК-135 подавляет экспрессию онкогена *E6* и увеличивает экспрессию генов, вовлеченных в противовирусный ответ, что характеризует ее как потенциальную противовирусную микроРНК.

Анализ экспрессии и изучение роли микроРНК вирусов папилломы человека 16-го типа

Н.В. Елкина, Д.Ю. Берлина, С.В. Винокурова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. ВПЧ являются одной из самых гетерогенных групп вирусов, поражающих эпителиальные клетки кожных и слизистых покровов. ВПЧ — этиологический фактор РШМ, опухолей аногенитальной области и ротоглотки. В настоящее время показано, что некоторые ДНК-содержащие онкогенные вирусы (ВЭБ и саркомы Капоши) кодируют собственные микроРНК, способные регулировать экспрессию как вирусных, так и клеточных генов, способствуя тем самым поддержанию вирусной инфекции и запуску процессов онкотрансформации. Недавно было показано, что геномы различных типов ВПЧ также кодируют собственные вирусные микроРНК. Однако в настоящее время отсутствуют экспериментальные исследования функций вирусных микроРНК, кодируемых ВПЧ, в регуляции как собственных генов, так и генов клетки-хозяина.

Цель исследования — анализ экспрессии вирусных микроРНК в ВПЧ16-положительных цервикальных клеточных линиях, а также в клинических образцах РШМ; анализ влияния вирусных микроРНК на экспрессию вирусных онкогенов *E6* и *E7*.

Материалы и методы. Анализ экспрессии вирусных микроРНК ВПЧ16 проводили как в ВПЧ16-положительных цервикальных клеточных линиях SiHa и CaSki, так и в клинических образцах карцином шейки матки, в которых геном ВПЧ16 представлен в эписомальной форме. Анализ экспрессии выполняли методом ПЦР в реальном времени с использованием метода stem-loop. Для анализа влияния вирусных микроРНК

на экспрессию вирусных онкогенов проводили трансфекцию синтетических аналогов вирусных микроРНК в цервикальную клеточную линию SiHa. Уровень экспрессии вирусных онкогенов оценивали через 72 ч с использованием ПЦР в реальном времени.

Результаты. На данном этапе работы оценивали экспрессию 2 вирусных микроРНК — ВПЧ16-miR-N1 и ВПЧ16-miR-N2. Показано, что данные микроРНК экспрессируются как в клеточных линиях SiHa и CaSki, так и в клинических образцах карцином шейки матки. При анализе влияния синтетических аналогов данных микроРНК на экспрессию вирусных онкогенов *E6* и *E7* в клеточной линии SiHa выявлено, что обе вирусные микроРНК статистически значимо снижают уровень экспрессии вирусных онкогенов, что указывает на их возможную роль в регуляции вирусного цикла.

Заключение. Показана экспрессия вирусных микроРНК ВПЧ16-miR-N1 и ВПЧ16-miR-N2 как в ВПЧ16-положительных клеточных линиях, так и в клинических образцах карцином шейки матки. Впервые показана способность вирусных микроРНК подавлять экспрессию вирусных онкогенов *E6* и *E7*. Дальнейшее исследование роли вирусных микроРНК необходимо как с точки зрения более глубокого исследования регуляции вирусного цикла, так и для разработки новых подходов противовирусной и противоопухолевой терапии.

Фенотип неходжкинских лимфом, отягощенной вирус-ассоциированностью

З.З. Хакимов¹, А.А. Абдувалиев¹, А.А. Саримсаков²

¹Ташкентская медицинская академия, Ташкент,
Республика Узбекистан;

²Институт химии и физики полимеров Академии наук
Республики Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан

Был проведен отбор 30 пациентов с вирус-ассоциированными неходжкинскими лимфомами (НХЛ) для последующего отбора опухолевого материала. Наибольшая инфицированность у больных НХЛ наблюдалась вирусами простого герпеса (ВПГ) и ВЭБ. У 18 пациентов обнаружен вирус гепатита С, также у этих больных наблюдалось коинфицирование ВПГ 1-го и 2-го типов и ВЭБ.

При распределении пациентов с НХЛ по возрастным декадам установлено, что пик заболеваемости приходится на возраст до 50 лет. Среди пациентов преобладают мужчины (12 (66,7 %) против 6 (33,3 %)), 8 (44,4 %) из 18 больных — жители сельской местности и 10 (55,6 %) — городские жители. У всех больных диагноз был установлен на основании данных и результатов комплексного исследования (клинико-биохимического, рентгенологического, морфологического, УЗИ, КТ, миелограммы).

Зоны поражения при неходжкинских лимфомах чаще всего приходились на шейные и подмышечные лимфатические узлы (более 50 %), затем на надключичные, паховые и забрюшинные (30–45 %), меньше всего отмечается поражение подвздошных лимфатических узлов. По результатам комплексного обследования стадия ПА НХЛ выявлена у 3 (33,3 %), ПВ — у 2 (22,2 %), ППВ — у 4 (44,4 %) больных.

У 4 из 18 больных НХЛ исходные уровни ВПГ 1-го и 2-го типов, ВЭБ, цитомегаловируса в плазме крови были отрицательными, у оставшихся 14 больных отмечалась высокая авидность ВПГ 1-го и 2-го типов — в среднем

94,3 % (>50 %), а также высокая авидность цитомегаловируса — в среднем 72,2 % (>50 %). При иммунологическом обследовании у 8 больных наблюдались дисбаланс иммунорегуляторных популяций Т-лимфоцитов, снижение значений иммунорегуляторного индекса и увеличение количества киллерных клеток. Только у 1 больного НХЛ стадии ППВ клеточное звено иммунитета оказалось в норме. Показатели общего интерферонового статуса у всех больных были выше нормы ($15,6 \pm 0,8$ МЕ/мл), а уровень сывороточного ИФН был значительно ниже нормальных показателей — $18,0 \pm 2,8$ пг/мл.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Доклады

Последствия таргетирования коатомерного комплекса COP1 в опухолевых клетках

А. Гаспарьян¹, М. Аксенова¹, Д. Оливер¹, Э. Левина²,
Р. Доран¹, М. Люциус¹, С. Ли¹, Г. Пироли⁴, Н. Олейник⁵,
Б. Огретмен⁵, К. Майтри³, Н. Фризель⁴, Е. Броде¹,
М. Вайет¹, М. Штутман¹

¹Факультет разработки лекарственных препаратов и биомедицинских наук фармацевтического колледжа, Университет Южной Каролины, Колумбия, США;

²биологический факультет колледжа искусств и наук, Университет Южной Каролины, Колумбия, США;

³факультет химии и биохимии колледжа искусств и наук, Университет Южной Каролины, Колумбия, США;

⁴факультет фармакологии, физиологии и неврологии медицинского колледжа; Университет Южной Каролины, Колумбия, США;

⁵факультет биохимии и молекулярной биологии, Медицинский университет Южной Каролины, Чарльстон, США

Коатомерный комплекс I (COP1) является ключевым белковым компонентом везикулярного транспорта, который осуществляет сортировку белков и липидов между цистернами комплекса Гольджи, а также транспорт этих молекул из комплекса Гольджи в эндоплазматический ретикулум. Ранее нами было показано, что COP1 может быть избирательно таргетирован в опухолевых клетках с помощью подавления экспрессии гена, кодирующего одну из субъединиц COP1. В данной работе мы изучили различные внутриклеточные эффекты, вызванные элиминацией COP1 в опухолевых клетках. Такая элиминация приводила к угнетению митохондриальной активности, выработке АФК и последующему накоплению в цитоплазме липидных гранул, а также к накоплению белков LC3-II и p62, связанных с аутофагией. Далее наблюдалась гибель клеток в результате классического апоптоза. Митохондрия-специфический инактиватор АФК mitoQ10 уменьшал продукцию АФК, снижал количество липидных гранул в цитоплазме, подавлял накопление белков LC3-II и p62 и ослаблял апоптоз. Аналогичные результаты были получены после обработки клеток SP600125 специфическим ингибитором киназы JNK, которая участвует в выработке АФК в митохондриях.

Полученные данные указывают на то, что митохондриальная продукция АФК является ключевым медиатором внутриклеточных эффектов, вызванных элиминацией COP1. Важно, что белки LC3-II и p62 были колокализированы с липидными гранулами, что может свидетельствовать об индукции аутофагии. Однако, как показали результаты электронной микроскопии, липидные гранулы не были окружены двойными мембранами, характерными для аутофагосом, и, следовательно, не были связаны с аутофагией. Такое устранение белков LC3-II и p62 из процесса аутофагии может снижать выживаемость раковых клеток в условиях стресса. Полученные результаты свидетельствуют о том, что таргетирование COP1 может быть привлекательным подходом для разработки новой противоопухолевой терапии.

Метилтрансфераза Set7/9 — биомаркер и потенциальная мишень для терапии немелкоклеточного рака легкого

А.А. Дакс, А.В. Петухов, О.Ю. Шувалов, О.А. Федорова,
В.А. Мамонтова, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Метилтрансфераза Set7/9, продукт гена *SETD7*, была впервые описана как фермент, метилирующий гистон H3 (H3K4). Позже было показано, что белок Set7/9 способен метилировать до 30 негистоновых мишеней, вовлеченных в такие клеточные процессы, как регуляция экспрессии генов, дифференциация, ответ на повреждение ДНК, например RB, p65, Foxo3, DNMT1 и p53. Как известно, p53 является ключевым онкосупрессорным белком человека, регулирующим клеточный цикл, аутофагию, апоптоз и клеточный ответ на различные стрессовые стимулы.

Ранее нашей группой было показано, что белок Set7/9 способен влиять на активность p53 и восприимчивость клеток к генотоксическому стрессу. Мы предположили, что реакция клеток рака легкого на генотоксическую ХТ может зависеть от статуса Set7/9.

С помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 мы создали клеточные линии рака легкого человека с различным статусом экспрессии Set7/9. Используя созданные клеточные модели и клеточные линии, полученные из операционного материала пациентов, мы показали, что нокаут Set7/9 повышает чувствительность клеток рака легкого к таким генотоксическим препаратам, как доксорубин и цисплатин, а также приводит к увеличению уровня апоптоза в клетках, обработанных цисплатином и этопозидом. Мы продемонстрировали, что специфический ингибитор метилтрансферазной активности Set7/9 (R) — PFI-2 оказывает аналогичное действие на клетки, повышая их чувствительность к генотоксическим лекарственным препаратам. Таким образом, мы показали, что выявленный эффект Set7/9 на восприимчивость клеток к генотоксическому стрессу обеспечивается его ферментативной активностью.

С помощью биоинформатического анализа мы показали, что повышенная экспрессия Set7/9 ассоциирована с уменьшением продолжительности жизни пациентов с НМРЛ, а также с РМЖ. Кроме этого, мы обнаружили, что повышенный уровень Set7/9 является характеристикой РМЖ HER2-положительного подтипа. Таким образом, мы продемонстрировали потенциальную универсальность данной метилтрансферазы в качестве биомаркера и ХТ-мишени.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-75-10059).

Генетические подходы к модификации лекарств: может ли рекомбинантная L-аспарагиназа Was79 стать основой нового лекарственного препарата?

Д.Г. Козлов¹, Е.П. Санникова¹, С.Э. Чеперегин¹,
И.И. Губайдуллин¹, Б.Д. Ефремов¹, Г.Г. Честухина¹,
Н.В. Булушова¹, В.В. Рябиченко¹, И.А. Залунин¹,
Е.К. Котлова¹, Е.С. Иванова², В.С. Покровский²,
И.Д. Трещалин³, Э.Р. Переверзева³, Е.М. Малиновская⁴,
С.В. Яроцкий¹

¹НИЦ «Курчатовский институт», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

³ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

⁴ФГБНУ «Медико-генетический научный центр
им. акад. Н.П. Бочкова», Москва

Применение ферментных препаратов на основе бактериальных L-аспарагиназ — составная часть современных протоколов лечения острых лимфобластных лейкозов. При этом сохраняет актуальность поиск ферментов, обладающих улучшенной клинической

эффективностью. Модифицированная аспарагиназа Was79 является производной фермента, получаемого из микроорганизма *Wolinella succinogenes*. Аспарагиназа Was79 содержит аминокислотные замены V23Q и K24T, обуславливающие устойчивость фермента к трипсинолизу, а также N-концевой гепаринсвязывающий пептид KRKKKGKGLGKKR, отвечающий за связывание белка с гепарином и лейкозными клетками (линии K562). Аспарагиназу Was79 получают в результате экспрессии в клетках *Escherichia coli* с применением специальной технологии, обеспечивающей высокий уровень продукции и гарантированное отсутствие в составе белка потенциально иммуногенного N-концевого остатка формилметионина. При тестировании на модели лимфаденоза Фишера L5178Y у мышей терапевтическая эффективность Was79 значительно превосходила показатели контрольной L-аспарагиназы EcA *E. coli* в диапазоне разовых доз 250–8000 МЕ/кг. В дозах 500–8000 МЕ/кг Was79 обеспечила полную ремиссию 100 % животных. Выявлена резкая зависимость эффективности препарата от способа его применения и наличия контакта с опухолевыми клетками. Анализ различных путей введения показал, что эффективность Was79 на модельных животных с *ip* введенными клетками лейкоза убывала в ряду *ip* → *im* → *iv*. В совокупности с выявленной способностью аспарагиназы Was79 адсорбироваться на поверхности и проникать внутрь опухолевых клеток эти результаты свидетельствовали о существенном вкладе фармакокинетики препарата и, вероятно, механизмов его внутриклеточного действия в терапевтическую эффективность.

Аспарагиназа Was79 обладает высоким терапевтическим потенциалом, однако требует разработки оригинального протокола клинического применения.

Работа поддержана грантом Минобрнауки России (ГК № 14. N08.11.0014).

Нанолечения, проходящие через гематоэнцефалический барьер, для иммунотерапии глиом

А.В. Любимов, А. Галстян, Р. Патил, Э. Холлер, Т. Сан,
Х. Динг, К.Л. Блэк, Ю.Ю. Любимова

Cedars-Sinai Medical Center, Лос-Анджелес, США

Лечение глиом мозга с помощью ингибиторов контрольных точек иммунного ответа (антител к CTLA-4 и PD-1) является малоэффективным во многом из-за их неспособности проходить через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Мы разработали наноиммуноконъюгаты (НИК) на основе натурального биополимера полималата с ковалентно присоединенными антителами к CTLA-4 или PD-1 для их доставки через ГЭБ в мозг и активации локального противоопухолевого иммунитета. Преколонизирование животных путем инъекций антигистамина трипролидина и антагониста

фактора, активирующего тромбоциты (CV6209), впервые дало возможность многократно использовать внутривенное введение антител к CTLA-4 и PD-1 без развития анафилактического шока. Лечение мышей с сингенной глиобластомой GL261 с помощью НИК вызывало увеличение фракции CD8⁺ Т-клеток, IFN γ ⁺ НК- и НКТ-киллеров, макрофагов при снижении регуляторных Т-клеток в ткани опухоли. Выживание мышей с опухолями при лечении комбинацией НИК с обоими антителами значительно увеличивалось по сравнению с отдельными НИК, особенно со свободными антителами. Наши данные показывают, что доставка ингибиторов контрольных точек иммунного ответа на таргетированном нанополимере через ГЭБ может являться эффективным способом лечения глиобластом путем активации как генерализованного, так и локального мозгового иммунного ответа на опухоль.

Клеточный протеостаз как мишень комбинированной противоопухолевой терапии

Б.А. Маргулис, В.Ф. Лазарев, Д.В. Сверчинский,
А.Д. Никитина, И.В. Гужова

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Комбинированная терапия с появлением новых целевых препаратов стала мощным клиническим инструментом в онкологической практике, способным специфически поразить сразу несколько мишеней в раковой клетке. Поскольку большинство функций любой, в том числе раковой, клетки связано с поддержанием синтеза, модификаций и утилизации белков, т.е. с работой системы протеостаза, последняя является одной из наиболее важных мишеней для противоопухолевой терапии. В клинической практике нашли применение ингибиторы протеасом и аутофагии, на стадии клинических испытаний находятся ингибиторы синтеза и функции молекулярных шаперонов. Некоторые из таких соединений, как бортезомиб или ганетиспиб (ингибитор шаперона HSP90), используются в сочетании с блокаторами клеточного цикла или, например, с инактиваторами контрольных точек. Продолжая исследование ингибиторов шаперонов, мы выявили несколько веществ, которые показали синергетическое действие с противоопухолевыми препаратами, применяемыми в клинической практике. В докладе будет предложена концепция подбора лекарственных средств в комплексе с ингибиторами шаперонов, а также представлены данные о применении подобных комбинаций в терапии различных форм рака.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 19-74-20161).

Белки Bcl-xL и Bax как биомаркеры чувствительности опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1

В.В. Сеничкин¹, Г.С. Копеева¹, А.Ю. Стрелецкая¹,
Н.В. Первушин¹, Б.Д. Животовский^{1,2}

¹Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО
«МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²отделение токсикологии, Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

Индукция апоптотической гибели клеток с помощью различных препаратов является одной из наиболее широко используемых стратегий противоопухолевой терапии. Большое число ХТ-агентов способно вызывать пермеабиллизацию внешней митохондриальной мембраны (ПВММ) — событие, являющееся ключевым для запуска апоптоза. ПВММ контролируется белками семейства Bcl-2, которое включает более 20 представителей, обладающих либо про-, либо антиапоптотическими свойствами. Антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) представляют собой перспективные мишени для противоопухолевой терапии, и в соответствии с этим были разработаны ингибиторы данных белков — вещества класса ВНЗ-миметиков. Как прямые регуляторы ПВММ ВНЗ-миметики являются более специфичными индукторами клеточной гибели в опухолевых клетках по сравнению с различными ХТ-препаратами. В то же время чувствительность клеток к действию ВНЗ-миметиков, селективных к различным белкам семейства Bcl-2, существенно различается, что указывает на важность поиска биомаркеров, которые могли бы предсказать чувствительность к данным препаратам.

В рамках настоящего исследования было показано, что 2 специфических ВНЗ-миметика к Mcl-1, A1210477 и S63845, демонстрировали различную эффективность запуска апоптоза в опухолевых клетках: вещество S63845 демонстрировало эффективность, сопоставимую с действием миРНК-опосредованного нокдауна Mcl-1, в то время как A1210477 существенно уступал в эффективности индукции апоптоза. Вероятно, наблюдаемые отличия в эффективности двух ВНЗ-миметиков были вызваны различной способностью данных веществ разрушать комплексы с проапоптотическим белком Bax. Действительно, A1210477 вызывал апоптоз независимо от уровня Bax в клетках, в то время как относительно высокий уровень гибели клеток требовал присутствия Bax. Помимо этого, было показано, что ответ на клеточную гибель, индуцированную S63845, не зависел от других проапоптотических белков семейства Bcl-2 — Bim и Bax. Также в рамках исследования была выведена линия, характеризующаяся повышенной устойчивостью к действию S63845. Было показано, что эта клеточная линия характеризовалась увеличением уровня антиапоптотического белка Bcl-xL.

Тем не менее данная клеточная линия демонстрировала высокую чувствительность к комбинированному действию S63845 и ингибитора Bcl-2 ABT-199. Необходимо отметить, что подобная комбинация препаратов в настоящее время проходит клинические испытания. Наконец, в рамках настоящей работы было показано, что ответ различных линий опухолевых клеток обратно коррелирует с уровнем Bcl-xL. Суммарно данные проведенных исследований демонстрируют, что белки семейства Bcl-2, Bax и Bcl-xL представляют собой потенциальные биомаркеры для применения селективных антагонистов Mcl-1.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-75-20102).

Химические модуляторы перепрограммирования транскрипции для терапии лейкозов

В.В. Татарский¹, А.И. Хамидуллина², М.А. Ястребова²,
Ю.В. Нужина³, Е.С. Иванова¹, Е.С. Варламова²,
И. Ронинсон^{2,4}, А.А. Штиль¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

³ФГАУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург;

⁴Университет штата Южная Каролина, Коламбия, США

Развитие мишененаправленной терапии позволило внедрить в практику ряд противоопухолевых лекарств, что существенно улучшило клиническую ситуацию. Остается нерешенной проблема лекарственной устойчивости. Новая концепция усиления эффективности противоопухолевых лекарств — воздействие на механизмы транскрипции генов. Клетки хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) в логарифмической фазе роста чувствительны к наномолярным концентрациям ингибиторов химерной тирозинкиназы Bcr-Abl, однако для индукции гибели в плотном засеве требуются значительно более высокие концентрации (кооперационная резистентность). В этой ситуации гибель можно вызывать комбинированием ингибиторов Bcr-Abl с антагонистами протеинкиназ CDK8/19 (блокирование перепрограммирования транскрипции генов). Вероятный механизм синергии — активация митохондриального пути апоптоза. CDK8 оказывается терапевтической мишенью и для клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ): особенностью молекулярного «портрета» этой опухоли является повышенное количество CDK8-содержащих суперэнхансерных областей в геноме. Фармакологические ингибиторы CDK8/19 эффективны для клеток ОМЛ как самостоятельные агенты. Ингибирование CDK8/19 в экспериментальных моделях гемобластозов и солидных опухолей обуславливает перспективность новой терапевтической концепции. Хорошая переносимость (отсутствие токсичности

для взрослого организма) позволяет рассчитывать на применение ингибиторов перепрограммирования транскрипции в терапии ОМЛ и ХМЛ как альтернативу цитотоксическим препаратам.

Работа поддержана грантом Минобрнауки России (соглашение 14. W03.31.0020 с Институтом биологии гена РАН).

Убиквитинлигазы MDM2 и PIRH2 как возможные прогностические маркеры HER2-положительного рака молочной железы

О.А. Федорова, О.Ю. Шувалов, А.А. Дакс, А.И. Кизенко,
Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

HER2 является тирозиновой протеинкиназой семейства эпидермального фактора роста. Повышение экспрессии данного гена сопровождается изменением нижележащих каскадов, что, в свою очередь, приводит к прогрессированию РМЖ, высокому риску рецидива, а также к появлению метастазов. Таким образом, изучение факторов, влияющих на чувствительность к химиопрепаратам HER2-положительного подтипа РМЖ, является важной задачей для современной медицины, а детальное изучение молекулярных механизмов развития резистентности внесет важный вклад в фундаментальные исследования. Наши биоинформатические данные выявили две p53-зависимые убиквитинлигазы, MDM2 и PIRH2, которые достоверно коррелируют с выживаемостью пациентов с HER2-положительным подтипом РМЖ. Мы провели скрининг ингибиторов HER2 (афатиниба и нератиниба) на цитотоксичность в линиях РМЖ с разным статусом экспрессии как HER2, так и E3-лигаз PIRH2 и MDM2. Эксперименты показали, что подавление экспрессии PIRH2 приводит к устойчивости HER2-положительной клеточной линии РМЖ к афатинибу в отличие от клеточной линии MDA-MB-231 (HER2-отрицательной), в которой экспрессия PIRH2 не оказала значимого влияния на чувствительность к афатинибу. Таким образом, мы можем предположить, что данное влияние зависит от экспрессии HER2. Поскольку PIRH2 является E3-убиквитинлигазой, можно предположить, что PIRH2 препятствует подавлению HER2 за счет убиквитинилирования дополнительных факторов. Мы также показали, что сверхэкспрессия MDM2 приводит к устойчивости клеточной линии BT-474 (HER2-положительной) к ингибиторам афатинибу и нератинибу. Предполагаем, что MDM2 способствует деградации HER2, что, в свою очередь, приводит к резистентности клеточной линии с сверхэкспрессией MDM2 к ингибиторам HER2.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-75-10076).

Противоопухолевые лиганды G-квадруплексов на основе антрафуран- и антратиофендионов

А. Е. Щекотихин^{1,2}, А. С. Тихомиров^{1,2}

¹ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков
им. Г. Ф. Гаузе», Москва;

²ФГБОУ ВО «РХТУ им. Д. И. Менделеева», Москва

Гетероциклические производные антрахинона способны действовать на широкий спектр мишеней, вовлеченных в опухолевую прогрессию, и перспективны для разработки новых противоопухолевых препаратов. К таким мишеням относятся четырехцепочечные элементы вторичной структуры нуклеиновых кислот — G-квадруплексы (G4), обнаруженные в теломерных областях ДНК, промоторных областях онкогенов и не-транслируемых последовательностях мРНК. Поэтому лиганды, стабилизирующие G4, рассматриваются в качестве нового класса противоопухолевых препаратов.

Первоначально в результате скрининга серии антратиофендионов был найден бисгуанидин LCTA-1581, имеющий высокое сродство к теломерному квадруплексу и G4 из промоторных участков онкогенов. LCTA-1581 подавляет синтез теломер, транскрипцию нескольких онкогенов и ингибирует рост опухолевых клеток в микромолярных концентрациях. С использованием методов компьютерного моделирования и результатов анализа связи структура—свойство на основе производных антратиофендионов и антрафурандионов получен ряд лигандов, имеющих высокое сродство к различным G4-элементам нуклеиновых кислот. В частности, LCTA-1795 стабилизирует G4 из промоторной последовательности онкогена *hRAS*, что приводит к уменьшению накопления белка p21hRAS в клетках рака мочевого пузыря T24 и индукции апоптоза. На модели ксенографтов рака мочевого пузыря T24 показано, что LCTA-1795 обладает высокой противоопухолевой активностью. Другое производное — LCTA-2036 — имеет высокую аффинность к G4 из 5'-нетранслируемой области мРНК онкогена *KRAS*. Антрафуран LCTA-2036 в суб-микромолярных концентрациях дозозависимо снижает уровень *KRAS*, подавляет синтез белка p21KRAS, вызывает активацию каспазы 3 и индукцию апоптоза в опухолевых клетках.

Таким образом, варьирование гетероциклического ядра, а также модификация структуры боковых цепей и терминальных основных групп гетероциклических производных антрахинонов открывают широкие возможности для модуляции сродства лигандов к G4 нуклеиновых кислот ипотенцирования их противоопухолевых свойств.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФ (грант № 18-73-00256).

Downregulation of non-muscle Myosin IIA as a new strategy in prostate cancer therapy

Cole P. Frisbie¹, Chad A. LaGrange², Carol A. Casey³,
Jean-Jack M. Riethoven^{4,5}, Armen Petrosyan^{1,5,6}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology,
College of Medicine, USA;

²Division of Urologic Surgery, Department of Surgery, USA;

³Department of Internal Medicine, University of Nebraska
Medical Center, USA;

⁴Center for Biotechnology, University of Nebraska-Lincoln, USA;

⁵The Nebraska Center for Integrated Biomolecular
Communication, Lincoln, NE, USA;

⁶The Fred and Pamela Buffett Cancer Center, Omaha, NE, USA

The wide range of clinical and experimental reports indicates that progression of prostate cancer (PCa) is associated with increased expression of $\beta 1$, 6GlcNAc-branched N-glycans, products of Golgi $\beta 1$, 6-acetylglucosaminyltransferase V (MGAT5) and the favored ligand for Galectin-3 (Gal-3). It is known that MGAT5 is antagonized by N-acetylglucosaminyltransferase-III (MGAT3), which enhanced expression has been found to suppress metastasis. According to a widely accepted model, PCa cells adhesion, migration, proliferation, and invasion are linked to the activity of matriptase and integrins, the client proteins for MGAT5. Therefore, development of an effective therapy that could block the expression of these proteins at the cell surface is of great importance. Previously, we found that progression of PCa is correlated with disorganization of the Golgi complex, the central station of glycosylation. Fragmentation of this organelle is forced by the action of motor protein non-muscle Myosin IIA (NMIIA) and accompanied by mislocalization of key enzymes that are sensitive to the content and dimeric structure of largest Golgi matrix protein giantin. Here, we found that MGAT3, but not MGAT5, employs giantin as the Golgi docking site, and in advanced PCa, MGAT3 is redistributed to the cytoplasm and degraded. This results in MGAT5-mediated glycosylation of matriptase and integrins followed by their stabilization at the plasma membrane via interaction with Gal-3. Moreover, we observed that in advanced PCa cells, inhibition of NMIIA by Blebbistatin restores compact Golgi and intra-Golgi location for MGAT3, and, importantly, reduces expression of both matriptase and integrins. This was associated with a reduction of (a) cell proliferation, (b) their invasion and anchorage-dependent growth, (c) migration and adhesion of integrins to the extracellular matrix, and (d) intravasation potential. The ablation of NMIIA in advanced PCa results in Golgi reorganization and subsequent inhibition of MGAT5-mediated N-glycosylation, which, in turn, blocks plasma membrane delivery and secretion of pro-metastatic proteins. Therefore, restoration of compact Golgi may serve as a potential strategy to prevent metastasis of PCa.

Clinico-Pathological profile of Colorectal Cancer patients at a multispeciality hospital in India: an Analytical Study based on Molecular Diagnostics

Navrinder Kaur

*Artemis Education and Research Foundation, Artemis Hospitals,
Gurugram, India*

Cancer is a leading cause of global mortality. Most of the reported data lag approximately five years behind the current statistics due to a varied number of reasons. This majorly circumvents incidence and diagnosis in strong correlation with collection, compilation and understanding of underlying factors of a particular cancer.

Colon/Colorectal cancer (CRC) is one of the few emerging cases of cancer related to the human gastrointestinal tract. The aim and mainstay of our retrospective analytical study was to characterize the incidence and clinical signature in incoming cases that underwent treatment in the form of surgery, chemotherapy, neo-adjuvant therapy and palliative

radiotherapy. The stage wise analysis was performed according to TNM classification. The five year survival rate of a number of cases relatively depends on median diagnosis, therapy indicated and race. Currently CRC affects 4 % of the population and 30 % of such cases are observed to be hereditary in nature; with >40 % of the onset occurring during the second decade up to fifth decade of life. There is a strong link between age, diet and exposure to hazardous agents. Early detection methods included pathological profiling of relevant primary presenting symptoms, analysis of serum antigenic biomarkers, although chronic diseases e. g. diabetes and inflammatory bowel disease cannot be ruled out. Clinical diagnosis which depends on specimen type results in identification of the site of origin of CRC e. g. Adenomatous polyps, Hyperplastic polyps, ulcerative colitis, ileitis, squamous carcinoma, poorly differentiated Adenocarcinoma. A number of known biomarkers were added to the panel for definitive clinical analysis in order to correlate current treatment modalities with better patient outcome in terms of survival rates. In addition, a number of rare entities of CRC were observed which need further evaluative diagnostic procedures to the existing repertoire of molecular diagnostics of tumors. This becomes all the more pertinent given the current global trend of early onset and increase in the number of colorectal cancer cases.

Постеры

Механизмы ответа клеток рака легкого на действие ингибиторов киназы анапластической лимфомы

А.Д. Азарян¹, В.В. Татарский², А.А. Штиль²

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Международный научный центр SCAMT "Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies", Санкт-Петербург;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Киназа анапластической лимфомы (ALK) — тирозинкиназа семейства инсулинзависимых рецепторов, необходимая для нормального онтогенеза. Онкогенные активирующие перестройки в результате слияния гена *ALK* с другими фрагментами генома обнаружены у 3–6 % пациентов с НМРЛ. Одобрены или применяются в клинической практике ингибиторы ALK кризотиниб (1-е поколение), церитиниб, алектиниб и бригатииниб (2-е поколение), лорлатиниб (3-е поколение) для лечения ALK-позитивного рака легкого, нейробластомы и анапластической крупноклеточной лимфомы [Recondo G. et al. *Nature Rev Clin Oncol* 2018;15:694–708.]. АМФ-зависимая киназа NUAK 1 активирует металлопротеиназы, что способствует метастазированию; таким образом NUAK 1 — маркер отрицательного прогноза при НМРЛ. NPT-001, ингибитор NUAK 1 и ALK, создан компанией FusionPharma (Сколково) для повышения селективности и снижения метастазирования ALK-экспрессирующих опухолей. NPT-001 ингибирует пролиферацию клеток крупноклеточной лимфомы (линия SU-DHL-1), но менее активен против химерного белка EML4-ALK в клетках НМРЛ (линия H2228). В настоящей работе исследованы механизмы относительной устойчивости линии H2228 к NPT-001 и кризотинибу. NPT-001 ($IC_{50} = 12$ мкМ) и кризотиниб ($IC_{50} = 5$ мкМ) подавляли жизнеспособность клеток H2228. Рассмотрены возможности блокирования обходных сигнальных путей с помощью комбинаций кризотиниба или NPT-001 с одним из следующих ингибиторов: селуметиниб (AZD6244; MEK), WP1066 (STAT3) и МК-2206 (AKT). Выраженной сенситизации клеток H2228 указанными комбинациями не отмечено; NPT-001 и кризотиниб вызывали блок в фазе G_2/M клеточного цикла в первые 24 ч. Возможно, это нарушение приведет к последующей гибели клеток. Требуется дальнейшее изучение причин первичной резистентности клеток H2228 к фармакологической инактивации мишени ALK.

Изучение цитотоксической активности растительных экстрактов на клетках множественной миеломы человека

Н.П. Акентьева¹, Т.Р. Приходченко¹, А.Р. Гизатуллин¹, Н.И. Шкондина¹, Т.С. Ступина¹, Э. Дэгаро²

¹ФГБУН «Институт проблем химической физики РАН», Черноголовка, Московская обл.;

²Университет Удине, Удине, Италия

Введение. В настоящее время, несмотря на производство синтетических лекарственных средств, 75 % важнейших и жизненно необходимых лекарственных препаратов получают из растительных источников. Множественная миелома (ММ) — заболевание крови, возникающее в костном мозге и тесно связанное с лимфомой и лейкозией. Поскольку в настоящее время доступного и эффективного лечения ММ не существует, поиск новых препаратов из растительных экстрактов для лечения ММ является весьма актуальным.

Цель исследования — изучить цитотоксическую активность растительных экстрактов и их влияние на метаболизм клеток ММ человека.

Материалы и методы. В работе использовали растительные экстракты, полученные из каланхоэ дегремона (*Kalanchoe daigremontiana*), алоэ древовидного (*Aloe arborescens*), подорожника большого (*Plantago major*), чистотела большого (*Chelidonium majus* L.) и крапивы двудомной (*Urtica dioica*). Исследования выполнены на клеточной линии ММ 8226. Цитотоксичность растительных экстрактов оценивали методом окрашивания клеток ММ трипановым синим. Влияние растительных экстрактов на жизнеспособность ММ оценивали флуоресцентным методом с помощью Alamar&Blue реагента. Определение митохондриального мембранного потенциала проводили флуорометрическим методом. Уровень восстановленного глутатиона в клетках определяли с помощью о-фталевого альдегида. Эффект растительных экстрактов на пролиферацию ММ измеряли с помощью проточной цитометрии. Влияние растительных экстрактов на активность АТФазы и общее количество АТФ оценивали колориметрическим и флуоресцентным методом соответственно.

Результаты. Установлено, что экстракты алоэ и каланхоэ являются наиболее цитотоксичными для клеток ММ, снижают их жизнеспособность на 52,6 и 50 % соответственно. Показано, что инкубация клеток ММ с растительными экстрактами алоэ, каланхоэ и чистотела понижала активность митохондриальных НАДН-дегидрогеназ на 46, 13 и 33 % соответственно. Методом

проточной цитометрии установлено, что экстракт каланхоэ подавлял пролиферацию клеток ММ в 1,4 раза, экстракт алоэ — в 1,8 раза, экстракт чистотела — в 2,4 раза, а экстракт крапивы — в 1,5 раза. Обработка клеток ММ растительными экстрактами приводила к снижению внутриклеточного восстановленного глутатиона. Показано, что уровень глутатиона снижался под действием экстракта каланхоэ на 25 %, а под действием алоэ — на 63 %. Установлено, что обработка клеток ММ экстрактами из каланхоэ и алоэ приводила к снижению митохондриального мембранного потенциала на 19 и 53 % соответственно. Результаты показали, что экстракты алоэ, каланхоэ и крапивы не влияли на активность АТФазы и общее количество АТФ.

Заключение. Таким образом, растительные экстракты алоэ, каланхоэ и чистотела обладают терапевтическим потенциалом для лечения ММ.

Фторуглеродные эмульсии с фторпорфиринами вызывают фотонекроз в гипоксии

А.Н. Агаева¹, А.А. Маркова², Е.В. Беляева², С.В. Курков³,
Н.Д. Чкаников², А.А. Штиль⁴

¹ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²ФГБУН «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН», Москва;

³ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» Долгопрудный, Московская обл.;

⁴ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Инициация гибели опухолевых клеток в гипоксии методом фотодинамической терапии при использовании водорастворимых фотосенсибилизаторов ограничена, поскольку эффективность метода зависит от содержания кислорода в системе. Насыщение клеток кислородом возможно при использовании уникальных газотранспортных свойств фторуглеродов, в частности перфтордекалина, растворимость кислорода в котором в 20 раз выше, чем в воде. Введение фторуглеродной фазы в состав фотосенсибилизирующей композиции позволяет вызывать фотонекроз гипоксических клеток, устойчивых к проапоптотическим соединениям.

Синтезированы фторированные хлорины и бактериохлорины, растворимые в перфтордекалине в качестве фотосенсибилизаторов, и на их основе приготовлены фторуглеродные эмульсии в физрастворе, состав которых аналогичен препарату перфторан. Эмульсии накапливаются опухолевыми клетками человека НСТ116 (карцинома толстой кишки), МСF7 (карцинома молочной железы) в течение первых часов инкубации и сохраняются в клетках в течение суток. Возбуждение фотосенсибилизаторов в гипоксии (1 % кислорода) приводит к гибели клеток при эмульсионной формуляции при субмикромольных концентрациях фотосенсибилизатора

в отличие от фотосенсибилизаторов в водной фазе. Фотоиндуцированная гибель клеток достигается при действии эмульсий с фотосенсибилизатором как на линиях дикого типа, так и на сублиниях, устойчивых к доксорубину. Фотоиндуцированный некроз визуализирован при окрашивании клеток пропидия иодидом и сопровождается перекисным окислением липидов цитоплазматической мембраны. Фотоиндуцированный некроз достигается как при культивировании клеток в нормоксии, так и при 2-недельном культивировании клеток в гипоксии (1 % кислорода).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-315-00432).

Производные 3-амино-2-хиноксалинкарбонитрил 1,4-диоксида — перспективные гипоксия-селективные ингибиторы опухолевого роста

Г.И. Буравченко^{1,2}, А.М. Щербаков³,
L.Monzote⁴, А.Е. Щекотихин^{1,2}

¹ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

²ФГБОУ ВО «РХТУ им. Д.И. Менделеева», Москва;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

⁴Institute of Tropical Medicine Pedro Kouri, Havana, Cuba

Кислородный статус злокачественных новообразований — один из ключевых факторов, определяющих плохой прогноз заболевания и эффективность ХТ. Благодаря влиянию на метаболические, молекулярно-генетические, патофизиологические процессы, в том числе пролиферацию, апоптоз, неоангиогенез, миграцию и метастазирование, гипоксия является одной из причин формирования агрессивного фенотипа опухолей. Кроме этого, гипоксия — одна из причин развития резистентности опухоли к различным ХТ-препаратам. Возрастающее значение роли гипоксии и молекулярных механизмов адаптации опухолевых клеток к гипоксии в клинической и экспериментальной онкологии дало начало исследованиям, посвященным созданию новых методов воздействия на это патофизиологическое состояние, и стимулировало поиск пролекарств, подверженных активному метаболизму при снижении уровня кислорода в опухолевой ткани.

Цель исследования — поиск производных хиноксалин-1,4-диоксидов, селективно ингибирующих рост опухолевых клеток в условиях гипоксии, а также изучение влияния заместителей на цитотоксическую активность таких соединений.

Серия 3-аминопроизводных 2-хиноксалинкарбонитрил-1,4-диоксида получена конденсацией замещенных бензофураксанов с малондинитрилом. Цитотоксическую

активность веществ определяли с использованием МТТ-теста (инкубация 72 ч) на клетках РМЖ человека люминального (MCF7) и трижды негативного (MDA-MB-231) подтипа в условиях нормоксии (21 % O₂) и гипоксии (1 % O₂). Введение аминогруппы в положение 3 гетероцикла привело к уменьшению цитотоксичности в отношении клеток РМЖ человека (MCF7, MDA-MB-231) в условиях нормоксии, однако значительно увеличило гипоксическую селективность и растворимость полученных производных в водных средах по сравнению с экспериментальным противоопухолевым агентом тирапазамином. Введение липофильного циклогексанкарбоксамидного фрагмента в положение 3 резко повысило антипролиферативную активность в условиях нормоксии, но в то же время снизило гипоксическую селективность, а также растворимость этих соединений.

Получена серия 3-аминопроизводных 2-хиноксалинкарбонитрил-1,4-диоксида с высокой активностью в отношении клеток РМЖ в гипоксических условиях. Значительный интерес представляет активность разрабатываемого класса соединений в отношении трижды негативного РМЖ, для которого возможности стандартной терапии лимитированы. Кроме этого, соединения-лидеры могут быть использованы для преодоления ХТ-резистентности опухолевых клеток, возникающей при длительной гипоксии. Ввиду высокой гипоксической селективности и низкой токсичности этих соединений полученные данные будут использованы для дальнейшей оптимизации структуры и поиска соединений-кандидатов для разработки противоопухолевых агентов нового поколения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-53-34005) и фонда СИТМА.

Ингибирование протеинкиназы CDK8 для индукции гибели клеток острого миелоидного лейкоза

Е.А. Варламова¹, Ю.В. Володина¹, И. Ронинсон^{1,3}, А.А. Штиль^{1,2}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

³Университет штата Южная Каролина, Коламбия, США

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — тяжелая форма гемобластозов; частота смертельных исходов достигает 70 %. Заболевание поражает пациентов всех возрастных групп, особенно лиц старше 60 лет. Применяемые в настоящее время методы лечения сопровождаются тяжелыми побочными эффектами (кардио- и миелотоксичность), требуется разработка новых терапевтических средств. Важной особенностью молекулярного механизма ОМЛ являются суперэнхансеры — области регуляции экспрессии генов, отдаленные от сайта инициации транскрипции и содержащие

повышенное количество комплексов Mediator, в том числе модуля CDK8/циклин С/Med12/Med13.

В работе исследована возможность ингибирования активности CDK8 для индукции гибели клеток ОМЛ (линия MV4.11). Селективные ингибиторы CDK8 — соединения сенексин В и 15W (1 мкМ) — вызывали существенное увеличение фрагментации ДНК (по данным проточной цитофлуориметрии; субG1-область через 72 ч инкубации) — 30–40 %. Распределение клеток в других фазах цикла не отличалось от контрольных клеток. Через 5–7 сут инкубации клеток линии MV4.11 доля событий в субG1-области возрастала до 64–72 %. По результатам МТТ-теста IC₅₀ сенексина В равно 0,17 ± 0,005 мкМ, а для ингибитора 15W — 0,051 ± 0,002 мкМ.

Таким образом, ингибиторы CDK8 сенексин В и 15W вызывают апоптотическую гибель клеток ОМЛ в субмикромольном и микромольном диапазонах концентраций в первые дни воздействия. Эти результаты свидетельствуют о перспективности ингибирования механизма транскрипционного перепрограммирования для терапии ОМЛ.

Работа поддержана грантом Минобрнауки России (соглашение 14.W03.31.002 с Институтом биологии гена РАН).

Молекулярные механизмы цитотоксичности нового производного антрапиофен-2-карбоксамиды

Ю.Л. Володина¹, Л.Г. Деженкова², А.С. Тихомиров², Д.Н. Калужный³, А.Е. Щекотихин², А.А. Штиль¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

³ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Антрафуранкарбоксамиды — гетероциклические аналоги антрациклиновых антибиотиков с высокой противоопухолевой активностью. Соединения этого класса способны образовывать комплексы с двуцепочечной ДНК, ингибировать топоизомеразы I и/или II, вызывать повреждения ДНК, нарушения клеточного цикла и апоптоз опухолевых клеток, в том числе устойчивых к отдельным химиопрепаратам в результате делеции p53 или гиперэкспрессии Р-гликопротеина [Shchekotikhin A.E. et al. Eur J Med Chem 2016;112:114–29. Tikhomirov A.S. et al. Eur J Med Chem 2018;148:128–39. Volodina Y.L. et al. Eur J Med Chem 2019;165:31–45.]. Лидерное соединение ЛХТА-2034 также ингибирует ряд серинтреониновых протеинкиназ и демонстрирует высокую противоопухолевую эффективность [Shchekotikhin A.E. et al. Eur J Med Chem 2016;112:114–29.]. Важно, что при сходстве структуры

активных соединений выявляются значительные различия их биологических свойств [Volodina Y.L. et al. Eur J Med Chem 2019;165:31–45.]. При дальнейшей оптимизации структуры получены тиофеновые аналоги антрафуранкарбоксамидов. Один из них — антрадиофен-2-карбоксамид ЛХТА-2034 — отличается от всех ранее исследованных аналогов механизмами индукции апоптоза опухолевых клеток. Как и фурансодержащие производные, ЛХТА-2692 модулирует активность топоизомеразы I, но в отличие от этих производных не взаимодействует с двуцепочечной ДНК; вызывает репликационный стресс, не приводящий тем не менее к нарушениям клеточного цикла. Главное отличие ЛХТА-2692 — способность в течение первых часов вызывать падение электрического потенциала митохондрий, нарушение целостности плазматической мембраны, а также расщепление каспаз и поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, что приводит к быстрой гибели опухолевых клеток. Таким образом, новый антрадиофенкарбоксамид ЛХТА-2692 перспективен для изучения особенностей индукции гибели клеток гетероциклическими производными антрахинонов.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых (МК2474.2018.3).

Активность арил-гидрокарбонового рецептора после воздействия доксорубина в культурах клеток человека

Ю.Е. Воронцова, О.Б. Симонова

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН», Москва

Арил-гидрокарбоновый рецептор (Aryl Hydrocarbon Receptor, AHR) — лигандзависимый транскрипционный фактор, который связан с детоксикацией ксенобиотиков и канцерогенезом. Повышенная экспрессия AHR наблюдается в нескольких типах опухолей и клеточных линиях опухолевого происхождения. Кроме этого, оказалось, что в состав фармацевтических препаратов, применяемых в онкотерапии, входят многие лиганды AHR.

Доксорубин — цитостатический препарат, обладающий эффективной противоопухолевой активностью, часто применяется в ХТ злокачественных опухолей. Как и многие ксенобиотические лиганды AHR, доксорубин относится к ряду полиароматических углеводородов. В недавней работе (Volkova и соавт., 2011) было показано, что в культуре кардиомиобластов и миоцитов воздействие доксорубина активирует AHR, что приводит к инициации транскрипции его генов-мишеней. Однако как влияет доксирубин на уровень экспрессии целевых генов AHR в других клеточных линиях, остается неисследованным.

Цель исследования — изучение действия доксорубина на уровень экспрессии генов-мишеней AHR в клеточных культурах человека неопухолевого и опухолевого происхождения.

На культурах клеток человека неопухолевого (HEK293, клетки эмбриональных почек человека; MSC, мезенхимальные стволовые клетки) и опухолевого (PC3, аденокарцинома предстательной железы; Sus/fP2, глиобластома человека) происхождения с помощью ПЦР в реальном времени мы провели сравнительный анализ уровня экспрессии мРНК 3 генов-мишеней AHR (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B*) до (контроль) и после добавления доксорубина. К нашему удивлению, только в 1 опухолевой культуре глиобластомы человека Sus/fP2 было небольшое (в 2,5–3,5 раза) увеличение экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1A2* по сравнению с контрольными клетками (без доксорубина), а в остальных тестируемых культурах клеток уровень экспрессии исследованных целевых генов оставался практически неизменным или понижался. При этом экспрессия этих же генов после добавления других известных экзогенных лигандов AHR (индол-3-карбинол, индирубин) в данные культуры существенно (в 20 раз) повышалась.

Возможно, показанная ранее активация AHR с помощью доксорубина характерна только для клеток сердечной мышцы (кардиомиобластов и миоцитов), а в других клетках действует иной механизм, независимый от AHR-пути. Недавно на дрозофиле было продемонстрировано, что тканеспецифическая активация генов-мишеней AHR человека зависит от их эпигенетического статуса. Возможно, различный эффект действия доксорубина на активацию целевых генов AHR в культурах клеток человека в какой-то мере также зависит и от статуса хроматина (открытый/закрытый) их регуляторных районов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-34-00162 мол-а).

Наночастицы золота — перспективный радиосенсибилизатор для лучевой терапии опухолей

В.А. Глазунова¹, Е.С. Иванова², Ю.Л. Володина²,
Н.А. Самунашвили³, М.Е. Карцева⁴, К.В. Морозов^{1,5},
А.В. Белоусов^{1,5}, О.В. Дементьева⁴, В.М. Рудой⁴,
М.А. Колыванова¹, А.А. Штиль², В.Н. Морозов¹

¹ФГБУ «ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический
центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

³ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

⁴ФГБУН «Институт физической химии и электрохимии
им. А.Н. Фрумкина РАН», Москва;

⁵физический факультет ФГБОУ ВО
«МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Повышение эффективности лучевой терапии — важная научная и клиническая задача. Поиск радиомодификаторов позволил получить новый класс радиосенсибилизаторов — наночастиц элементов с высоким атомным номером. В настоящей работе синтезированы наночастицы золота (НЗ) со средним диаметром 26 ± 2 нм. НЗ (1–50 мкг/мл) нетоксичны для линий опухолевых клеток различного тканевого происхождения. Радиосенсибилизирующий эффект НЗ для линии аденокарциномы толстой кишки НСТ116 оценивали по колониеобразованию через 14 сут после воздействия рентгеновского излучения с максимальной энергией фотонов в спектре 200 кэВ (1–6 Гр). Облучение клеток в присутствии НЗ (10 мкг/мл) приводило к 2-кратному снижению количества колоний. Через 24 ч после облучения в дозе 2–6 Гр наблюдали задержку клеточного цикла в фазе G_2/M , а через 96 ч — увеличение фрагментации ДНК, свидетельствующее о гибели клеток. В присутствии НЗ количество клеток, задержанных в фазе G_2/M после облучения, было выше на ~10 %. Поскольку в основе радиосенсибилизирующего действия НЗ лежит увеличение радиационно-химического выхода свободных радикалов, исследовано радиозащитное действие N-ацетил-L-цистеина. Это соединение (5 мМ) снимало блок G_2/M в клетках в НЗ (10 мкг/мл) при облучении в дозе 4 Гр, что, однако, не влияло на долговременную выживаемость клеток и способность к формированию колоний.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы развития ядерной медицины АО «Наука и инновации» ГК «Росатом».

Цитотоксичность производных даунорубина по отношению к резистентным линиям клеток

А.А. Глоба, Л.В. Аникина, А.В. Семаков, С.А. Пухов,
С.Г. Ключков

ФГБУН «Институт физиологически активных веществ
РАН», Черноголовка, Московская обл.

Одним из важных ограничений использования антрациклиновых антибиотиков при лечении различных злокачественных новообразований является не только широкий спектр побочных действий, но и развитие резистентности клеток опухоли к данному препарату и, соответственно, снижение его активности. Это явление связано со взаимодействием Р-гликопротеина с N3'-атомом молекулы антибиотика. Для предотвращения развития резистентности нами были синтезированы конъюгаты антрациклиновых антибиотиков (доксорубин и даунорубин) с сесквитерпеновыми лактонами. Наибольшей цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток обладали производные с даунорубином (DNR), в частности конъюгат даунорубина с эпоксиизоалантолактоном (L04-DNR). Однако для исследования подобных соединений и установления механизмов их действия необходимо использование резистентных к антрациклиновым антибиотикам опухолевых клеточных линий.

На базе нашей лаборатории из родительской культуры K562 (хроническая миелогенная лейкемия) путем длительного культивирования с DNR (20 пассажей) были получены клетки с фенотипом PgP множественной лекарственной устойчивости (K562/DNR), резистентные к DNR. Далее DNR и L04-DNR были протестированы на родительской и резистентной культурах K562 со временем инкубации 24, 48 и 72 ч. Для определения цитотоксичности использовали тест с резазурином и рассчитывали IC_{50} .

В результате были получены следующие данные: по отношению к линии K562 цитотоксическое действие DNR и L04-DNR развивалось по нарастающей, но к 72-му часу DNR оказался токсичнее L04-DNR. Однако на линии K562/DNR выявлен следующий эффект: IC_{50} для DNR превосходил в 3, 100 и 200 раз, в то время как для L04-DNR только в 3,5; 5 и 25 раз, чем по отношению к родительской K562 через 24, 48 и 72 ч соответственно. Следовательно, L04-DNR сопоставим по активности с DNR для родительской K562, но превосходит исходный противоопухолевый антибиотик для культуры клеток K562/DNR с фенотипом PgP множественной лекарственной устойчивости.

В дальнейшем планируется получение других резистентных культур (Jurkat, HL-60), а также изучение механизмов действия новых соединений.

Скрининг противораковой активности против модели немелкоклеточного рака легкого с мутациями EGFR 790/858 среди препаратов, одобренных FDA

В.А. Голотин¹, Е.В. Байдок¹, Н.А. Барлев^{1,2}

¹ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» Долгопрудный, Московская обл.

При различных онкологических заболеваниях, включая НМРЛ и другие типы эпителиального рака, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) был идентифицирован как критический онкоген. Активирующие соматические мутации в домене тирозинкиназы (ТК) в белке EGFR делают его киназную активность независимой от связывания с лигандом. Такие раковые клетки становятся чувствительными к действию тирозинкиназных ингибиторов (ТКИ) рецептора EGFR. В случае активирующих мутаций в EGFR применяются низкомолекулярные ТКИ, блокирующие доступ молекулы АТФ в ТК-домен рецептора EGFR. В ответ на терапию с помощью ТКИ у пациентов часто возникают дополнительные мутации (например, T790M), которые делают пациентов с мутациями в EGFR устойчивыми к терапии ТКИ (эрлотиниб, gefitinib и т.д.). Возникновение таких мутаций способствует неблагоприятному течению заболевания. Поэтому исследование было направлено на поиск новых терапевтических подходов в виде сочетанной терапии.

Для исследования данного вопроса были использованы линии клеток рака легкого H1299 с искусственно внедренной мутацией EGFR 790/858 и H1299 в качестве референса. Скрининг проводили с использованием библиотеки лекарств, одобренных Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), — L1300-Selleck FDA Approved Drug Screening Library (1175 веществ) и набора для определения активности лактатдегидрогеназы в культуральной среде CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega).

В результате скрининга были обнаружены 36 веществ, селективно воздействующих на линию клеток с двойной мутацией EGFR 790/858 в сочетанной терапии с препаратом gefitinib, в том числе 11 веществ, относящихся к уже используемым в терапии противоопухолевым препаратам, остальные — к противовоспалительным, противорвотным препаратам и антибиотикам широкого спектра действия. Последние, на наш взгляд, являются перспективными для дальнейших исследований в терапии при НМРЛ с мутацией EGFR 790/858.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации 14. W03.31.0029 по привлечению иностранных ведущих ученых в Российские высшие учебные заведения.

Влияние селективного агониста глюкокортикоидного рецептора CpdA-03 на экспрессию генов-регуляторов межклеточной адгезии

Д.Д. Григорьева¹, Е.М. Жидкова², М.Г. Якубовская²,

Е.А. Лесовая^{2,3}

¹ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

³ФГБОУ ВО «РязГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань

Введение. Протоколы комбинированной терапии РМЖ включают синтетические глюкокортикоиды (GC) в качестве адъювантов для уменьшения побочных эффектов цитотоксических препаратов и расширения их терапевтических интервалов. Одновременно с высокоэффективным терапевтическим действием GC при симптоматическом лечении их долгосрочное применение или прием в высоких дозах приводит к развитию различных побочных эффектов, а также может способствовать развитию устойчивости опухолей к ХТ и увеличению их агрессивности. Экспрессия ряда генов, белковые продукты которых регулируют целостность межклеточных контактов, например E-кадгерин, клаудины, коннексины, матриксные металлопротеиназы и др., регулируется GC. Изменения в регуляции экспрессии данных генов может приводить к нарушению межклеточных контактов, активации эпителиально-мезенхимального перехода и стимуляции инвазии и метастазирования.

Терапевтическое действие GC связано в основном с трансрепрессией — белок-белковым взаимодействием рецептора глюкокортикоидов (GR) с факторами транскрипции, а побочное — с реализацией механизма трансактивации за счет взаимодействия димера GR: GR с респонсивными элементами GC в промоторах ряда генов. В настоящее время исследования в этой области направлены на разработку путей селективной активации трансрепрессии. Наиболее перспективными соединениями являются селективные агонисты GR (SEGRA). Ранее в нашей лаборатории были исследованы противоопухолевые эффекты синтетического SEGRA 4-(1-гидрокси-2-пиперидин-1-илэтил)фенола (CpdA-03). Был показан GR-зависимый антипролиферативный и проапоптотический потенциал данного соединения. Настоящая работа сосредоточена на сравнении эффектов классических GC с CpdA-03 в отношении генов-регуляторов целостности межклеточных контактов.

Материалы и методы. В работе использованы клетки РМЖ линий MCF7 и MDA-MB-231. Оценку влияния GC дексаметазона (Dex) и CpdA на гены ICAM1, ANXA1, MMP9, SK1, KLF4, KLF9, IL8, CHD1, RHOB,

COL1A1, *CSF1*, *FIBL1*, *CJUN*, *COX2*, а также на гены, входящие в набор RT² Profiler™ PCR Array Human Cell Junction PathwayFinder (QIAGEN), проводили с помощью количественной ПЦР.

Результаты. CpдA-03, в отличие от Dex, отрицательно регулирует или не влияет на экспрессию *CDH1*, *CDH2*, *COX2*, *KLF4*, гиперэкспрессия которых ассоциирована с ростом метастатического потенциала клеток РМЖ. Обработка CpдA-03 приводит к незначительному снижению уровня экспрессии клаудинов и интегринов, в то время как Dex существенно снижает экспрессию данных генов. В то же время CpдA-03 активирует экспрессию генов, для которых показана способность ингибировать метастазирование (*ANXA1* и *FIBL*).

Заключение. Сохраняя все положительные эффекты GC, CpдA-03 не стимулирует процессы инвазии и метастазирования РМЖ на уровне экспрессии генов.

Особенности моноцитов периферической крови при раке толстой кишки

Е. С. Григорьева^{1,2}, М. Р. Патышева^{1,2}, И. В. Ларионова^{1,2},
Е. О. Казакова², О. Е. Савельева¹, М. В. Завьялова¹,
А. А. Димча^{1,2}, С. Г. Афанасьев^{1,2}, Н. В. Чердынцева^{1,2},
Ю. Г. Кжышковска^{2,3}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

³Институт трансфузионной медицины и иммунологии, Медицинский факультет Маннгейма, Университет Гейдельберга, Гейдельберг, Германия

Циркулирующие моноциты — предшественники опухолеассоциированных макрофагов (ОАМ), которые в основном представлены макрофагами 2-го типа активации (M2). Основными функциями, которые выполняет данный тип клеток, являются подавление иммунного ответа, ремоделирование экстраклеточного матрикса и стимуляция ангиогенеза, однако их роль при раке толстой кишки (РТК) весьма неоднозначна. В одних работах показана связь инфильтрации опухоли M2-макрофагами CD163+ со стадией процесса, с ранними рецидивами, снижением выживаемости (S. Garvin и соавт., 2018). В другом исследовании продемонстрировано, что высокое содержание CD68+ ОАМ, локализованных на границе между опухолью и стромой, коррелирует с большей продолжительностью жизни (J. Forsell, 2007). Также остается неясным вопрос, происходит ли программирование моноцитов в циркулирующей крови или поляризация по M2-пути является следствием взаимодействия с опухолью.

Цель исследования — оценить субпопуляционный состав циркулирующих моноцитов, обладающих экспрессионными характеристиками M2-типа.

В исследование включены образцы периферической крови 11 пациентов с впервые диагностированным РТК и 3 здоровых донора. В периферической крови методом проточной цитофлуориметрии были определены 3 субпопуляции моноцитов (классические — CD14+CD16—; неклассические — CD14—CD16+; переходные — CD14+CD16+); моноциты, экспрессирующие CD163 и CD206. В результате выявлено статистически значимое снижение неклассической субпопуляции моноцитов, экспрессирующих скавенджер-рецептор CD163, у пациентов с КРР по сравнению с группой здоровых доноров. При этом процент неклассических моноцитов, не экспрессирующих CD163, у пациентов с РТК значимо повышался по сравнению с группой здоровых доноров. На материале гистологических срезов от 38 пациентов с РТК проведено ИГХ-исследование экспрессии рецептора CD163. Выраженность экспрессии оценивали по 4-балльной системе, при этом среднее значение экспрессии CD163 в стромальных элементах опухоли составило $3,39 \pm 0,88$.

Полученные результаты указывают на возможность рекрутирования M2-поляризованных моноцитов неклассической субпопуляции из циркулирующей крови в опухолевую ткань, что выражается в снижении их количества в циркуляции и наличии высокой экспрессии CD163 в опухолевой ткани. Действительно, в ряде работ имеется подтверждение того, что CD14—CD16+ моноциты могут выходить из сосудистого русла и дифференцироваться в макрофаги с альтернативно активированным фенотипом (С.Е. Olingy и соавт., 2017). Вероятно, таким образом циркулирующие CD14—CD16+CD163+ моноциты могут пополнять пул ОАМ с проопухолевыми свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-15-00151).

Генетические и экспрессионные особенности рецептора сосудисто-эндотелиального фактора роста 2-го типа (VEGFR2) у больных раком молочной железы, получавших тамоксифен

Т. А. Дронова^{1,2}, Н. Н. Бабышкина^{1,2}, А. В. Дорошенко¹,
Н. В. Чердынцева^{1,2}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

Введение. Рецептор сосудисто-эндотелиального фактора роста 2-го типа (VEGFR2/KDR) является ключевым звеном VEGF-зависимой активации внутриклеточных сигнальных путей (PI3K/Akt, MAPK, eNOS), определяющих процессы клеточной пролифе-

рации, миграции и ангиогенеза.

Цель исследования — изучить полиморфизм генов *KDR* rs2305948 и *AKT1* rs1130233, а также уровень экспрессии VEGFR2, Akt (pS473) и VEGFR2/Akt (pS473) в опухоли у 141 пациентки с РМЖ в зависимости от эффективности антиэстрогенной терапии тамоксифеном и исхода заболевания.

Материалы и методы. Эффективность тамоксифена оценивали на основании отдаленных результатов лечения (отсутствие прогрессирования или наличие отдаленных метастазов/рецидива). Генотипирование полиморфных локусов rs2305948 и rs1130233 проведено с помощью TaqMan-зондов. Количество клеток, экспрессирующих VEGFR2, Akt (pS473) и VEGFR2/Akt (pS473), определено методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. У больных с прогрессированием заболевания количество опухолевых клеток, экспрессирующих Akt (pS473), значительно выше по сравнению с пациентками без признаков прогрессии ($p = 0,048$). Опухоли, резистентные к тамоксифену, характеризуются высоким уровнем экспрессии клеток с фенотипом VEGFR2⁺/Akt (pS473)⁺ ($p = 0,074$). Показано, что мутантный аллель гена *KDR* rs2305948 ассоциирован с высокой эффективностью тамоксифена как в общей группе больных РМЖ, так и среди пациенток с люминальным А типом опухоли ($p = 0,015$ и $p = 0,032$ соответственно). Кроме этого, пациентки с наличием в опухоли мутации rs2305948 имеют высокие показатели выживаемости без прогрессирования ($p = 0,012$ — общая группа; $p = 0,031$ — люминальный А тип).

Заключение. VEGFR2-опосредованная активация сигнальных путей PI3K/Akt может определять формирование опухолевого фенотипа, резистентного к тамоксифену.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-75-30016).

Применение системной биологии для разработки новых методов стимуляции противоопухолевого иммунитета

М.С. Духинова

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург;

Итальянский технологический институт, Неаполь, Италия

Системная биология — одно из новых направлений в сфере биомедицины, в котором используется комбинация различных компьютерных и экспериментальных методов для полной реконструкции нормальных и патологических клеточных процессов. В частности, системная биология является перспективным подходом в изучении механизмов дисфункции — так называемого истощения Т-клеток в опухолевой среде.

Истощенные Т-клетки обладают измененным генетическим и эпигенетическим профилями, характеризуются нарушениями метаболизма, пролиферации и функциональной активности против раковых клеток, однако эффективных способов предотвратить или остановить это явление пока не существует.

Мы провели биоинформатический анализ Т-клеток, выделенных из мышинной нейробластомы, для выявления потенциальных молекулярных механизмов истощения иммунного ответа, а также *in vitro* сканирование возможных лекарств для реактивации истощенных лимфоцитов.

Цитотоксические Т-клетки, инфильтрированные в область опухоли, обладают определенной генетической подписью, включающей дифференцированную экспрессию ряда функциональных (интерлейкин-2-STAT5) и метаболических (гомеостаз холестерина, mTORC1-сигнальный путь) кластеров. В то время как современная иммунотерапия стимулирует функциональную активность Т-клеток, мы проверили, возможно ли использовать метаболические сигнальные пути для предотвращения истощения лимфоцитов. Для этого мы выявили потенциально эффективные соединения методом биоинформатического анализа (drug-set enrichment analysis) и исследовали их эффект в *in vitro* модели Т-клеточной дисфункции. Протестированные соединения регулировали активность метаболических сигнальных путей в хронически стимулированных Т-лимфоцитах и снижали экспрессию маркеров истощения и дисфункции, PD1, CTLA-4 и Tim3. Эти иммуностимуляторные препараты будут в последствии протестированы в *in vivo* моделях, а также предложены для клинических испытаний.

В заключение нами была предложена новая стратегия для быстрого и надежного анализа уже имеющихся лекарств или терапевтических методик на основе биоинформатического анализа генетического профиля клеток и *in vitro* моделей. В частности, мы выявили важные метаболические механизмы ингибирования противоопухолевого иммунитета, а также обнаружили новые подходы к реактивации иммунитета для уничтожения раковых клеток.

Универсальные системы диагностики опухолевых заболеваний на основе дендримеров и металлокомплексов редкоземельных металлов

А.И. Заболотский^{1,2}, Е.Д. Никольская^{2,3}, М.Р. Фаустова^{2,4},
М.Б. Сокол², М.В. Фомичева², О.А. Жунина^{2,3},
А.Г. Катруха¹, Р.В. Петров⁵, Н.Г. Яббаров^{2,4}

¹ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», Москва;

³ФГБУН «Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН», Москва;

⁴ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва;

⁵ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академ. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

В рамках исследования был разработан метод получения контрастных агентов для использования в МРТ на основе полиамидаминовых (ПАМАН) дендримеров, хелаторов DOTA и DTPA и векторных молекул: третий домен альфа-фетопротейна (АФП) (r3dAFPpG), пептид, взаимодействующий с рецептором АФП GKQEFLLING (KQ), рекомбинантный эпидермальный фактор роста человека (rEGF) и пептид, взаимодействующий с рецептором EGF HER1 — YHWYGYTPQNVI (YH). Было показано, что с поверхностью дендримеров G2 конъюгировалось в среднем 4 молекулы хелатора (DOTA, DTPA), к дендримерам G3 — в среднем 9 молекул хелатора, а к G4 — 19 молекул. Был подобран оптимальный метод введения ионов Gd^{3+} в состав модифицированных DOTA, DTPA дендримеров и подобраны методики очистки полученных соединений G(2-4)-DOTA(Gd) и G(2-4)-DTPA(Gd). Было показано, что конъюгаты, содержащие векторные молекулы, селективно накапливались в опухолевых клетках линий A549, HeLa, SKOV3, MCF7 в отличие от G(2-4)-DOTA(Gd)/DTPA(Gd), при этом ни один из них не оказывал значительного токсического действия *in vitro*. Было показано, что активность всех конъюгатов находилась на достаточно низком уровне ($IC_{50} > 350 \text{ мкмоль} \times \text{л}^{-1}$) в отношении клеток линий A549, MCF7 и SKOV3. Предварительные исследования *in vivo* с использованием подкожных трансплантатов АФП⁺ модели лейкоза мыши линии P388 и HER1⁺ модели немелкоклеточной карциномы легкого человека линии A549 с помощью ICP-MS-анализа выявили преимущественное накопление Gd в опухолевой ткани, а также частичное в печени и селезенке после введения конъюгатов rEGF-G4-DOTA (Gd), rEGF-G4-DTPA (Gd) и 3dAFPpG-G4-DTPA (Gd).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09022/19).

Способность кураксина CBL0137 преодолевать множественную лекарственную устойчивость

М.Н. Зацепина^{1,2}, Т.И. Фетисов¹, Н.И. Моисеева¹,
Е.А. Лесовая^{1,3}, М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,4}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России, Москва;

³ФГБОУ ВО «РязГМУ им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России, Рязань;

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Введение. Одной из современных проблем ХТ является развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Среди возможных подходов к преодолению МЛУ считается влияние на белки, осуществляющие транспорт ксенобиотиков из клетки. Р-гликопротеин (Р-гр) — трансмембранный белок, член семейства ABC-транспортёров, осуществляющий транспорт из клеток сотен химических соединений, в том числе противоопухолевых препаратов. Кураксин CBL0137 — перспективное противоопухолевое соединение, для которого показана способность влиять на ряд сигнальных путей, в том числе Wnt. Нарушение регуляции этого сигнального пути является важным элементом патогенеза опухолей кроветворной системы, который приводит к приобретению опухолевыми клетками таких свойств, как неконтролируемая пролиферация, миграция, апоптоз, поддержание фенотипа стволовых клеток и развитие МЛУ, в том числе за счет экспрессии Р-гр.

Цель исследования — оценить способность кураксина ингибировать экспрессию Р-гр и sensibilizировать опухоли кроветворной системы к цитостатическим препаратам.

Материалы и методы. В данной работе использовались клеточные линии опухолей кроветворной системы ТНР-1, K562 и K562IS9. Цитотоксичность определяли в МТТ-тесте, экспрессию гена *MDR-1* исследовали методом ОТ-ПЦР, количество белка Р-гр изучали с помощью проточной цитофлуометрии.

Результаты. Кураксин продемонстрировал высокий и сопоставимый уровень цитотоксичности на 2 клеточных линиях ТНР-1 и K562, а также на резистентном клоне K562IS9. Кроме этого, кураксин увеличивал цитотоксичность доксорубина, даунорубина, иматиниба и цитарабина на исследуемых линиях, в значительной степени у резистентного субклона. Также кураксин снижал экспрессию гена *MDR-1* во всех линиях и снижал экспрессию Р-гр на мембране K562IS9.

Заключение. Кураксин увеличивает чувствительность клеток линий опухолей кроветворной системы к цитостатическим препаратам и ингибирует экспрессию *MDR-1*. Таким образом, влияние на экспрессию

MDR-1 можно рассматривать как один из механизмов преодоления МЛУ кураксином.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-315-90098).

Влияние полифенолов на экспрессию онкогенов, опосредованное стабилизацией G-квадруплексов в промоторных областях

Р.Г. Зенков¹, О.А. Власова¹, Д.С. Набережнов¹,
Н.Ю. Карпеченко¹, К.И. Кирсанов^{1,2}, М.Г. Якубовская¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Введение. G-квадруплексы (G4) — альтернативные конформации ДНК, формирование которых влияет на реализацию различных процессов в клетках человека. К таким процессам можно отнести экспрессию генов. Результаты исследований показали ингибирующее действие соединений, стабилизирующих G4, на экспрессию онкогенов, промоторы которых обогащены данными последовательностями. Для некоторых полифенолов — вторичных метаболитов растений — была продемонстрирована способность стабилизировать G4. Однако сравнительный анализ взаимодействия полифенолов с G4 в рамках одной системы с изучением их последующего влияния на экспрессию онкогенов до настоящего времени не был проведен.

Цель исследования — изучение взаимодействия полифенолов с G4 в промоторах онкогенов и сопряженного с ним влияния на экспрессию данных генов.

Материалы и методы. Аффинность полифенолов к 8 G4-последовательностям из промоторов 7 онкогенов измеряли методом конкурентного вытеснения флуорофора G4-FID. Для определения нетоксичных концентраций цитотоксическую активность соединений исследовали с помощью метода МТТ на 2 линиях опухолевых клеток человека (HeLa и HT1080) и 2 иммортализованных линиях (NKE и HaCaT). Влияние полифенолов на экспрессию гена сМYC в этих линиях оценивали методом ПЦР в реальном времени. Для доказательства влияния G4-стабилизирующего действия веществ на экспрессию сМYC использовали люциферазный репортерный анализ. Последовательность промотора сМYC была клонирована в вектор, несущий ген люциферазы светлячка. В полученную плазмиду была внесена замена, нарушающая формирование G4. Исходная и мутантная плазмиды были трансфицированы в клетки линии HeLa для последующей обработки веществами.

Результаты. Методом G4-FID зарегистрирована высокая аффинность к G4 для сангвинарина, кверцетина, кемпферола и тимохинона. Из всего ряда

соединений наибольшую аффинность показал сангвинарин. С помощью ПЦР в реальном времени установлено, что 4 указанных лиганда подавляют экспрессию сМYC в линиях HeLa и HT1080. В линиях NKE и HaCaT вещества продемонстрировали менее выраженный эффект. Данные люциферазного репортерного анализа на линии HeLa подтверждают подавление экспрессии сМYC за счет стабилизации G4: относительное снижение экспрессии при действии полифенолов зарегистрировано при сопоставлении эффекта на конструкции с нативным промотором сМYC и конструкции с заменой, нарушающей формирование G4.

Заключение. Полученные данные указывают на то, что полифенолы сангвинарин, кверцетин, кемпферол и тимохинон связывают G4 в промоторах ряда онкогенов. Благодаря аффинности к этим вторичным структурам и их стабилизации данные соединения подавляют экспрессию онкогенов, что было показано на примере сМYC. Предположительно, это является одним из механизмов противоопухолевого действия исследуемых полифенолов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-75-00115).

Адресующие пептиды как средство доставки лекарств к опухоли

А.А. Ильичев, М.Б. Боргоякова, Л.И. Карпенко

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл.

Химиотерапия для лечения онкологических заболеваний — это курс многократного введения лекарств в низкой концентрации, в результате чего происходит снижение его эффективности, а проблема накопления токсинов в тканях ведет к развитию побочных эффектов. Тем не менее химические соединения на данный момент наиболее широко используются для лечения онкологических заболеваний и замены в ближайшем будущем им не будет. Решением проблемы может быть создание комбинированных лекарств, состоящих из адресной молекулы, обеспечивающей избирательность, и терапевтической молекулы с противоопухолевым действием. В качестве направляющей части могут выступать антитела к опухольассоциированным антигенам или компонентам стромы опухоли. МА имеют определенные недостатки, связанные главным образом с физиологическими факторами, а также с большими размерами молекул антител. Преодолеть проблему возможно путем использования опухольспецифичных пептидов, которые можно получить с помощью технологии фагового дисплея. Пептиды можно использовать в качестве адресующих молекул, в том числе в составе наночастиц, содержащих внутри лекарство и способных легко маневрировать в кровотоке, т.е. обеспечивать доставку ХТ-препарата в нужное место.

В докладе будут рассмотрены результаты работы нашей лаборатории по отбору с помощью технологии фагового дисплея пептидов длиной от 7 до 12 аминокислотных остатков с высокой тропностью к экспериментальным опухолям. Анализ распределения отобранных пептидов по органам лабораторных животных в составе фагов показал, что они в десятки раз выше накапливаются в опухоли по сравнению с другими органами. Выявлены мишени, узнаваемые отобранными пептидами.

Таким образом, полученные пептиды могут быть использованы в качестве адресующих агентов при создании средств доставки лекарственных препаратов к опухоли или же обеспечить визуализацию злокачественных новообразований.

Регулируемые Т-клетки, модифицированные химерными антигенными рецепторами, на основе комплекса барназа-барстар для адоптивной иммунотерапии

Р.С. Калинин, А.В. Степанов, С.М. Деев, А.Г. Габибов

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

В борьбе с опухолевыми заболеваниями наиболее перспективным направлением персонализированной медицины является иммунноклеточная терапия с применением Т-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR-T). CAR-T-терапия позволила добиться впечатляющих результатов в борьбе с гематологическими онкологическими заболеваниями. Однако широкое применение CAR-T-терапии затруднено из-за осложнений, ассоциированных с неконтролируемой гиперактивацией и неспецифической цитотоксичностью. В результате этого возникает риск развития опасных для жизни побочных эффектов, таких как «цитокиновый шторм» и синдром лизиса опухоли. Поэтому сохранение возможности контролировать терапевтические клетки в режиме реального времени является крайне актуальной задачей.

Для создания регулируемых CAR-T нами была изменена основная парадигма адоптивной клеточной терапии, которая подразумевает непосредственный контакт опухолевой клетки и CAR-T-клетки. Новизна технологии заключается в применении 3-го компонента, который является промежуточным звеном между раковыми и терапевтическими клетками. Модульность такого подхода также позволит расширить диапазон антигенов при использовании одних и тех же CAR-T-клеток. Нами выбрана молекула-посредник, в состав которой входит дарпин-миметик антитела, распознающий раковый

антиген HER2нео и слитую с ним барназу (бактериальная РНКаз), которая специфически связывается со своим природным ингибитором — барстаром, он, в свою очередь, входит в распознающий домен CAR. Мы показали работу нашего подхода на репортерной клеточной системе на основе линии Jurkat NFAT Luc, которая в ответ на взаимодействие с раковыми клетками BT-474 с гиперэкспрессией HER2нео дозозависимо от молекулы-посредника секретировала люциферазу. Кроме этого, мы создали настоящие CAR-T, которые также обладали дозозависимой цитотоксичностью. Стоит заметить, что без молекулы-посредника CAR-T анергичны, что в дальнейшем позволит сделать безопасную и регулируемую CAR-T-терапию. Далее планируется провести эксперименты *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-74-30019).

Кандидатная ДНК-вакцина против меланомы: дизайн и исследование иммуногенных свойств *ex vivo*

Л.И. Карпенко, Е.А. Боробова, Д.В. Антонен, С.И. Бажан, А.А. Ильичев

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл.

Центральными агентами противоопухолевого иммунного ответа являются CD8⁺-цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) и CD4⁺ Т-хелперы, которые обладают противоопухолевой активностью и ассоциированы с лучшим прогнозом выживания у больных раком. Активированные ЦТЛ способны специфически распознавать и уничтожать малигнизированные клетки. Одна из задач иммунотерапии опухолей — разработка вакцин, способных активировать ЦТЛ у больного, чтобы обеспечить противоопухолевый Т-клеточный ответ.

Привлекательным направлением в иммунотерапии опухолей является подход по созданию ДНК-вакцин, кодирующих полиэпитопные иммуногены, содержащие Т-клеточные эпитопы из основных опухолеассоциированных антигенов. Нами с помощью компьютерных методов предсказания Т-клеточных эпитопов и дизайна полиэпитопных антигенов были разработаны 2 конструкции — MEL-TCI и MEL-A0201, составленные из Т-клеточных эпитопов 6 иммунодоминантных меланомных антигенов (NY-ESO-1, MART1, MAGE-A1, MAGE-A11, MAGE-A3 и MAGE-C1) — соответственно, «универсальная», в которую включены эпитопы, рестриктированные наиболее распространенными аллельными вариантами молекул HLA I класса, и аллельспецифическая, в которую включены эпитопы, рестриктированные HLA-A*02:01. Искусственные гены, кодирующие данные полиэпитопы, были встроены в состав плазмиды pcDNA3.1. Показано, что

полученные генетические конструкции обеспечивают синтез соответствующих мРНК и белков в культуре трансфицированных эукариотических клеток НЕК293. Дендритные клетки HLA-A*02:01⁺ доноров, трансфицированные ДНК вакцинными конструкциями, стимулировали у аутологичных Т-лимфоцитов развитие специфической цитотоксической активности в отношении клеток меланомы Mel Is в модели индукции Т-клеточного ответа *ex vivo*. Причем как по эффективности индукции цитотоксического ответа, так и по уровню продукции гранзимов аллелеспецифическая конструкция достоверно превзошла ДНК-вакцинную конструкцию, кодирующую полноразмерный белок MART1.

Направленная доставка цитотоксичных ионов Tl^{+} бактериофагом MS2, конъюгированным с iRGD-пептидами, к солидным опухолям

Е. Ф. Колесанова¹, Е. Ю. Рыбалкина², М. В. Мельникова¹,
Т. Н. Большакова³, И. Г. Сивов⁴

¹ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии
им. В. Н. Ореховича», Москва;

²НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

³ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. акад.
Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

Введение. Ионы Tl^{+} , обладающие мощным цитотоксическим действием, избегают воздействия систем лекарственной устойчивости опухолевых клеток. В качестве непротекающего контейнера для снижения общетоксического действия таллия на организм представляет интерес бактериофаг MS2, РНК которого прочно связывает ионы Tl^{+} . Конъюгация капсидного белка MS2 с iRGD-пептидами — лигандами интегринов $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ — способна обеспечить направленную доставку этого контейнера к неоэндотелиоцитам патологической сосудистой сети солидных опухолей и клеткам некоторых опухолей.

Цель исследования — экспериментальная проверка эффективности потенциального противоопухолевого препарата в виде наполненного Tl^{+} бактериофага MS2 с адресными iRGD-пептидами (iRGD-MS2- Tl^{+}).

Материалы и методы. Продукцию бактериофага MS2 вели в клетках *Escherichia coli* «мужского» штамма, несущего F-пили. iRGD-пептиды структуры GGG (CRGD [K, R] PG [D, E] C) cyclized получали твердофазным пептидным синтезом с очисткой ВЭЖХ на обращенной фазе. Конъюгацию пептидов с бактериофагом проводили с помощью диметиладипимидата. Для заполнения бактериофага MS2 Tl^{+} использовали $TlNO_3$. Концентрацию Tl^{+} определяли спектрофлуориметрически

по тушению флуоресценции 1,3,6,8-пирентетрасульфата натрия. Конъюгаты бактериофага MS2 с каждым из 4 iRGD-пептидов получали отдельно, затем наполняли Tl^{+} и смешивали в равных количествах. Цитотоксическое действие iRGD-MS2- Tl^{+} на клетках в культуре исследовали на линиях MCF7 (гормонзависимый РМЖ), MDA-MB-231 (гормоннезависимый РМЖ) и PC-3 (аденокарцинома предстательной железы). Противоопухолевое действие препарата iRGD-MS2- Tl^{+} оценивали на мышах *nude* с ксенографтами РМЖ (MCF7). Исследование острой токсичности препарата iRGD-MS2- Tl^{+} проводили на крысах Wistar-Kyoto.

Результаты. Препарат iRGD-MS2- Tl^{+} содержал $2,0 \times 10^{-9}$ г-экв таллия в расчете на 10^8 бляшкообразующих единиц (БОЕ) бактериофага MS2. Истечения Tl^{+} из частиц бактериофага во внешнюю среду не обнаружено. В опытах на культуре клеток PC3, несущих на поверхности интегрины $\alpha_v\beta_3$, препарат iRGD-MS2- Tl^{+} вызывал агглютинацию клеток с последующей их гибелью. Этот препарат также проявлял цитотоксическое действие и на культурах клеток MCF7 и MDA-MB-231 без агглютинации и с наиболее выраженной активностью в бессывороточной среде (в условиях усиленного захвата из среды питательных веществ). У мышей с ксенографтами MCF7 через 12 дней после введения препарата iRGD-MS2- Tl^{+} наблюдалось достоверное ($p < 0,05$) уменьшение объема опухоли по сравнению с животными контрольных групп. Гистохимически было показано некротизирующее действие iRGD-MS2- Tl^{+} на опухоль. При однократном введении крысам дозы препарата iRGD-MS2- Tl^{+} в 10^8 БОЕ/животное (1,6–2,0 мкг таллия/кг) в течение 3 нед наблюдения не пало ни одного животного. Суммарная терапевтическая доза Tl^{+} (4 мкг/кг) была меньше его LD_{50} (20 мг/кг) в 5000 раз.

Заключение. Обеспечиваемая специфичным пептидным лигандом направленная доставка токсичного иона Tl^{+} наноконтейнером в виде бактериофага MS2 в опухолевую ткань вызывает эффективный распад опухоли при значительном снижении вероятности токсического воздействия на организм в целом. Это позволяет рекомендовать iRGD-MS2- Tl^{+} как объект фармацевтической разработки лекарственного препарата для терапии ряда солидных опухолей.

Работа выполнена при частичной поддержке ООО «Биотехнология», ООО «Инженер» (эксперименты на клетках PC3), Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 гг., тема № 0518-2014-0003 (разработка методик синтеза пептидов). Синтезы пептидов выполнены на оборудовании ЦКП «Протеом человека» (ИБМХ).

Влияние PARP1 на структуру двухлинкерных нуклеосом

Д.О. Кошкина¹, Н.В. Малюченко¹, А.В. Феофанов^{1,2},
В.М. Студитский^{1,3}

¹Кафедра биоинженерии биологического факультета
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;

³Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, США

Фермент поли(АДФ-рибоза)полимераза-1 (PARP1) является распространенным ядерным белком, осуществляющим процесс поли-АДФ-рибозилирования белков. PARP1 вовлечен в процессы репарации, репликации, транскрипции, регуляции клеточного цикла, апоптоза, воспаления и старения клетки. Скорее всего, такой большой спектр активности связан со способностью PARP1 модулировать структуру хроматина. Однако механизмы хроматинмоделирующей способности PARP1 нуждаются в более детальном изучении.

Удобной моделью исследования архитектурной функции белков являются моонуклеосомы, которые состоят из октамера коровых белков-гистонов, вокруг которого обвита двуцепочечная ДНК с 2 линкерными участками, выходящими за пределы нуклеосомного кора.

С помощью меченых праймеров методом ПЦР были синтезированы матрицы для сборки нуклеосом длиной 187 и 227 п. н. На их основе было получено 5 типов нуклеосом, 2 из которых содержали метки в линкерной области, другие — в проксимальной, медиальной и дистальной областях нуклеосомной ДНК. Нуклеосомы получали методом ступенчатого диализа согласно методике, описанной ранее (D.A. Gaykalova и соавт., 2009). Образование комплексов нуклеосома-PARP1 изучали методом гель-шифт-анализа по изменению их электрофоретической подвижности в нативном 5 % полиакриламидном геле и с помощью измерений spFRET в растворе с помощью методов, описанных в ранних работах (K.S. Kudryashova, и соавт., 2015).

В результате обнаружено, что при взаимодействии молекул PARP1 с нуклеосомой происходит сближение линкерных участков и дезорганизация внутринуклеосомной ДНК в проксимальной и дистальной областях. В целом на модели строгопозиционированных нуклеосом было показано, что PARP1 оказывает существенное хроматинмоделирующее воздействие

*Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (проект № 17-00-00132. Комфи).*

Влияние эпигенетически активных противоопухолевых препаратов на интегральное метилирование ДНК

В.П. Максимова¹, О.Г. Усалка², О.П. Лизогуб^{1,2},
М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,3}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России, Москва;

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Введение. Метилирование ДНК — наследуемая эпигенетическая модификация, которая играет важную роль в таких процессах, как геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы и подавление транскрипции и транспозиции повторяющихся геномных элементов. Аберрантное изменение профиля метилирования ДНК ассоциировано с различными заболеваниями, в том числе онкологическими. Во многих типах опухолей характер метилирования геномной ДНК изменяется либо посредством глобального гипометилирования, характеризующегося активацией транскрипции транспозированных элементов, либо региональным гиперметилированием, результатом которого является репрессия различных последовательностей, в том числе генов онкосупрессоров. В настоящее время одной из актуальных задач современной онкологии является поиск противоопухолевых препаратов, способных влиять на метилирование ДНК и эпигенетически модулировать экспрессию генов. Ранее нами было показано, что бортезомиб, гемцитабин, дексаметазон, доцетаксел, оксалиплатин, цетуксимаб, цитарабин, энзастаурин способны активировать экспрессию эпигенетически репрессированного гена *GFP* в тест-системе HeLa T1.

Цель исследования — изучение влияния этих препаратов на интегральное метилирование ДНК, а также на экспрессию генов ДНК-метилтрансфераз.

Материалы и методы. Изменение уровня интегрального метилирования ДНК изучали анализом на основе рестрикции геномной ДНК эндонуклеазами HpaII и MspI, первая из которых действует только на неметилированные последовательности CCGG, а вторая чувствительна как к метилированным, так и к неметилированным сайтам. Продукты расщепления сравнивали с помощью стандартного электрофореза. В качестве положительного контроля использовали деметилирующие агенты — 5-азациитидин и децитабин. Изменение уровня мРНК генов *DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B* оценивали с помощью ОТ-ПЦР.

Результаты. Мы показали, что после обработки бортезомибом, дексаметазоном и энзастаурином количество ДНК, расщепленной эндонуклеазой HpaII, уменьшалось на 36,7; 33,5 и 55,8 % соответственно, что говорит о деметилирующем действии этих препаратов. При этом цетуксимаб увеличивал количество

данной фракции ДНК на 30,9 %, что означает уменьшение числа деметилированных сайтов. Для остальных соединений статистически значимого изменения количества деметилированной ДНК не получено. В исследовании уровня экспрессии генов ДНК-метилтрансфераз мы продемонстрировали, что бортезомиб и энзастаурин снижают уровень мРНК генов *DNMT3A* (в 2,5 и 1,9 раза) и *DNMT3B* (1,6 и 1,7 раза).

Закключение. Если принимать во внимание, что бортезомиб и энзастаурин снижают как экспрессию генов ДНК-метилтрансфераз, так и уровень глобального метилирования ДНК, мы предполагаем, что эти препараты могут активировать эпигенетически репрессированные гены и могут быть исследованы в качестве адъювантной эпигенетической терапии для различных опухолей. Дексаметазон также потенциально способен реактивировать транскрипцию эпигенетически репрессированных генов. Механизм действия цетуксимаба необходимо исследовать дополнительно.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 18-75-00115).

Мононуклеосомная система скрининга ингибиторов поли(АДФ-рибоза)полимеразы-1

Н.В. Малюченко¹, Д.О. Кошкина¹, А.А. Лыс¹,
В.М. Студитский^{1,2}, А.В. Феофанов^{1,3}

¹Биологический факультет ФГБОУ ВО
«МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США;

³ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Неконтролируемое деление опухолевых клеток сопровождается накоплением повреждений ДНК, способных вызвать гибель клеток. Поли(АДФ-рибоза)полимеразы-1 (PARP1) распознает повреждения и обеспечивает быстрое привлечение к ним ферментов репарации, поддерживая стабильность генома. Это свойство PARP1 активно используется опухолевыми клетками для защиты от гибели. Ингибиторы PARP1 (iPARP) являются перспективными противоопухолевыми агентами. Более 200 таких соединений проходят клинические испытания, а 4 iPARP уже получили разрешение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США на применение в клинической практике. Недавно был обнаружен новый механизм действия iPARP, связанный с «арестом» PARP1 в комплексе с ДНК. «Арестованные» комплексы ДНК-PARP1, являясь препятствием для нормального протекания ядерных процессов, вызывают сильный цитотоксический эффект. Поиск соединений, эффективно вызывающих «арест» комплексов ДНК-PARP1, является важным для разработки новых противоопухолевых лекарств. Поскольку

PARP1 в клетке взаимодействует с ДНК в составе нуклеосом, то использование нуклеосом считается перспективным для создания физиологических бесклеточных систем поиска iPARP.

Представляем результаты разработки флуоресцентной нуклеосомной системы для выявления iPARP, вызывающих «арест» комплексов ДНК-PARP1. В разработанной тест-системе изучены 3 известных iPARP (олапариб, талазопариб и велипариб) и госсипол, соединение с потенциальным ингибирующим действием. Обнаружено, что наименее эффективный «арест» комплексов ДНК-PARP1 вызывает велипариб. По ингибированию каталитической активности госсипол уступал всем изученным в работе iPARP. Рассмотрены преимущества и особенности применения новой нуклеосомной тест-системы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-54-33045).

Биоинформатический анализ участка связывания ингибиторов в белках семейства поли(АДФ-рибоза)полимераз

Г.А. Манасарян¹, Д.К. Нилов²

¹Факультет фундаментальной медицины
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Поли(АДФ-рибоза)полимеразы (PARP) осуществляют посттрансляционную модификацию белков, перенося остаток АДФ-рибозы с НАД⁺ на белок-акцептор. Семейство PARP представлено 16 белками с разнообразными функциями, в том числе связанными с жизнеобеспечением раковых клеток. В частности, PARP1 участвует в устранении одно- и двуцепочечных разрывов цепи ДНК и может обеспечивать устойчивость клеток к ДНК-повреждающим химиопрепаратам, а PARP5 модифицирует белок аксин в сигнальном пути Wnt, что способствует пролиферации клеток.

Поиск как универсальных ингибиторов PARP, так и селективных ингибиторов конкретных представителей семейства является перспективным направлением в противоопухолевой терапии. Дизайн ингибиторов PARP обычно затрагивает участок связывания никотинамидной группы НАД⁺ в активном центре.

Цель исследования — сравнение данного участка у белков PARP1–16 и выявление остатков, важных для селективного связывания потенциальных ингибиторов.

Для этого использовались алгоритмы выравнивания аминокислотных последовательностей в программе Clustal Omega и наложения белковых структур в MATP. Для белков с неизвестной структурой (PARP4, -6–9, -11) были определены ближайшие

гомологи с помощью программы BLASTP. В результате выявлены консервативные и вариабельные остатки, вовлеченные во взаимодействие с субстратом и потенциальными ингибиторами. Среди доступных структур Protein Data Bank для каждого представителя PARP выбрана и охарактеризована наиболее репрезентативная конформация. Обнаружено, что в позиции 863 (нумерация для PARP1) практически у всех представителей PARP находится глицин, образующий ключевые водородные связи с субстратом. В позиции 903 может находиться как положительно заряженный лизин, так и гидрофобные остатки. В PARP5, -13 и -15 подвижная d-петля может принимать участие в формировании активного центра и образовывать дополнительные взаимодействия, что следует учитывать при дизайне селективных ингибиторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-74-10072).

Радиомодифицирующее действие наночастиц золота: роль напряжения на рентгеновской трубке

К.В. Морозов^{1,2}, М.А. Колыванова^{1,3}, М.Х. Салпагаров¹,
М.Е. Карцева⁴, О.В. Дементьева⁴, А.К. Исагулиева⁵,
А.В. Белоусов^{1,2}, В.М. Рудой⁴, А.А. Штиль^{1,6},
В.Н. Морозов^{1,3}

¹ФГБУ «ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России», Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

⁴ФГБУН «Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН», Москва;

⁵ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

⁶ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Наночастицы металлов с высоким атомным номером (Z), особенно наночастицы золота (ЗНЧ), являются многообещающим классом противоопухолевых радиосенсибилизаторов. Однако даже относительно небольшие изменения свойств ЗНЧ влияют как на их взаимодействие с клетками, так и на физико-химические процессы радиомодификации. Кроме этого, важную роль играют условия облучения.

В настоящей работе была исследована зависимость эффективности радиационно-индуцированных повреждений плазмидной ДНК в присутствии 26 ± 2 нм ЗНЧ от напряжения на рентгеновской трубке.

Материалы и методы. Облучение образцов проводили на аппарате РУСТ-М1 при напряжении на лучевой трубке от 100 до 200 кВ. Для оценки величины радиосенсибилизирующего действия ЗНЧ рассчитывали значение фактора увеличения дозы (ФУД).

Результаты. Концентрация ЗНЧ варьировалась от 0,12 до 2,4 мг/мл. При этом наибольшая эффективность была достигнута при концентрации ЗНЧ, равной 2,4 мг/мл. Результаты экспериментов показали критическое влияние напряжения на рентгеновской трубке: при увеличении напряжения значительно возрастает эффект радиосенсибилизации ЗНЧ. Наибольший эффект (ФУД $5,84 \pm 0,84$) был достигнут при напряжении 200 кВ. Уменьшение напряжения до 150 и 100 кВ привело к снижению ФУД до $4,96 \pm 0,90$ и $3,98 \pm 0,76$ соответственно. Отметим, что полученная зависимость ФУД от напряжения может отличаться для трубок с другими конструктивными особенностями.

Заключение. Таким образом, ЗНЧ — эффективный инструмент для повышения эффективности лучевой терапии, однако они требуют тщательного подбора оптимальных условий облучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы развития ядерной медицины АО «Наука и инновации» ГК «Росатом».

Перспективные полимерные системы доставки противоопухолевых препаратов

Е.Д. Никольская, Н.Г. Яббаров, О.А. Жунина, М.Б. Сокол,
М.Р. Фаустова, М.В. Фомичева, А.И. Заболотский,
М.Д. Моллаев, О.Г. Терешенко, Е.С. Северин

ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», Москва

В последние годы доставка лекарств в опухолевые клетки с использованием нанотехнологий стала эффективной стратегией в лечении различных онкологических заболеваний. Наиболее широко используемыми системами доставки являются частицы на основе PLGA. Главное их преимущество — возможность контроля размеров частиц, поверхностных свойств и скорости высвобождения действующего вещества. В качестве опухолевоспецифичных антигенов в качестве мишеней для создания направленных систем доставки лекарственных средств может выступать альфа-фетопротеин (AFP), а также его С-концевой (3-й) домен (AFP3D), способные связываться с рецепторами AFPR на поверхности многих линий опухолевых клеток.

Были получены частицы PLGA, содержащие темозоломид, доцетаксел, карбоплатин, даунорубин или дактиномицин, обладающие средним диаметром менее 300 нм. Общее содержание препаратов определяли методами обращенно-фазовой ВЭЖХ, атомно-эмиссионной спектроскопии и спектрофотометрии. Размер частиц и морфология поверхности были изучены методами атомно-силовой микроскопии, просвечивающей электронной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии

было доказано наличие межмолекулярных взаимодействий между полимером и субстанцией. Методом инфракрасной спектроскопии были определены фазовые состояния полимера и субстанций после получения частиц. Высвобождение препаратов из частиц имело двухфазный характер и для всех частиц описывалось математической моделью Korsemeyer–Peppas и механизмом диффузии Фика.

Было показано увеличение уровня цитотоксической активности *in vitro* и частичное преодоление множественной лекарственной устойчивости препаратами после включения их в состав частиц. В экспериментах *in vivo* доказано снижение острой токсичности препаратов в составе частиц. Полученные системы доставки эффективно тормозили рост опухолей и увеличивали среднюю продолжительность жизни животных до 145 % по сравнению с контролем, в некоторых группах наблюдалась ремиссия.

Было показано избирательное действие адресных систем доставки на основе частиц PLGA и белковых векторных молекул (AFP и AFP3D), содержащих противоопухолевые препараты, на опухолевые клетки в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, а также увеличение цитотоксической активности конъюгатов более чем в 1,5 раза. Обнаружено снижение острой токсичности таких систем более чем в 2 раза, при этом наблюдалось увеличение противоопухолевой активности: эффективное торможение роста опухоли и увеличение средней продолжительности жизни до 154 %.

Таким образом, пролонгированная, контролируемая и направленная доставка ХТ-препаратов позволяет увеличивать их терапевтическую эффективность, снижая при этом риск возникновения побочных эффектов, связанных с токсичностью лекарственного препарата.

Возможность преодоления лекарственной устойчивости к доксорубину в клетках рака молочной железы

А.В. Онян¹, А.А. Лушникова¹, А.А. Рудакова¹,
А.В. Костарев², Н.И. Моисеева¹, К.В. Кожихова³,
С.М. Андреев³, М.А. Барышникова¹, А.В. Балбуцкий¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Введение. Преодоление приобретенной резистентности к различным лекарственным препаратам — актуальная проблема онкологии. Доксорубин (Dox) — один из препаратов 1-й линии, используемый для терапии различных злокачественных опухолей. Ключевой фактор возникновения резистентности к Dox — высокий уровень экспрессии генов лекарственной устойчивости, в частности кодирующих белок

pGP. Ранее мы обнаружили, что катионные пептиды (КП), обогащенные аргинином и лизином (Arg/Lys), индуцируют апоптоз опухолевых клеток *in vitro* путем инактивации многофункциональных шаперонных белков нуклеолина (NCL) и нуклеофозмина (NPM). Для опухолевых клеток характерен высокий уровень экспрессии этих белков на мембране (гликозилированный NCL) и в ядре (NCL, NPM).

Цель исследования — оценка эффективности ряда КП в отношении клеток РМЖ.

Материалы и методы. В работе использовали чувствительную к Dox (HBL100) и резистентную (HBL100/Dox) линии РМЖ, а также 4 КП: NC810, NC783, AM-2 и КК-13_Dox, конъюгированный с молекулой Dox ($m = 3027$ Да, $q = +16$). С помощью МТТ-теста и проточной цитометрии, а также конфокальной флуоресцентной микроскопии с меченым Cy5 NC 811 выявлена высокая цитотоксичность всех КП для клеток HBL100 при минимальных концентрациях КП (0,5–4,0 мкг/мл).

Результаты. Цитотоксичность всех КП, включая КК-13_Dox, для резистентной линии HBL100 Dox была снижена: выживаемость клеток HBL100/Dox достигала 17,5–26,7 % против 5,2–7,5 % у клеток HBL. Через 2–6 ч инкубации клеток с КП с помощью проточной цитометрии обнаружена активация каспаз cas3, -8, -9 (HBL100) или cas2, -9 (HBL100/Dox). Апоптоз резистентных клеток HBL100/Dox, по-видимому, связан с активацией cas9, -2 и NCL-RFWD-p53-сигнального каскада. Анализ путем молекулярного докинга между КП, NCL и NPM и КП — pGP выявил достоверно более высокие значения оценочной функции (scores по модулю) в 1-й группе ($8,06 \pm 1,90$ vs $2,75 \pm 0,92$). Это позволяет КП, включая и конъюгат КК-13_Dox, преодолеть выброс, обусловленный гиперактивацией pGP в резистентных клетках линии HBL100/Dox.

Заключение. Тестируемые КП, обогащенные Arg/Lys, индуцируют гибель как чувствительных, так и резистентных к Dox линий РМЖ *in vitro* и перспективны как альтернативные противоопухолевые агенты.

Изучение активности производных гидроксамовой кислоты на клетках линии A549

В.Н. Осипов¹, Д.С. Хачатрян², А.В. Колотаев², А.Н. Балаев³,
К.А. Охманович³, А.А. Вартамян¹, Ю.А. Хоченкова¹,
Ю.С. Мачкова¹, Д.А. Хоченков¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²НИЦ «Курчатовский институт», Москва;

³АО «Фарм-Синтез», Москва

Введение. Модифицируя гистоны и изменяя конформацию хроматина, гистондеацетилазы (HDAC) играют важную роль в регуляции экспрессии некоторых

генов, а также активном деметилировании ДНК. Гиперэкспрессия HDAC в ряде опухолей представляет перспективную биологическую мишень для создания ингибиторов HDAC (HDACi).

Материалы и методы. Мы синтезировали библиотеку из 52 соединений, включающих хиназолиновый цикл и гидроксаматную группу, и провели определение цитотоксической активности всех соединений на линии клеток аденокарциномы легкого A549, характеризующейся высокой экспрессией HDAC, с помощью МТТ-теста. Исследование индукции клеточной гибели и «ареста» клеточного цикла выполнено методом проточной цитометрии на ACEA Novocyt 2000R (ACEA) с наборами Annexin-V-FITC/PI и FxCyclePI (Invitrogen). Иммуноцитохимическое окрашивание проведено с антителами к Вах, Bcl-2 (Thermo), экспрессию белков определяли на клеточном анализаторе IN Cell Analyzer 6000 (GE).

Результаты. Все соединения показали IC_{50} в диапазоне 1,2–57,6 мкМ на клетках A549, в котором соединение OVFFV-010 обладало максимальной цитотоксической активностью. При анализе гибели клеток A549 в присутствии 2,3 мкМ (IC_{50}) соединения OVFFV-010 установили снижение числа живых клеток (81,5 % против 98,7 % в контроле). При анализе изменений клеточного цикла A549 установлено, что культивирование с 2,3 мкМ OVFFV-010 в течение 24 ч приводило к накоплению клеток в фазе G_0/G_1 (75,98 %, в контроле — 49,6 %) с параллельным истощением количества клеток в фазах G_2/M и S. Анализ клеток A549 после 24-часовой инкубации с соединением OVFFV-010 выявил уменьшение экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 и увеличение экспрессии проапоптотического белка Вах.

Закключение. Таким образом, синтезированы и изучены бифункциональные соединения на основе хиназолинового цикла и гидроксаматной группы, проявляющие высокую цитотоксическую активность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-11-2018-172 от 03.12.2018).

Пептиды, взаимодействующие с молекулой CTLA-4 (чекпоинт) для иммунотерапии рака

С.В. Подлесных¹, Д.Е. Мурашкин¹, Е.А. Колосова¹,
Д.Н. Щербаков¹, В.В. Лампатов², А.И. Хлебников²,
С.А. Джонстон³, А.И. Шаповал^{1,3}

¹Российско-американский противораковый центр
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет»,
Барнаул;

²НИИ биомедицины ФГБОУ ВО «Алтайский государственный
университет», Барнаул;

³Центр инноваций в медицине, Институт Биодизайна,
Университет штата Аризона, Темпи, Аризона, США

Молекулы контроля иммунитета, которые также называют иммунологическими точками контроля (immune checkpoints), регулируют полярность, силу и завершение иммунного ответа. Пары лиганд-рецепторов B7-1/B7-2/CTLA-4 и PD-L1/PD-L2/PD-1 играют важную роль в завершении или ослаблении иммунитета. Некоторые опухолевые клетки используют эти молекулы, чтобы уйти от иммунного ответа. Сейчас широко известно, что введение МА против CTLA-4, PD-1 и PD-L1 восстанавливает иммунный ответ у онкологических пациентов и приводит к увеличению их выживаемости. Однако использование МА в клинической практике имеет ряд недостатков и может вызывать побочные аутоиммунные реакции.

Используя пептидные микрочипы, мы выявили 19 пептидов, которые специфически взаимодействуют с молекулой CTLA-4. С помощью 3D-моделирования выявлено, что эти пептиды взаимодействуют с последовательностью MYPPPY-петли молекулы CTLA-4. Для дальнейшей работы были выбраны и синтезированы 6 пептидов с максимальной расчетной аффинностью взаимодействия с CTLA-4. Используя метод ИФА, мы подтвердили специфичность взаимодействия синтетических пептидов с CTLA-4. На основании полученных данных мы предполагаем, что выявленные пептиды могут регулировать взаимодействие CTLA-4-рецептора с его лигандами B7-1/B7-2 и таким образом стимулировать активацию Т-лимфоцитов. В настоящее время проходит тестирование функциональной активности пептидов *in vitro*. Данные пептиды могут обеспечить альтернативный подход к манипуляции иммунным ответом для терапии онкологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 17-04-00321 и 17-54-33003), государственное задание Минобрнауки России № 6.3892.2017/4.6., «УМНИК» № 11931ГУ/2017.

Белки NCL и NPM как мишени для катионных пептидов, индуцирующих гибель опухолевых клеток

Д.А. Понкратова¹, А.А. Лушникова¹, А.А. Рудакова¹,
А.В. Костарев², Г.Б. Смирнова¹, К.В. Кожихова³,
С.М. Андреев³, Н.Ю. Анисимова¹, И.Ф. Кустова¹,
М.А. Барышникова¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Введение. Многофункциональные шаперонные белки нуклеолин (NCL) и нуклеофозмин (NPM) высокоэкспрессированы в опухолевых клетках и на их поверхности (гликозилированный NCL), они рассматриваются в качестве мишеней для катионных пептидов (КП), обогащенных аргинином и лизином (Arg/Lys). Ранее мы обнаружили, что КП с определенной структурой и молекулярной массой ~2 кДа устойчивы к биодеградации, цитотоксичны для опухолевых и нетоксичны для нормальных клеток.

Цель исследования — характеристика NCL и NPM как специфичных мишеней КП и анализ механизмов клеточной гибели, индуцированной пептидами.

Материалы и методы. В работе использовано 15 различных линий опухолевых клеток, а также подкожные ксенографты (ПК) рака поджелудочной железы (AsPC1), гепатокарциномы (Huh-7) и меланомы кожи (melCher), перевитые мышам *nude*. С помощью МТТ-тестов, проточной цитометрии, ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинга, конфокальной флуоресцентной микроскопии (Cy5-КП), ИГХ охарактеризовано 7 КП и проанализировано их взаимодействие с молекулами NCL/NPM.

Результаты. Выявлена высокая селективная цитотоксичность этих КП в отношении как опухолевых клеток *in vitro* (IC₅₀ = 0,5–1 мкг/мл), так и ПК *in vivo*. Обнаружено, что апоптоз опухолевых клеток связан с активацией каспаз cas3, -8, -9 и сопровождается увеличением частоты двунитевых разрывов ДНК, деградацией хроматина и митотического веретена, миграцией NPM из ядра. Анализ межмолекулярных взаимодействий между тестированными КП, NCL и NPM с помощью попарного докинга (Maestro 11) выявил высокие оценочные функции (glide scores) и высокую частоту связывания пептидных лигандов с определенными аминокислотными остатками рецепторного NCL и NPM.

Закключение. Полученные данные показывают, что Arg/Lys-обогащенные КП с молекулярной массой около 2 кДа и $q = +4...+16$ могут связываться с клеточными мишенями — многофункциональными белками NCL и NPM, ингибируя их функции с последующей индукцией апоптоза опухолевых клеток как *in vitro*, так

и в ПК *in vivo*. Молекулярный анализ и 3D-моделирование выявили ряд закономерностей, позволяющих конструировать оптимальные по структуре и эффективности КП с избирательной противоопухолевой активностью. Изученные КП перспективны для создания на их основе противоопухолевых препаратов широкого спектра действия.

Антимикробные пептиды из семейства тионинов, выделенные из семян черного тмина (*Nigella sativa* L.), обладают цитотоксичностью по отношению к линиям опухолевых клеток *in vitro*

Е.А. Рогожин^{1,2,3}, А.С. Барашкова¹, Л.Г. Деженкова²,
В.С. Садыкова²

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;

²ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков

им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

³ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет», Тюмень

Известно, что растения представляют собой богатый источник разнообразных биологически активных соединений, обладающих многочисленными функциями. В подавляющем большинстве случаев речь идет о низкомолекулярных соединениях — вторичных метаболитах, которые, как правило, определяют так называемую функциональность того или иного растения, в том числе применительно к лекарственным видам. Однако в последнее время все больший интерес вызывает исследование разнообразия белков и пептидов с антимикробными свойствами, некоторые из которых являются мембранно-активными по отношению к клеткам эукариот.

Так, в серии наших исследований, посвященных пептидомному анализу эндемичного центральноазиатского растения чернушка посевная, или черный тмин (*Nigella sativa*), из семян данного растения был выделен и структурно идентифицирован пул гомологичных полипептидов, относящихся к семейству тионинов — компонентов как конститутивного, так и индуцированного иммунитета растений к комплексу стрессовых факторов окружающей среды. Для данных пептидов было показано наличие выраженных бактерицидных, а также фунгицидных свойств по отношению к спектру оппортунистических штаммов и клинических изолятов в микромольном диапазоне действующих концентраций. В целях выяснения особенностей действия данных молекул на дрожжеподобные и мицелиальные грибы была проведена их оценка на наличие цитотоксической активности по отношению к ряду линий опухолевых и нормальных клеток человека в МТТ-тесте.

Установлено, что эти соединения проявили эффективность по отношению к 2 тестируемым линиям — аденокарциномы толстой кишки (HCT-116) и меланомы (B16) при действующих концентрациях на уровне $IC_{50} < 200–300$ нМ, при этом данное значение для линии нормальных клеток — постнатальных фибробластов человека — составило около 600 нМ.

Полученный результат, с одной стороны, открывает новые возможности для изучения противоопухолевых свойств биологически активных полипептидов растительного происхождения, с другой — впервые демонстрирует наличие относительной селективности ингибирующего действия по отношению к линиям опухолевых клеток, полученных из новообразований кожи и внутренних органов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-74-10073).

Антипролиферативный эффект метформина на клетки меланомы с различным профилем мутации B-Raf

И.И. Сабиров, Ю.Ю. Щеголев, О.О. Рябая,
И.Н. Михайлова, И.А. Утяшев, М.А. Красильников

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Метформин — антидиабетический препарат из группы бигуанидов, который проявляет выраженную противоопухолевую активность в отношении злокачественных новообразований различного происхождения. В основе цитостатического действия метформина лежит его способность активировать АМФ-зависимую киназу (АМРК) и инициировать последующие события, приводящие к подавлению mTOR-сигналинга — ключевого сигнального пути, контролирующего трансляционный аппарат клетки.

Цель исследования — изучение влияния метформина на культивируемые *in vitro* клетки меланомы, различающиеся по присутствию мутации B-Raf V600K.

Эксперименты проводили на линиях меланом с мутацией B-Raf (линии A375 и Mel IL) и с диким типом B-Raf (линия MeWo). Мы показали, что культивирование клеток меланомы с метформином приводит к выраженному торможению скорости роста во всех клеточных линиях вне зависимости от наличия мутаций B-Raf. Для дальнейшего исследования роли мутантного B-Raf в реализации действия метформина в качестве экспериментальной модели использовалась сублиния Mel IL/R, полученная в результате длительной селекции в присутствии ингибитора B-Raf V600K вемурафениба и отличающаяся в итоге повышенным уровнем резистентности к этому препарату. Оказалось, что чувствительность таких клеток к метформину

практически не изменилась по сравнению с родительскими клетками Mel IL, что подтверждает эффективность действия метформина вне зависимости от уровня активации B-Raf-сигнального пути.

Ранее мы показали, что метформин подавляет экспрессию Snail1 — одного из основных внутриклеточных белков, определяющих эпителиально-мезенхимальный переход и способность к инвазии и метастазированию опухолевых клеток (Sherbakov и соавт., IUBMB Life 2015). При исследовании влияния метформина на клетки меланом обнаружено выраженное снижение экспрессии Snail1 под действием метформина, свидетельствующее о возможной негативной регуляции последним эпителиально-мезенхимального перехода и метастазирования клеток меланом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-015-00058).

Бортезомиб и дитиотреитол оказывают селективное и обратимое цитотоксическое воздействие на нормальные и опухолевые клетки эпидермального происхождения

М.А. Савицкая, И.И. Захаров, Д.М. Поташникова,
А.А. Саидова, Г.Е. Онищенко

ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Ингибитор протеасом бортезомиб (БЗ) и восстанавливающий агент дитиотреитол (ДТТ) являются индукторами стресса эндоплазматического ретикула (ЭПР), при котором происходят накопление дефектных белков, остановка трансляции, увеличение продукции шаперонов и деградация неправильно уложенных белков. Продолжительный стресс способен приводить к гибели клетки. Стресс ЭПР — одна из мишеней современной терапии опухолей. Однако лечение злокачественных новообразований может сопровождаться побочными эффектами и приводить к рецидивам заболевания, что, в свою очередь, может быть связано с обратимым воздействием препарата на клетки. Обратимость бывает обусловлена как восстановлением жизнедеятельности клетки после индукции апоптоза (анастаз), так и выживанием и последующей пролиферацией отдельных клеток опухоли.

В данной работе проанализирована возможность обратимости воздействия, индуцирующего стресс ЭПР, на уровне отдельных клеток и на уровне популяции в культурах иммортализованных кератиноцитов человека HaCaT и клеток эпидермоидной карциномы человека A431 при использовании индукторов стресса ЭПР БЗ и ДТТ.

Методом ПЦР в реальном времени обнаружено, что в обеих линиях клеток ДТТ или БЗ индуцируют

стресс ЭПР с активацией экспрессии генов-маркеров *GRP78*, *ATF4* и *CHOP*. Методом проточной цитометрии выявлено, что ДТТ или БЗ селективно и дозозависимо индуцируют апоптоз в обеих культурах. Методом МТТ-теста показано, что клетки A431 более устойчивы к воздействию ДТТ, чем клетки HaCaT. Клетки A431 менее устойчивы к воздействию БЗ, чем клетки HaCaT. В обеих культурах стресс ЭПР индуцирует апоптоз без участия митохондриального механизма. Жизнеспособность клеток HaCaT и A431 восстанавливается после снятия воздействия 2 мМ ДТТ и 25 нМ БЗ. Методом прижизненной видеомикроскопии в обеих культурах не выявлено явление анастаза после устранения 2 мМ ДТТ или 75 нМ БЗ. Методами трансмиссионной электронной микроскопии и иммуноцитохимии показано, что в обеих культурах 2 мМ ДТТ не вызывает изменений структуры ЭПР и аппарата Гольджи, 75 нМ БЗ индуцирует необратимое расширение каналов ЭПР. Таким образом, нормальные и опухолевые клетки эпидермального происхождения различно реагируют на индукцию стресса ЭПР: клетки HaCaT более чувствительны к ДТТ, который нарушает сворачивание белков; клетки A431 более чувствительны к БЗ — ингибитору протеасомной деградации. Сравнение воздействия индукторов стресса ЭПР на нормальные и опухолевые клетки эпидермального происхождения помогает оценить селективность и перспективы использования БЗ и ДТТ в качестве ХТ-агентов: в то время как ДТТ является неподходящим для данных целей, БЗ демонстрирует селективное цитотоксическое воздействие, которое может играть важную роль в терапии злокачественных новообразований кожи человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-015-0023).

Антипролиферативные эффекты лигнана из *Linum usitatissimum* и его производных в отношении клеток рака молочной железы

Д.И. Сальникова¹, А.М. Щербаков², О.Е. Андреева²,
Е.И. Михаевич², О.В. Стасевич³

¹Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО
«МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

³УО «Белорусский государственный технологический
университет», Минск, Республика Беларусь

Введение. Лигнаны — группа полифенольных соединений растительного происхождения. В семенах *Linum usitatissimum* содержание лигнанов достигает 2 %. Лигнаны и их метаболиты оказывают как «прямой» противоопухолевый эффект, так и влияют на процессы воспаления в окружающих опухоль тканях. Однако

точный молекулярный механизм действия этого класса веществ на прогрессию опухолей остается неясным.

Материалы и методы. Лигнан секоизоларицирезинола диглюкозид (L1) выделен из семян *Linum usitatissimum* экстракцией 50 % водным этанолом с последующей хроматографической очисткой на ионообменном сорбенте Diaion HP-20 и обращенно-фазовом силикагеле C18. Синтез секоизоларицирезинола (L2) осуществляли путем кислотного гидролиза L1. Секоизоларицирезинол-4', 4"-диацетат (L3) получали реакцией L2 с ацетилхлоридом. Биологические методы: МТТ, иммуноблоттинг, ген-репортерный анализ.

Результаты. Антипролиферативные эффекты L1 и его производных L2 и L3 оценены на клетках РМЖ MCF7, тамоксифенрезистентной сублинии MCF7/T и линии нормального эпителия молочной железы MCF10A. В отношении клеток MCF10A не отмечено никакой цитотоксической активности L1, L2 или L3. Лигнан L1 не демонстрировал цитотоксических эффектов на клетках MCF7 и тамоксифенрезистентной сублинии. Агликон (L2) подавлял рост только тамоксифенчувствительных клеток, а соединение L3 проявляло цитотоксическую активность в отношении как чувствительных, так и резистентных к тамоксифену клеток. Соединения L2 и L3 вызывали в клетках значительную деградацию PARP (маркера апоптоза). Обнаружено, что гибель клеток при воздействии соединения L3 происходит с участием сигналинга ERK по p53-независимому механизму. Выявлено комплексное действие L2 и L3 на сигнальный путь ERα/AP1. Оба соединения ингибировали транскрипционную активность ERα/AP1, а также вызывали выраженную деградацию белка ERα. Соединение L3 выбрано в качестве лидерного для дальнейших экспериментов.

Закключение. Продemonстрировано ингибирующее действие производных секоизоларицирезинола диглюкозида, L2 и L3 на рост опухолевых клеток MCF7 и MCF7/T и отсутствие такового на рост клеток нормального эпителия молочной железы MCF10A. Сигнальный путь ERα/AP1 рассматривается в качестве основной мишени этих соединений. Гибель клеток, индуцированная L3, не зависит от p53.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09017 (биологические исследования)).

Синтез конъюгатов сесквитерпеновых лактонов с тиюфенолом и селенофенолом как способ создания на их основе активируемых АФК-пролекарств

А.В. Семаков, Л.В. Аникина, С.Г. Ключков

ФГБУН «Институт физиологически активных веществ РАН»,
Черноголовка, Московская обл.

Сесквитерпеновые лактоны — класс веществ преимущественно растительного происхождения, для представителей которого характерна выраженная цитотоксическая активность по отношению к опухолевым клеткам. Цитотоксической активностью обладают только те лактоны, которые несут двойную связь при лактонном цикле и способны вступать в реакцию присоединения по Михаэлю. В то же время им свойственна и некоторая токсичность по отношению к нормальным клеткам в терапевтических дозах, что ограничивает их применение.

Сесквитерпеновые лактоны охотно реагируют с тиюфенолом по реакции Михаэля. Продукт присоединения способен легко окисляться по атому серы, а затем постепенно самопроизвольно элиминировать тиюфенольную часть с образованием сопряженной двойной связи в лактонном цикле, где она была изначально. Окисление-элиминирование может происходить под действием АФК клетки, в том числе и при действии перекиси водорода. Опухолевые клетки характеризуются повышенным уровнем АФК по сравнению с исходной тканью. Сопоставив эти 2 факта, можно предположить, что такие серосодержащие пролекарства будут с большей скоростью высвобождать активный сесквитерпеновый лактон в опухолевых клетках по сравнению с нормальными. Следовательно, это приведет и к большей избирательности действия сесквитерпеновых лактонов на опухолевые клетки.

Был синтезирован ряд конъюгатов сесквитерпеновых лактонов природного и полусинтетического происхождения с тиюфенолом. Среди использованных лактонов были такие, как алантолактон, гроссгемин, партенолид, дегидрокостус лактон, телекин и др. Соединения проверялись на предмет цитотоксической активности на 4 опухолевых и 1 псевдонормальной линиях с использованием МТТ-теста. Во всех случаях такие серосодержащие пролекарства показывали сниженную цитотоксичность по сравнению с исходными лактонами, однако в ряде случаев она оказывалась умеренной, и такие соединения подходят для дальнейшей оптимизации.

Селенофенол аналогично тиюфенолу вступает в реакцию присоединения по Михаэлю с сесквитерпеновыми лактонами. Однако продукты его присоединения с большей степенью подвергаются реакции

окисления-элиминирования по сравнению с тиюфенолом под действием АФК. Аналогично конъюгатам лактонов с тиюфенолом был получен ряд продуктов присоединения с селенофенолом. Такие селенсодержащие конъюгаты также показывают сниженную, но приемлемую цитотоксичность по сравнению с исходными лактонами. Последние от конъюгатов с тиюфенолом отличаются быстрым высвобождением активного лактона при действии перекиси водорода.

Компьютерный скрининг ингибиторов лактатдегидрогеназы А с применением структурной фильтрации

Э.В. Смолкина¹, А.М. Поленова¹, Д.К. Нилов²

¹Факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО
«МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Лактатдегидрогеназа А (ЛДГ-А) играет существенную роль в энергетическом обмене раковых клеток и является перспективной мишенью для разработки противоопухолевых химиопрепаратов. В активном центре ЛДГ-А можно выделить участки связывания субстрата и кофермента никотинамидадениндинуклеотида (НАДН). Также при переходе ЛДГ-А в открытую форму за счет движения петли 96–111 образуется дополнительный участок связывания, что позволяет расширить спектр возможных ингибиторов.

В данном исследовании определены структурные критерии отбора наиболее перспективных ингибиторов ЛДГ-А и осуществлен компьютерный скрининг обширной библиотеки соединений. В результате анализа связывания субстратов и известных ингибиторов установлены остатки, образующие наиболее важные взаимодействия: Arg168, Arg105 и Thr247. На основе кристаллических структур 1i10 и 4l4s в программе Amber сконструированы модели закрытой и открытой формы ЛДГ-А. В программе Lead Finder проведен докинг 2379 соединений библиотеки ZINC, содержащих сульфогруппу в качестве аналога карбоксильной группы субстрата. Последующее применение выбранных структурных критериев (водородные связи с Arg168, Arg105 и Thr247, а также дополнительные взаимодействия с His192, Asn137, Gln99 и Ile241) позволило отобрать 4 % соединений в качестве потенциальных ингибиторов закрытой формы и 5 % соединений в качестве ингибиторов открытой формы ЛДГ-А.

Работа поддержана Фондом содействия инновациям по программе «УМНИК-Сириус»
(договор № 12449ГУ/2017) и РФФИ (проект № 17-08-01614 А).

Конъюгат рекомбинантного третьего домена альфа-фетопротеина с полимерными наночастицами и паклитакселом: исследование фармакокинетики и биораспределения

М.Б. Сокол¹, Ю.В. Сычева¹, Н.Г. Яббаров¹, М.Д. Моллаев^{1,2},
А.И. Заболотский^{1,3}, М.Р. Фаустова^{1,2}, М.В. Фомичева¹,
О.А. Жунина¹, Е.Д. Никольская¹

¹ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», Москва;

²ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет» (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва;

³ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Введение. Паклитаксел (Ptx) — митотический ингибитор растительного происхождения, обладающий значительной противоопухолевой активностью в отношении ряда злокачественных новообразований. Из-за низкой растворимости Ptx в воде (0,7 мг/мл) коммерческий препарат Ptx представлен в растворе, в состав которого входит Cremophor EL, использование которого ограничено из-за аллергических реакций, нефро- и нейротоксичности. Инкапсулирование гидрофобных препаратов в наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) позволяет увеличить биодоступность препарата, а получение конъюгатов полимерных частиц с векторной молекулой способствует селективному накоплению в тканях-мишенях. Нами был разработан метод получения конъюгата PLGA, содержащего Ptx, с рекомбинантным третьим доменом альфа-фетопротеина (gAFP3d-NP), который известен как специфичный онкомаркер, что обуславливает выбор данного белка в качестве векторной молекулы.

Цель исследования — изучение фармакокинетики и биораспределения gAFP3d-NP.

Материалы и методы. Исследование проводили на 120 самках крыс породы Wistar. Животные были разделены на 2 группы: экспериментальную и контрольную. Экспериментальной группе вводили дозу gAFP3d-NP, эквивалентную дозе Ptx 6 мг/кг. Животные контрольной группы получали 6 мг/кг Ptx. Все растворы вводили внутривенно через хвостовую вену. Через определенные промежутки времени отбирали образцы плазмы крови и извлекали органы с последующей гомогенизацией и экстракцией. Количественный анализ проводили с помощью ультрафиолетовой ВЭЖХ.

Результаты. Снижение уровней концентрации Ptx в плазме крови во всех случаях носило двухфазный характер. Необходимо отметить уменьшение клиренса Ptx в составе gAFP3d-NP ($1,13 \pm 0,07$ (мг/кг)/(мг/мл)/ч) примерно в 5,5 раза по сравнению с субстанцией Ptx.

При этом в случае полимерной формы Ptx значение AUC ($0 - \infty$) составило $5,29 \pm 0,36$ (мг/мл) $\times$ ч, что примерно в 5 раз больше по сравнению с субстанцией. Величина объема распределения уменьшилась с $67,47 \pm 4,53$ л/кг (Ptx) до $12,38 \pm 0,79$ л/кг (gAFP3d-NP). Ptx в форме gAFP3d-NP распределялся во все исследуемые ткани (селезенка, печень, почки, сердце и легкие), однако в наибольшей степени накопление наблюдалось в печени и селезенке.

Заключение. Показано, что Ptx в составе gAFP3d-NP способен проявлять пролонгированное высвобождение, поддерживая более высокую концентрацию препарата в крови в течение более длительного времени, что может улучшить режим дозирования и снизить частоту введения лекарственного средства. Таким образом, полученный конъюгат будет способствовать снижению неспецифической токсичности и увеличению противоопухолевой эффективности по сравнению с субстанцией.

Регуляция Akt-сигналинга в клетках рака молочной железы MCF7 в условиях энергетического дефицита

Д.В. Сорокин, Ю.Ю. Щеголев, А.М. Щербаков,
М.А. Красильников

НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Akt, или протеинкиназа B, относится к числу ключевых эффекторов внутриклеточных сигнальных путей, контролирующих рост и выживаемость опухолевых клеток.

Цель исследования — изучение особенностей регуляции Akt в условиях энергетического дефицита. Мы показали, что перевод клеток РМЖ MCF7 в среду с низким содержанием глюкозы приводит к частичному, на 20–25 %, снижению скорости роста клеток, развивающемуся на фоне незначительной активации АМФ-зависимой киназы (АМРК), снижения активности mTOR, и при этом существенном повышении уровня активированной (фосфорилированной) формы Akt.

Для дальнейшего изучения изменений Akt в условиях энергетического голодания клетки MCF7 культивировали в присутствии метформина — соединения из семейства бигуанидов, антипролиферативный эффект которого опосредован активацией АМРК и подавлением mTOR-сигналинга. Мы обнаружили, что в среде с низким содержанием глюкозы резко усиливается антипролиферативный эффект метформина, возрастает степень подавления mTOR-сигналинга, полностью прекращается фосфорилирование S6-киназы — основного эффектора mTOR, и на этом фоне значительно возрастает уровень фосфорилирования

Akt. Скорее всего, столь выраженная активация Akt при подавлении mTOR обусловлена хорошо описанной в литературе системой обратной регуляторной связи между mTOR и Akt. Однако с учетом того факта, что уровень Akt в нашем случае не просто поддерживается на исходном уровне, а существенно возрастает, можно предположить, что в условиях энергетического голодания включаются и дополнительные механизмы, обеспечивающие компенсаторную активацию Akt-сигналинга в ответ на ростиингибирующие сигналы. Косвенным свидетельством в пользу такого предположения могут служить результаты определения Akt в клетках MCF7/M — устойчивой к метформину сублинии, полученной в результате длительного культивирования клеток MCF7 с метформином. Мы показали, что резистентные клетки отличаются конститутивной активацией Akt, при этом подавление Akt приводит к частичному восстановлению чувствительности клеток к метформину.

Вместе взятые полученные результаты свидетельствуют о непосредственном участии Akt-сигналинга в поддержании опухолевого роста в условиях энергетического голодания, что позволяет рассматривать Akt в качестве перспективной мишени для таргетной терапии таких опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-015-00058).

Терапевтический потенциал нового производного эндостатина в отношении плоскоклеточного рака полости

Г.М. Тугузбаева^{1,2}, В.Н. Павлов¹, Б. Ян²

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

²Харбинский медицинский университет, Харбин, Китай

Известен природный ингибитор ангиогенеза эндостатин, обладающий способностью снижать прогрессию злокачественных новообразований различного происхождения. В основе антиканцерогенного механизма эндостатина лежит преимущественно его способность ингибировать ангиогенез опухоли путем связывания с интегринами RGD-независимым образом и подавления пролиферации и миграции эндотелиальных клеток кровеносных сосудов. Вместе с тем монотерапия с использованием ингибиторов ангиогенеза не способна оказывать должное противоопухолевое воздействие непосредственно на раковые клетки. Нами предложено использование нового полипептида, полученного в результате слияния последовательности RGDRGD с активным фрагментом NH₂-конца эндостатина в качестве средства патогенетической терапии плоскоклеточного рака полости рта.

В работе представлены основные результаты исследования потенциальной противоопухолевой активности нового производного эндостатина на моделях плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости рта *in vitro*. Метод «заживления экспериментальной раны» позволил установить дозозависимое снижение миграции клеточных линий CAL 27 и SCC-15 при воздействии нового производного эндостатина в течение 48 ч. Кроме этого, отмечена эффективность нового полипептида в ингибировании колониеобразующей способности плоскоклеточного рака полости рта *in vitro*. С помощью метода ПЦР в реальном времени выявлено подавление экспрессии гена *ITGA1* в исследуемых клеточных культурах при инкубации с новым производным эндостатина. Таким образом, свидетельства ингибирующего потенциала нового полипептида в отношении плоскоклеточного рака полости рта указывают на целесообразность проведения дальнейших доклинических исследований в данной области.

Работа выполнена при поддержке гранта № 26 ГР Республики Башкортостан молодым ученым.

Повышение эффективности каталитической терапии в условиях ингибирования антиоксидантной системы защиты клеток

М.Р. Фаустова¹, Е.Д. Никольская², М.Б. Сокол²,
А.И. Заболотский², М.В. Фомичева², О.А. Жунина²,
А.В. Лобанов³, А.П. Каплун¹, Н.Г. Яббаров³

¹ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва;

²ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», Москва;

³ФГБУН «Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН», Москва

На сегодняшний день подход, основанный на повышении уровня АФК в клетках-мишенях, все чаще применяется для лечения опухолевых заболеваний. В настоящей работе исследовалось влияние каталитической системы на основе FeCl-тетрафенилпорфирина (FeClТФП) и аскорбиновой кислоты (АК). Предполагается, что в результате взаимодействия FeClТФП и АК образуются АФК, приводящие к разрывам цепей ДНК и последующей гибели опухолевых клеток. В целях повышения эффективности данной каталитической пары было решено исследовать ее противоопухолевую активность в комбинации с ингибиторами антиоксидантной системы на линии клеток MCF7 (аденокарцинома молочной железы человека). В качестве ингибиторов были выбраны 3-амино-1,2,4-триазол (3-АТ, ингибитор каталазы), диэтилдитиокарбамат (ДДК, ингибитор супероксид дисмутаза 1), мизонидазол (МИЗ, ингибитор глутатион пероксидазы 1).

Результаты эксперимента показали, что использование 3-АТ совместно с комбинацией FeCITФП/АК увеличивает противоопухолевую активность системы в 5 раз по сравнению с парой FeCITФП/АК. При этом добавление ДДК и МИЗ увеличивает цитотоксическую эффективность комбинации FeCITФП/АК только в 2 раза. На основе полученных результатов можно предположить, что в результате каталитической реакции между FeCITФП и АК образуется пероксид водорода, поскольку фермент каталаза отвечает за конверсию пероксида водорода в воду и кислород.

Таким образом, в результате определения цитотоксической активности FeCITФП/АК в экспериментах *in vitro* было установлено, что добавление ингибитора каталазы 3-АТ позволяет увеличить эффективность каталитической пары FeCITФП/АК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-04-01009).

Ингибиторы CDK8/19-киназ для лечения трижды негативного рака молочной железы

А.Ф. Фахардо¹, Лим Ченг², О.А. Краснова¹, И.Б. Ронинсон²,
Е.В. Броуде²

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург;

²Университет штата Южная Каролина, Коламбия, США

Введение. Трижды негативный РМЖ характеризуется отсутствием экспрессии генов эстрогенового, прогестеронового и HER2/неу-рецепторов, ввиду чего крайне тяжело поддается терапии. В качестве модельной системы для исследований нами была выбрана клеточная линия 4Т1 — спонтанно возникший в результате мутации РМЖ мыши.

Материалы и методы. Для изучения влияния ингибиторов CDK8/19 киназ на клетки 4Т1 использовали 3 различных ингибитора: сенексин В, сенексин 631 и 15W¹. Клетки инкубировали с соединениями в течение 7 сут, затем окрашивали пропидия йодидом и с помощью проточной цитометрии подсчитывали общее количество клеток по сравнению с контролем, а также количество мертвых клеток, окрашенных пропидия йодидом. Для исследований *in vivo* $0,5 \times 10^6$ клеток линии 4Т1 вводили в матрикеле ортотопически мышам линии Balb/c. На 4-е сутки после инъекции мышей рандомизировали на контрольную и получающую терапию препаратом сенексин 631 группы. На 13–16-е сутки части мышей проводили хирургическое удаление опухоли, оставшихся мышей вскрывали, измеряли опухоли. У мышей после иссечения опухоли отслеживали динамику развития рецидивирующих опухолей. При достижении опухолями критического объема животных подвергали эвтаназии, опухоли измеряли, экспланты из тканей опухолей легких, головного мозга,

печени и селезенки высеивали на чашки Петри. Пробы, в которых был зафиксирован рост культуры клеток 4Т1, использовали для клоногенного анализа.

Результаты. Было показано, что после 7 сут инкубации 1 мкМ сенексина В, сенексина 631 и 15W¹ ингибируют 54,6–58,8 % клеток линии 4Т1.

В результате исследования динамики роста вторичных опухолей у мышей после хирургического удаления на фоне терапии сенексином 631 было показано, что опухоли развиваются медленнее по сравнению с контролем. Что касается влияния ингибиторов CDK8/19-киназ на метастазирование опухолей после операционного вмешательства, результаты исследования способности клеток 4Т1, полученных из эксплантов опухолей и легких экспериментальных животных, к колониеобразованию, можно заключить о том, что метастатические клетки экспериментальных животных, получавших лечение, образуют меньшее число колоний с меньшим относительным размером по сравнению с контролем.

Заключение. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ингибирование CDK8/19-киназ представляет собой интерес, как потенциальный подход к терапии трижды негативного РМЖ.

Потенциальные механизмы MDM2-опосредованной устойчивости клеток рака легкого к генотоксическим препаратам

О.А. Федорова, О.Ю. Шувалов, А.А. Дакс, А.И. Кизенко,
Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Убиквитинлигаза MDM2 — главный негативный регулятор основного онкосупрессора человека — белка p53. Однако помимо негативной регуляции p53, MDM2 присущи и другие, p53-независимые функции (Zhang и соавт. 2005). Показано, что субстратами MDM2 являются такие важные клеточные регуляторы, как pRb, p21, hTERT (теломераза), Е-кадгерин, транскрипционные факторы Snail и Slug (Fahreus и соавт., 2014) и т.д. При этом MDM2 обладает как онкогенными, так и онкосупрессорными свойствами, что, по видимому, зависит от клеточного контекста (Bohlman и Manfredi, 2014). По результатам ранее полученных нами данных масс-спектрометрической идентификации белков-интерактантов, с убиквитинлигазой MDM2 ассоциированы ферменты эксцизионной репарации оснований (BER), участвующие в репарации повреждений одной цепи — PARP1, APE1, FEN1, а также фактор NHEJ-репарации двуцепочечных ДНК разрывов — Ku70. Мы верифицировали данные масс-спектрометрии с использованием GST pull-down и последующим иммуноблоттингом. Оценили также влияние

MDM2 на стабильность исследуемых ферментов репарации. Наиболее известными и перспективными ингибиторами MDM2-p53 взаимодействия являются нутлины. Однако показано, что нутлин препятствует взаимодействию MDM2 с рядом других белков (Nicholson и соавт., 2012, Way и соавт., 2016). Мы также оценили влияние нутлина (так и в сочетании с ДНК-повреждающим агентами) на выживаемость клеток рака легкого с разным статусом экспрессии как p53, так и MDM2. Показали, что при сочетанном воздействии на клетки нутлина и цисплатина наблюдалось достоверное повышение выживаемости по сравнению с клетками, которые были обработаны только цисплатином. При этом данный эффект наблюдался во всех клетках рака легкого и не зависел от статуса экспрессии p53.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-315-20013 мол_а_вед).

Моноклональные антитела к белку PRAME замедляют развитие prame-экспрессирующей опухоли

Ю.П. Финашутина¹, Н.А. Лыжко¹, В.А. Мисюрин¹,
Н.Н. Касаткина¹, О.Н. Солопова¹, Т.К. Алиев²,
М.В. Ларина², А.А. Турба³, А.В. Мисюрин³

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³ООО «ГеноТехнология», Москва

Белок PRAME может быть мишенью для терапевтических МА, так как экспрессируется примерно у половины больных с солидными опухолями и онкогематологическими заболеваниями. Кроме этого, белок способен вызывать Т-клеточный иммунный ответ у пациентов. Следовательно, разработка иммунотерапевтических препаратов против этого антигена может быть весьма перспективной.

Цель исследования — изучить эффект введения 2 вариантов МА против PRAME на модели PRAME-экспрессирующей опухоли.

Мышам линии C57Bl/6 вводили клетки меланомы мыши, трансфицированные плазмидой с геном *PRAME* и экспрессирующие соответствующий белок, в дозе 5×10^4 на мыш. При этом за 3 дня до введения опухолевых клеток, а также на 4, 7, 14, 21-й день после введения клеток меланомы, животным внутрибрюшинно вводили 300 мкг мышинных МА против PRAME. В контрольной группе использовали мышинные МА против опухолевого антигена GAGE. Противоопухолевый эффект оценивали по измерениям размера опухоли во всех группах.

Экспрессия человеческого белка PRAME в трансфицированных клетках B16F10 перед прививанием мышам была подтверждена методами иммуноблоттинга и проточной цитометрии. В результате оказалось, что размер опухоли, экспрессирующей человеческий белок PRAME

у мышей, статистически значимо снижен при введении обоих вариантов мышинных антител к PRAME (5D3 и 6H8) ($p = 0,0199$) и незначимо снижен при введении контрольного антитела против опухолевого антигена GAGE ($p = 0,38$).

Таким образом, антитела против PRAME 5D3, 6H8 при внутрибрюшинном введении снижают скорость роста опухоли B16F10-PRAME, в то время как антитела GAGE напротив не оказывают влияния на скорость ее роста.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60418X0204).

Изучение иммунологических аспектов механизма противоопухолевого действия генной конструкции, включающей ген цитокина *GM-CSF*

В.А. Хохлова¹, Т.А. Кармакова¹, О.А. Безбородова¹,
Е.Р. Немцова¹, А.А. Панкратов¹, И.В. Алексеенко^{2,3},
В.В. Плешкан^{2,3}, М.В. Зиновьева², М.Б. Костина²,
А.В. Сасс², Е.Д. Свердлов^{2,3}, А.Д. Каприн¹

¹ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;

³ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН», Москва

Введение. Разработка новых подходов к лечению злокачественных опухолей с использованием генных технологий является перспективным направлением развития современной онкологии. Считается, что внедрение в соматические клетки генетического материала с лечебной целью может быть использовано для коррекции генетических нарушений в опухолевых клетках, прямого уничтожения опухолевых клеток, а также для управления реакциями противоопухолевого иммунитета.

Для усиления терапевтического эффекта в состав генных конструкций, помимо основного терапевтического, вводят гены цитокинов, продукты экспрессии которых осуществляют активацию реакций противоопухолевого иммунитета. По данным экспериментальных исследований включение гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (*GM-CSF*) в конструкции существенно улучшает результаты лечения. Существует ряд исследований, результаты которых продемонстрировали эффективность и потенциал аналогичных конструкций, однако их механизм действия *in vivo* остается недостаточно изученным.

Цель исследования — изучение *in vivo* клеточных иммунных эффектов, индуцированных внутриопухолевым введением генной конструкции с геном *GM-CSF* на модели мышинной саркомы.

Материалы и методы. Генная конструкция: *HSVik* — *GM-CSF* (Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН); животные: мыши (C57Bl/6j×CBA) F₁, самки; опухолевая модель: мышьяная саркома S37. Иммунопероксидазное окрашивание: первичные антитела анти-CD86 (зрелые дендритные клетки), анти-CD4 (Т-хелперы), анти-CD8 (цитотоксические Т-лимфоциты), система визуализации: анти-крысиные IgG-биотин + стрептавидин-HRP + DAB субстрат; контроль: неспецифические IgG крысы.

Результаты. Внутритропуховое введение мышам с подкожно привитой саркомой S37 генной конструкции, содержащей гены *HSVik* и *GM-CSF* (без пролекарства), приводит к объективно регистрируемым иммунологическим эффектам. В опухолевой ткани увеличивается плотность CD4⁺-лимфоцитов в перитуморальном инфильтрате, в ткани регионарных лимфатических узлов транзитивно возрастает содержание CD86⁺-клеток и CD4⁺-лимфоцитов в функциональных зонах, связанных с активацией и пролиферацией В-лимфоцитов, и увеличивается плотность CD8⁺-лимфоцитов в паракортикальной зоне, в которой происходит активация и пролиферация Т-клеток.

Внутритропуховое введение мышам генной конструкции в сочетании с пролекарством приводит к стойкому увеличению инфильтрации опухолевой ткани зрелыми дендритными клетками, однако не вызывает специфических изменений в содержании Т-клеток в ткани опухоли, а также не приводит к специфическим изменениям плотности и распределения CD86⁺-клеток и Т-лимфоцитов в ткани регионарных лимфатических узлов.

Заключение. Полученные результаты подтверждают целесообразность включения гена *GM-CSF* в геннотерапевтическую конструкцию для усиления иммунных реакций и повышения эффективности противоопухолевого лечения.

Перспективность комбинации наночастиц оксида меди и N-ацетилцистеина в терапии опухолей

С.А. Цымбал¹, В.В. Татарский², А.А. Штиль^{1,2},
В.В. Виноградов¹

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Лекарственная устойчивость — одна из серьезных проблем в терапии опухолей. Для элиминации опухолевых клеток, устойчивых к ряду воздействий, необходимо активировать механизмы гибели, сохраняющие функцию в резистентных клетках. Повреждение целостности плазматической мембраны и мембранных

органелл в результате воздействия АФК может являться альтернативой таргетным воздействиям, когда последние неэффективны. АФК генерируются наноструктурированными материалами — наночастицами металлов или сополимерными композитами. В работе исследованы свойства комбинации наночастиц оксида меди и N-ацетилцистеина (НАС). Вопреки ожидаемому защитному эффекту НАС как антиоксиданта, комбинация вызвала образование АФК. Каждый компонент комбинации в относительно низких концентрациях не вызывал гибель опухолевых клеток. Концентрации полумаксимального ингибирования выживания сравнимы с таковыми для известных химиопрепаратов. На линиях клеток хронического миелоидного лейкоза человека методом проточной цитофлуориметрии показано, что комбинация оксида меди и НАС вызвала сложный механизм гибели: окраска аннексином V предшествовала признаку проницаемости плазматической мембраны (включение иодида пропидия). Однако активация каспазы 3 и протеолитическое расщепление поли(АДФ-рибоза)полимеразы не выявлены, что свидетельствует о переключении апоптоза на иные виды гибели или о сочетании механизмов гибели. Анализ клеточного цикла также не выявил увеличения фрагментации ДНК (субG1-область), однако для линий РМЖ MDA-MB-231 и аденокарциномы кишки HCT116 такой эффект отмечен, что указывает на тканеспецифические различия механизмов гибели. Таким образом, комбинация наночастиц оксида меди и НАС перспективна для индукции гибели опухолевых клеток, особенно при устойчивости (первичной или приобретенной) к применяемым в клинике препаратам. Требуются дальнейшие исследования для выявления деталей молекулярных механизмов и оценки приемлемости комбинации в моделях *in vivo*.

Подавление пролиферации глиом с помощью рекомбинантных белков семейства Iy6/uPAR

О.В. Шлепова^{1,2}, М.Л. Бычков¹, М.А. Шулепко¹,
В.Ю. Васильева³, А.В. Сударикова³, Е.Н. Люкманова^{1,2}

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» Долгопрудный, Московская обл.;

³ФГУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Открытие в иммунной, эндокринной и репродуктивной системах высших животных белков семейства Iy6/uPAR, имеющих структурную гомологию с трехпетельными нейротоксинами змей, вызвало интерес к этим молекулам и их роли в функционировании организма и возможности использования для разработки новых лекарств.

Из яда *Dendroaspis polylepis* был выделен

трехпетельный белок мамбалгин 2, мишенью его действия являются кислото-чувствительные каналы (ASIC). Мы впервые показали, что рекомбинантный аналог мамбалгина 2 тормозит рост клеток глиомы U251 MG, глиобластомы A172 и карциномы легкого A549, экспрессирующих ASIC1a, с полумаксимальной эффективной концентрацией (EC_{50}) ~0,9, 10 и 8 нМ соответственно, но при этом не влияет на рост нормальных кератиноцитов Het-1A и клеток карциномы кожи A431, не экспрессирующих ASIC1a.

Белок человека Lynx1, экспрессирующийся в мозге, является модулятором nAChR. Мы получили рекомбинантный водорастворимый вариант Lynx1 (ws-Lynx1) и показали на мышинной модели, что он способен проникать через гематоэнцефалический барьер. В настоящей работе впервые показано, что ws-Lynx1 ингибирует рост клеток глиомы U251 MG с EC_{50} ~0,2 нМ посредством модуляции $\alpha 7$ -nAChR, а также запускает в клетках активацию сигнальных каскадов PKC/IP3, MAP/ERK, p38 и JNK-киназ, которые, в свою очередь, активируют транскрипционные факторы STAT3, STAT5 и NF- κ B. В то же время показано отсутствие влияния ws-Lynx1 на пролиферацию нормальных астроцитов. Обработка глиомных клеток препаратом ws-Lynx1 значительно увеличивала экспрессию эндогенного Lynx1 и одновременно снижала экспрессию $\alpha 7$ -nAChR и маркера патологического воспаления (астроглиоза) GFAP. Кроме этого, мы впервые показали, что ws-Lynx1 значительно снижает секрецию провоспалительного цитокина TNF- α в клетках U251 MG и, следовательно, может контролировать воспалительные процессы в опухолевом микроокружении.

Таким образом, трехпетельные белки могут рассматриваться как прототипы противоопухолевых препаратов, направленных на лечение глиом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 18-34-00497 и 18-29-01050), а также стипендии Президента Российской Федерации (СП-4316.2018.4).

Рибофлавин (витамин B2) как фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии солидных опухолей

Н.В. Шолина^{1,2,3}, Р.А. Акасов^{2,3}, Д.А. Хоченков¹, А.Н. Генералова^{3,4}, В.А. Семчишен³, Е.В. Хайдуков^{2,3}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва;

³ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва;

⁴ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является чрезвычайно эффективным методом лечения злокачественных новообразований при условии, что существует возможность фотоактивации молекул сенсибилизатора во всем массиве опухолевой ткани, а сами фотосенсибилизаторы (ФС) не вызывают системного токсического эффекта. Рибофлавин (витамин B₂) является одним из лучших кандидатов на роль ФС, так как он не обладает системным токсическим эффектом и способен накапливать АФК с квантовой эффективностью ~50 %. Однако его фотовозбуждение возможно в ультрафиолетовом и синем диапазоне спектра, в котором глубина проникновения света в биоткань ограничена долями миллиметра. Решением данной проблемы является разработка подходов, обеспечивающих фотовозбуждение молекул рибофлавина под действием инфракрасного света в глубине опухолевой ткани. В качестве посредника, способного эффективно преобразовывать возбуждающее излучение ближнего инфракрасного диапазона, проникающее в биоткань на глубину до 3 см, в фотолюминесценцию ультрафиолетового и видимого диапазона спектра, могут быть рассмотрены наноразмерные апконвертирующие фосфоры (НАФ).

Цель исследования — оценить эффективность использования НАФ для инфракрасной опосредованной активации рибофлавина в глубине опухолевой ткани при проведении ФДТ.

Водорастворимая форма рибофлавина — флавиномононуклеотид (ФМН) (Фармстандарт, Уфа-Вита) — был использован в качестве ФС в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Эксперименты *in vitro* выполнены на клеточных линиях аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, глиобластомы человека U-87 MG и глиомы крысы C6. Для фотоактивации ФМН *in vivo* применялись НАФ со структурой ядро/оболочка [NaYF₄: Yb³⁺, Tm³⁺/NaYF₄]. ФДТ на основе ФМН, НАФ и лазерного излучения 975 нм проводилась на ксенографтах мыши SK-BR-3.

В ходе работы показано, что ФМН может выступать в качестве эффективного ФС *in vitro* в отношении клеточных линий SK-BR-3, U-87 MG и C6. Значения

IC₅₀ для клеток глиомы составляли ~30 мкМ ФМН, а для клеток карциномы молочной железы SK-BR-3 — ~50 мкМ ФМН (24 ч инкубации, облучение 4,2 Дж/см²). На ксенографтах мыши SK-BR-3 был продемонстрирован эффект ФДТ с использованием света инфракрасного диапазона для НАФ-опосредованного возбуждения ФМН, торможение роста опухоли при этом составило 90 ± 5 %.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 18-54-45034 в части синтеза наноразмерных апконвертирующих фосфоров и загрузки их противоопухолевыми препаратами и № 18-29-01021 в части экспериментов in vitro.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 18-29-01021 в части экспериментов с культурами глиомных клеток U-87 MG и C6 и № 18-32-20117 в части экспериментов по фотодинамической терапии.

Белки человека Lynx1, SLURP-1 и SLURP-2 подавляют пролиферацию опухолевых клеток эпителиального происхождения

М.А. Шулепко¹, О.В. Шлепова^{1,2}, М.Л. Бычков¹,
З.О. Шенкарев^{1,2}, Е.Н. Люкманова^{1,2}

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;
²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» Долгопрудный, Московская обл.

Никотиновые рецепторы ацетилхолина (nAChR) являются лигандзависимыми ионными каналами, активируемыми ацетилхолином и никотином. Эти рецепторы экспрессируются не только в нервной системе, но также играют важную роль в регуляции роста, миграции, дифференцировки и воспалительных процессов эпителиальных клеток. Известно, что с употреблением никотина связано развитие рака легкого, кожи, кишечника, РМЖ и т.д. В настоящее время nAChR рассматриваются как перспективная мишень для терапии онкологических заболеваний.

В нашей работе изучено влияние рекомбинантных аналогов белков человека Lynx1, SLURP-1 и SLURP-2, модуляторов nAChR на пролиферацию опухолевых клеток человека эпителиального происхождения. Обнаружено, что SLURP-1 и SLURP-2 в наномолярных концентрациях подавляют рост клеток эпидермальной карциномы (линия A431), карциномы груди (линии SKBR3 и MCF7) и колоректальной карциномы (линия HT-29), но не оказывают влияния на рост нормальных кератиноцитов (Het-1A) в этом диапазоне концентраций. Показано, что обработка клеток эпидермальной карциномы A431 препаратом рекомбинантного SLURP-1 снижает экспрессию nAChR α7-типа

на поверхности опухолевых клеток и индуцирует секрецию эндогенного SLURP-1 из внутриклеточного депо, увеличивая его концентрацию во внеклеточной среде.

Белок человека Lynx1 ранее был обнаружен в мозге, легких и почках. Мы обнаружили экспрессию Lynx1 также в клетках кожи, толстой кишки и молочной железы. Показано, что рекомбинантный аналог Lynx1 (ws-Lynx1) ингибирует рост клеток аденокарциномы легкого (линия A549), вызывая остановку клеточного цикла путем модуляции nAChR α7-типа и активации ряда внутриклеточных сигнальных каскадов. Инкубация клеток с ws-Lynx1 приводит к фосфорилированию проапоптотического белка-супрессора опухолей p53 и различных киназ, которые регулируют транскрипцию генов, рост, адгезию и дифференцировку клеток. Индукция апоптоза в клетках A549 под действием ws-Lynx1 была подтверждена проточной цитометрией с использованием фосфатидилсерина в качестве маркера раннего апоптоза.

Полученные данные позволяют рассматривать рекомбинантные аналоги белков человека Lynx1, SLURP-1 и SLURP-2 как перспективные препараты для терапии опухолей эпителиального происхождения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-74-20161).

Зависимость фармакокинетики 211-At в щитовидной железе от длительности безйодовой диеты

О.А. Юминов¹, Д.А. Бондаренко², В.А. Дроздов¹,
Д.О. Еременко^{1,3}, А.Н. Мурашев², С.Ю. Платонов^{1,3},
О.В. Фотина^{1,3}

¹НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;
²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;
³физический факультет ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Зависимость фармакокинетики 211-At в ЩЖ от длительности безйодовой диеты исследовалась на 4 группах животных: 1-я группа получала нормальное питание, 2-я находилась на 3-дневной, 3-я — на 7-дневной и 4-я — на 60-дневной безйодовой диете. Тестируемый радиофармпрепарат вводили животным (самцы крыс SD (Sprague Dawley)) внутривенно в хвостовую вену однократно в объеме 10 мл/кг в дозе 100 мкКи/животное. В ходе исследования животные подвергались некропии в определенные временные точки (30 мин, 1, 3, 6, 12, 16 и 24 ч) с забором ЩЖ для дальнейшего подсчета накопленной в ней активности с помощью колодезного сцинтилляционного гамма-спектрометра. Для каждой временной точки использовались 6 животных.

Активность в ЩЖ определялась в процентах от введенной активности:

$$n_{\text{орг}} = \frac{N_{\text{орг}}(t)}{N_{\text{введ}}} 100 \%,$$

где $N_{\text{орг}}(t)$ — активность в ЩЖ в момент времени t ; $N_{\text{введ}}$ — введенная активность.

Найдено, что ^{211}At всегда тропен к ЩЖ. Однако, чем больше была длительность безйодовой диеты, тем больше повышалась концентрация радионуклида ^{211}At в ЩЖ. Это свидетельствует о важности соблюдения длительной безйодовой диеты при лечении ^{211}At . При этом продолжительность безйодовой диеты нуждается в более детальном изучении.

Исследование механизмов гибели клеток рака молочной железы при действии новых ингибиторов шаперона HSP90

М.А. Ястребова¹, Ю.А. Пивень², А.И. Хамидуллина¹,
В.В. Татарский^{1,3}, Т.С. Хлебникова², Ф.А. Лахвич²,
А.М. Щербakov³

¹ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

²ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

HSP90 — молекулярный шаперон, который необходим для правильного складывания и созревания многочисленных клеточных белков. HSP90 — высококонсервативный белок, взаимодействующий с более чем 200 белками-клиентами, среди которых онкобелки, необходимые опухолевым клеткам для выживания и ускоренной пролиферации. Таким образом, ингибирование белка HSP90 в клетке может приводить к деградации белков-клиентов, а ингибиторы шаперона могут рассматриваться как противоопухолевые агенты.

Нами синтезированы 11 новых производных фторсодержащих 6,7-дигидробенз[d]- и [с]изоксазолонов (isfp-6-16) путем их оксимирования и последующего О-ацилирования полученных оксимов функционализированными бензойными кислотами.

Мы провели скрининг цитотоксической активности данных соединений на клеточных линиях РМЖ (MCF7, MDA-MB-231, HBL-100) и выбрали лидирующее вещество (isfp-14), которое использовали в дальнейших исследованиях механизмов гибели. Нами показано, что действие данного соединения на клетки РМЖ оказывает влияние на сигнальные пути PI3K/AKT/mTOR и NF-κB.

Параллельно с тестируемыми веществами оценивалось действие соединения 17-DMAG — известного ингибитора HSP90. Показано, что при добавлении 17-DMAG к клеткам HBL-100 наблюдается увеличение экспрессии ингибитора клеточного цикла p21, а также остановка клеток в G₂/M-периодах и появление полиплоидных клеток. Однако 17-DMAG оказывает противоположный эффект на клетках MDA-MB-231: снижение уровня p21 и блок в G₁-фазе клеточного цикла, что может быть связано с p53-статусом данной клеточной линии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-54-04001) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (X19PM-013).

Effect of docetaxel-resistance on the reactivity of prostate cancer cells to metformin

J. Catapano, T. Wróbel, M. Luty, J. Czyż

Department of Cell Biology, Faculty of Biophysics, Biochemistry and Biotechnology, Jagiellonian University in Krakow, Poland

Metronomic approach represent a promising strategy for the chemotherapy of drug-resistant tumors, because it can reduce the effective doses and adverse effects of chemotherapeutics. In particular, metabolic blockers reduce energy supply for multi-drug resistance systems, thus increasing tumor cells' reactivity to chemotherapeutics. Metformin is an anti-diabetic drug that blocks mitochondrial respiration, interferes with ATP production and with proliferation of cancer cells. However, the effect of drug-resistance of prostate cancer cells on their reactivity to metformin has not yet been evaluated. Here, we analysed short- and long-term cytotoxic and pro-apoptotic effects of metformin on the phenotype of human prostate cancer PC3 and DU145 cells and their docetaxel-resistant lineages (PC3_DCX20 and DU145_DCX20; obtained after long-term treatment with 20 nM DCX). We concentrated on their DCX-resistance pattern and compared their EMT-related phenotype, invasive potential and the activity of ATP-binding cassette (ABC) transporters in the presence of metformin and/or DCX. Metformin increased the sensitivity of drug-resistant PC-3 and DU145 cells to DCX; even though PC-3_DCX20 cells displayed reduced sensitivity to combined metformin/DCX treatment. When administered alone, metformin exerted less prominent cytostatic effects on PC_DCX20 cells than on their DU145_DCX20 counterparts. This effect was accompanied by EMT-related morphological changes, accompanied by the up-regulation of connexin (Cx) 43. These data indicate that reactivity of drug-resistant prostate cancer cells to metformin may depend on the efficiency of metabolic stress-induced EMT.

Тезисы

Наноразмерные антистоксовые фосфоры, загруженные противоопухолевыми препаратами, для тераностики солидных опухолей

Р.А. Акасов^{1,2,3,4}, J. Senthilselvan⁵, Н.В. Шолина^{1,2},
П.А. Демина¹, А.Н. Генералова^{1,4}, А.В. Звягин¹,
Е.В. Хайдуков^{1,2}

¹ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва;
²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России, Москва;

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
технологический университет МИСЦ», Москва;

⁴ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»,
Москва;

⁵University of Madras, India

Тераностика — перспективное направление современной биомедицины, направленное на разработку препаратов, сочетающих возможности диагностики и терапии. Наноразмерные апконвертирующие фосфоры (НАФ) могут выступать в качестве такого тераностического агента. НАФ представляют собой кристаллы NaYF_4 , легированные редкоземельными элементами Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , которые могут служить маркером для оптической визуализации биологической ткани благодаря способности к антистоксовой люминесценции, т.е. способности преобразовывать возбуждающее инфракрасное излучение, глубоко проникающее в биологическую ткань в свет видимого и ультрафиолетового диапазонов спектра. В данной работе мы предлагаем НАФ, загруженные противоопухолевыми препаратами доксорубицином (Dox) и куркумином (Cur), в качестве тераностического агента.

В ходе работы нами были получены гидрофобные нанокристаллы $\text{NaYF}_4/\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}$ и $\text{NaYF}_4/\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}$ со средним размером 90 ± 5 нм. Для дальнейшего биомедицинского применения поверхность НАФ была модифицирована полимолочной кислотой в присутствии различных стабилизаторов для повышения биосовместимости, при этом в оболочку были загружены противоопухолевые препараты Cur и Dox. Эффективность загрузки и скорость высвобождения препарата из НАФ зависели от материала стабилизатора (поливинилпирролидон ПД-131, декстран ПД-132, поливиниловый спирт ПД-133). Была изучена эффективность такой системы *in vitro* с использованием опухолевых и нормальных клеток (клеточные линии глиобластомы человека U-87 MG и глиомы крысы C6; иммортализованные человеческие фибробласты Bj-5ta). Показано, что НАФ, не загруженные противоопухолевыми

препаратами, не вызывали острой токсичности (24 ч) во всем диапазоне исследованных концентраций (не менее 70 % выживаемости при 0,2 мг/мл), что подтверждает эффективность их покрытия с использованием биосовместимых полимеров. В то же время загруженные противоопухолевыми препаратами НАФ были более токсичны и имели значения IC_{50} в диапазоне 0,05–0,2 мг/мл НАФ.

Было изучено накопление НАФ в опухолевых клетках по сравнению с клетками макрофагов, а также показан внутриклеточный релиз препаратов из оболочки НАФ в течение 24 ч инкубации. Показано, что частицы ПД-133, загруженные Dox, накапливались в клетках более активно, чем ПД-131 или ПД-132. И наоборот, в случае загрузки Cur более высокие уровни накопления были показаны для частиц ПД-131, в то время как ПД-133 демонстрировали наименьший уровень накопления. Исследование внутриклеточной локализации НАФ проводили с помощью конфокальной микроскопии (используя Dox и Cur в качестве флуоресцентных меток) и антистоксовой фотолуминесцентной микроскопии с применением эпилуминесцентного апконверсионного микроскопа, разработанного в Институте фотонных технологий РАН (г. Троицк). Было показано, что флуоресценция НАФ локализована внутри клеток, предположительно в лизосомах. Апоптоз был установлен в качестве основного механизма клеточной гибели под действием предложенных комплексов.

Таким образом, в данной работе мы предложили наноразмерные НАФ в качестве средства доставки противоопухолевых препаратов (Dox и Cur) и исследовали свойства полученного комплекса *in vitro*. Разрабатываемый комплекс НАФ-препарат может быть использован в качестве перспективного агента для нанотераностики.

Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (проекты № 18-54-45034 в части синтеза
наноразмерных апконвертирующих фосфоров и загрузки
их противоопухолевыми препаратами
и № 18-29-01021 в части экспериментов *in vitro*).

Разработка высокоселективного пептидного блокатора калиевых каналов для лечения онкологических заболеваний

Д.Ф. Багаева¹, К.С. Кудряшова^{1,2}, О.В. Некрасова²,
А.В. Феофанов^{1,2}

¹Биологический факультет ФГБОУ ВО
«МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Разработка пептидных блокаторов калиевых каналов является одним из перспективных направлений создания лекарственных препаратов для лечения многих аутоиммунных, неврологических и онкологических заболеваний, связанных с нарушением функционирования Kv1.x каналов (x = 1, 3, 6). В настоящее время известно, что в раковых клетках наблюдается повышенная экспрессия каналов Kv1.3, поэтому именно канал Kv1.3 является потенциально привлекательной молекулярной мишенью в диагностике и терапии рака.

Агитоксин 2 (AgTx2), выделенный из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus*, является высокоаффинным пептидным блокатором сразу нескольких калиевых каналов Kv1.x. Введение точечных мутаций в токсин позволяет внести существенные изменения в его аффинность и усилить селективность к поровому домену одного из каналов Kv1.x. Ранее были получены мутанты AgTx2, содержащие точечные аминокислотные замены с измененной аффинностью/селективностью в отношении сайтов связывания каналов, и определены константы диссоциации этих мутантов с калиевыми каналами KcsA-Kv1.x.

В настоящей работе мы предположили, что попарное объединение 2 мутаций в 1 пептид приведет к еще большему усилению селективности к каналу Kv1.3.

С помощью биоинженерной флуоресцентной тест-системы на основе клеток *Escherichia coli*, экспрессирующих гибридные калиевые каналы KcsA-Kv1.x в своей плазматической мембране, была исследована активность производных AgTx2 по способности связываться с гибридными каналами KcsA-Kv1.x. Методом конкурентного ингибирования связывания определены значения констант диссоциации.

Результаты исследования показали, что простое объединение 2 одиночных мутаций не приводит к аддитивному эффекту на всех типах каналов. Наблюдаемый эффект объясняется тем, что во взаимодействии токсина с пептидным каналом участвуют многие аминокислотные остатки, и потери некоторых контактов могут компенсироваться образованием замещающих связей. Дальнейшая работа будет направлена на разработку рационального дизайна улучшенных блокаторов с помощью предварительного молекулярного моделирования комплекса пептида с каналами KcsA-Kv1.x.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ.

Модифицированные катионные липосомы для ковалентной конъюгации с противоопухолевым цитокином TRAIL DR5-B/V114C

Т.В. Балабанова¹, А.В. Яголович¹, М.Э. Гаспарян¹,
О.О. Колоскова²

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;
²ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Ранее полученный нами рецептор-селективный мутантный вариант цитокина TRAIL DR5-B способен селективно связываться с рецептором смерти DR5, не проявляя аффинности к другим рецепторам TRAIL (DR4, DcR1, DcR2, OPG). TRAIL DR5-B индуцирует апоптоз в опухолевых клетках в 2–5 раз эффективнее цитокина TRAIL дикого типа. Также был создан вариант TRAIL DR5-B/V114C с мутацией V114C на N-конце полипептидной цепи для ковалентной конъюгации белка с малеимидными группами различных соединений. В настоящей работе предложен новый подход к получению липосом для ковалентной конъюгации с противоопухолевым цитокином TRAIL DR5-B/V114C. Иммобилизация цитокина TRAIL DR5-B/V114C на поверхности липосом позволит повысить стабильность белка, усилит кластеризацию рецептора смерти DR5 на поверхности опухолевых клеток при связывании с лигандом, а также будет способствовать накоплению препарата в опухоли за счет эффекта повышенной проницаемости и удерживания (EPR, effect of permeability and retention).

Ранее нами были получены липопептиды OrnGlu (C₁₆H₃₃)₂, способные самопроизвольно формировать в водной среде липосомы. В рамках данной работы была разработана методика получения липосом с возможностью ковалентного присоединения противоопухолевого цитокина TRAIL DR5-B/V114C через полиэтиленгликолевый (ПЭГ) линкер. Для встраивания в липосомы ПЭГ₃₄₀₀ был модифицирован гидрофобным «блоком» Glu (C₁₆H₃₃)₂. Структура и чистота полученного соединения была подтверждена данными инфракрасной спектроскопии ядерного магнитного резонанса, масс-спектрометрии. На следующем этапе гидрофобное ПЭГ-производное было модифицировано малеимидной функциональной группировкой (путем присоединения малеимидпропановой кислоты) для возможности проведения click-реакции с белком, содержащим функциональную SH-группу цистеина.

Липосомы, ковалентно конъюгированные с рецептор-селективным цитокином TRAIL DR5-B/V114C, имеют терапевтическую перспективу благодаря усилению апоптотического сигнала за счет повышения локальной концентрации цитокина, а также улучшенным показателям фармакокинетики.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-34-00812).

Иматиниб модулирует чувствительность клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II

А.Р. Галембикова¹, С.В. Бойчук¹, Ф.Ф. Бикиниева¹,
Э.И. Нургатина¹, П.Д. Дунаев¹, Е.Г. Михеева^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Республика Татарстан;

²ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер Минздрава Республики Татарстан», Казань, Республика Татарстан

Гастроинтестинальная стромальная опухоль (ГИСО) происходит из клеток Кахаля, координирующих перистальтику желудочно-кишечного тракта. Обнаружение активирующей мутации *c-KIT* в 75–85 % случаев ГИСО явилось основанием для внедрения в клиническую онкологию тирозинкиназного ингибитора — иматиниба мезилата (ИМ). Несмотря на высокую эффективность ИМ, более чем у 50 % пациентов через 2 года непрерывной терапии развивается вторичная резистентность, что явилось основанием для разработки и последующего внедрения таргетных препаратов 2-го и 3-го поколения (сутента и регорафиниба соответственно).

Цель исследования — изучение способности ИМ повышать чувствительность клеток ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II.

Эксперименты проводились на клеточных линиях ГИСО, чувствительных и резистентных к ИМ. Выявлено, что ИМ индуцировал повышение уровней экспрессии pH2AX (Ser139) и pATM (Ser1981) в клетках ГИСО. Однако уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 снижался, что могло свидетельствовать об ослаблении процессов гомологичной рекомбинации (ГР) в клетках ГИСО. Эффективность процессов ГР оценивали с помощью проточной цитофлуорометрии с использованием репортерной клеточной линии остеосаркомы DR-U2OS-GFP. Ген *GFP* приобретает свою функциональную активность только в результате успешной репарации двунитевых разрывов ДНК, индуцированных в результате трансфекции в клетки SceI-содержащей плазмиды. Было показано, что преинкубация клеток с ИМ приводила почти к 3-кратному снижению количества GFP-положительных клеток ($p < 0,05$). Полученные данные свидетельствуют о способности ИМ ингибировать процессы ГР ДНК, что могло оказать влияние на чувствительность опухолевых клеток к химиопрепаратам. Результаты колориметрического MTS-теста подтвердили способность ИМ повышать чувствительность опухолевых клеток ГИСО к доксорубину и этопозиду. Результаты иммуноблоттинга также свидетельствовали о значительном повышении уровня экспрессии γ -H2AX (маркер двунитевых разрывов) и усилении гибели

клеток по механизму апоптоза (повышение уровней экспрессии расщепленных форм каспазы 3 и PARP) на фоне сочетанного использования ИМ и доксорубина в клетках ГИСО.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о способности ИМ повышать чувствительность клеток ГИСО к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II в результате ИМ-обусловленной несостоятельности процессов ГР в клетках ГИСО, что иллюстрирует перспективность комбинированного использования ИМ и ингибиторов ДНК-топоизомеразы II в терапии больных с ГИСО.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-04-00158).

Влияние ИЛ-2, ИЛ-12 и ИЛ-15 на цитокинопродукцию клеток крови онкологических больных после активации *in vitro*

Ю.В. Гельм, Е.В. Абакушина, И.А. Пасова, Л.Ю. Гривцова
МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России, Обнинск

Адоптивная иммунотерапия цитотоксическими Т-лимфоцитами и НК-клетками, активированными *in vitro* с помощью цитокинов, является на данный момент перспективным методом клеточной иммунотерапии в онкологии. Для того чтобы получить пул активированных лимфоцитов, необходимо выявить оптимальные условия культивирования по оценке их функциональной активности.

Цель исследования — изучить цитокинопродукцию клеток крови онкологических больных различных нозологий после культивирования в полной питательной среде с добавлением разных комбинаций интерлейкинов: ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15.

Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли на градиенте плотности фикола по стандартной методике. Активировали МПК в CO_2 -инкубаторе в течение 7–10 дней либо в питательной среде 1 (с добавлением комбинации ИЛ-2/ИЛ-12 ($n = 7$)), либо в среде 2 (с добавлением комбинации ИЛ-2/ИЛ-15 ($n = 12$)). Каждые 48–72 ч обновляли половину объема питательной среды. На 3-е и 7-е сутки культивирования собирали супернатанты для ИФА, в которых определяли концентрации ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10, ИФН- α , ИФН- γ и фактора некроза опухоли α (ФНО- α) с помощью наборов реагентов «Вектор-Бест».

При активации клеток больных в среде 1 показано, что на 7-й день относительно 3-го дня увеличивалось содержание цитокинов: ИЛ-2 в 1,3 раза, ИЛ-4 в 5,5 раза ($p < 0,05$), ИЛ-6 в 4,1 раза, ИЛ-10 в 1,4 раза, ИФН- γ в 14,1 раза, ФНО- α в 7,4 раза ($p < 0,05$) в супернатантах; в среде 2 увеличивалось содержание: ИЛ-2

в 1,2 раза, ИЛ-4 в 4,3 раза ($p < 0,05$), ИЛ-6 в 1,1 раза, ИФН- γ в 2 раза ($p < 0,05$), ФНО- α в 3,1 раза и уменьшалась концентрация ИЛ-10 в 1,3 раза (составляла 120,5 (82,8–146,8) пг/мл), но все равно превышало содержание ИЛ-10 в супернатантах 7-го дня со средой 1 (91,0 (80,5–105,0) пг/мл). ИФН- α выявлен в следовых количествах на 3-е и 7-е сутки при разных условиях культивирования.

На 3-и сутки МПК, культивируемые в среде 1, продуцировали значительно меньшие концентрации ИЛ-6 в 3,6 раза, ИЛ-10 в 2,5 раза ($p < 0,05$), ИФН- γ в 9,2 раза и ФНО- α в 2,3 раза, чем в среде 2. На 7-е сутки клетки больных, культивируемые в среде 1, продуцировали практически такие же концентрации ИЛ-2, ИЛ-4, ФНО- α , как в среде 2, несколько большие концентрации ИЛ-6 (в 1,1 раза) и несколько меньшие концентрации ИФН- γ (в 1,3 раза, $p < 0,05$).

Таким образом, данные модели культивирования приемлемы для активации лимфоцитов больных, полученные результаты указывают на более позднюю активацию клеток в среде с добавлением ИЛ-2/ИЛ-12 относительно среды с добавлением ИЛ-2/ИЛ-15.

Цитокинопродукция клеток крови при спонтанном и митогениндуцированном способе культивирования на фоне проведения клеточной иммунотерапии

Ю.В. Гельм, Е.В. Абакушина, И.А. Пасова, Л.Ю. Гривцова
МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России, Обнинск

Введение. Уровень концентрации цитокинов в сыворотке или плазме крови отражает работу гуморального и клеточного звена иммунитета пациента. Спонтанная продукция цитокинов показывает, насколько клетки крови уже активированы *in vivo*, митогениндуцированная продукция позволяет оценить физиологический резерв активности клеток пациента. При проведении клеточной иммунотерапии (ИТ) запускается активация клеток иммунной системы в организме пациента, поэтому определение цитокинопродукции клеток крови онкологических больных до ИТ и на ее этапах позволит выявить как дисфункцию, так и степень активности клеток иммунной системы.

Цель исследования — определить цитокинопродукцию клеток крови здоровых доноров и онкологических больных без проведения ИТ и после ИТ при спонтанном и митогениндуцированном способе культивирования.

Материалы и методы. В исследование включены 2 группы онкологических больных: 1-я — получающие непрерывно ИТ не менее 1 года ($n = 10$), 2-я — не получавшие ранее ИТ ($n = 10$), а также контрольная группа — доноры крови ($n = 10$). Для проведения ИТ

пациентам 1-й группы выполнялась активация *in vitro* предварительно выделенных лимфоцитов с помощью комбинации цитокинов ИЛ-2/ИЛ-15 и внутрикожное введение полученных цитотоксических лимфоцитов на 3, 5, 7 и 10-й день после начала активации. Спонтанную и митогениндуцированную (митоген: фитогемагглютинин, конканавалин А и липополисахарид) активацию клеток цельной крови, а также ИФА супернатантов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10, ИФН- α , ИФН- γ и ФНО- α) проводили с помощью наборов реагентов «Вектор-Бест». Данные представлены как медиана (Me) и диапазон квартильных отклонений: 25–75 % [LQ–UQ].

Результаты. Показано, что при стимулировании клеток митогеном во всех группах, включая контрольную, отмечается выраженный рост продукции цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10, ИФН- γ и ФНО- α) относительно спонтанной продукции ($p < 0,05$). При спонтанной и митогениндуцированной продукции ИФН- α определяется в следовых количествах во всех группах. После воздействия митогеном на клетки больных 1-й группы, по сравнению со 2-й группой и контрольной, отмечается более высокая потенциальная способность в ответ на стимул секретировать цитокины: ИЛ-6 (11202,5 (8998,8–13751,3) пг/мл), ИФН- γ (1935,2 (1393,4–2847,2) пг/мл) и ФНО- α (977,0 (789,3–1238,5) пг/мл). Уровень митогениндуцированной продукции цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 в обеих группах больных значительно не менялся относительно контрольной группы, а уровень ИЛ-2 был ниже в среднем в 2 раза ($p < 0,05$).

Таким образом, под действием митогена в супернатантах онкологических больных 1-й группы определяется большее количество ИЛ-6, ИФН- γ и ФНО- α , которые продуцируются активированными цитотоксическими лимфоцитами и НК-клетками в ответ на клеточную ИТ.

Сравнительный анализ чувствительности опухолевых клеток различного происхождения к действию полностью трансретиноевой кислоты

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод, Е.М. Чевкина
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Ретиноевая кислота (РК) считается промотором клеточной дифференцировки и супрессором опухолевого роста, в связи с чем предпринимаются активные попытки ее использования в качестве противоопухолевого агента. Однако основной проблемой применения РК в клинической практике является приобретение устойчивости. Для исследования механизмов резистентности клеток к РК необходимы

экспериментальные модели, включающие чувствительные и резистентные клетки единого происхождения.

Цель исследования — сравнительный анализ чувствительности к РК клеток различных типов опухолей и выбор критериев оценки РК-чувствительности/резистентности.

Материалы и методы. Клетки линии нейробластомы (SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR-32), РМЖ (MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, HBL100), глиобластомы (LN229 и U87) и НМРЛ (H460 и A549) культивировали в среде DMEM или RPMI (линии нейробластомы) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, высаживали в количестве 50–700 тыс. в зависимости от клеточной линии, через 24 ч в среду добавляли наиболее активный изомер РК, полностью трансретиноевую кислоту (ATRA, Sigma) в различных концентрациях. В контрольные клетки каждой линии ATRA не добавляли. На 5-й день проводили подсчет живых клеток после окрашивания трипановым синим с помощью автоматического счетчика (Cell Counter, BioRad).

Результаты. Количество живых клеток нейробластомы всех исследованных линий (SK-N-AS, SH-SY-5Y и IMR-32) и одной из клеточных линий РМЖ (MCF7) уменьшалось на 50 % и более по сравнению с контролем при обработке ATRA в различных концентрациях ≤ 1 мкМ. Большинство изученных линий РМЖ (MDA-MB-231, MDA-MB-453, HBL100), а также клетки глиобластомы (LN229 и U87) и НМРЛ (H460 и A549) оказались устойчивыми к действию ATRA. Количество живых клеток данных линий значимо не отличалось от контроля при инкубации с ATRA в концентрации 1 мкМ, а при концентрации 10 мкМ разница в количестве клеток по сравнению с контролем не превышала 20 %.

Закключение. Таким образом, в качестве критерия оценки чувствительности клеток к РК можно использовать двукратное и более снижение динамики пролиферации при инкубации с 1 мкМ ATRA. В качестве экспериментальной модели для изучения механизмов резистентности к РК можно использовать линии клеток РМЖ, среди которых имеются как чувствительные, так и устойчивые варианты.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-015-00027 А).

Оценка противоопухолевого действия вторичных метаболитов белокопытника гибридного *Petasites hybridus* (L.) в условиях *in vitro* на культуре клеток HeLa

Я.С. Енин, О.Н. Буров, Н.Н. Тимошкина, Д.С. Потемкин, Н.Г. Васильченко, Е.С. Бондаренко, А.Б. Сагаканц

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

В исследовании были протестированы вторичные метаболиты, выделенные из корней белокопытника гибридного (*Petasites hybridus* L.) в условиях *in vitro* на культуре клеток HeLa.

Для тестирования были отобраны 6 вторичных метаболитов, экстрагированных и очищенных методом препаративной хроматографии. Культивирование HeLa CCL2 проводили в стандартных условиях в среде MEM. При достижении 75–80 % уровня конфлюэнтности заменяли питательную среду с внесением вторичных метаболитов (4 и 12 мкг/мл, инкубация 24 и 72 ч). Выживаемость определяли в счетчике клеток NanoEnTek JuliFl (Корея) в присутствии 0,4 % трипанового синего. Оценку апоптоза проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II с помощью FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I.

В эксперименте статистически значимые результаты были получены в режиме инкубации 72 ч при концентрации 4 мкг/мл. Ниже приведены данные для 3 протестированных веществ, которые значимо отличались от контроля ($p < 0,05$).

Вариант	Выживаемость, %	Ранний апоптоз, %	Поздний апоптоз, %
Контроль	87	7,2	5,8
2,4-дигидрокси-2,5-диметилфуран-3(2H)-он	79,6	13,1	7,3
5-гидроксиметилфуран-2-карбальдегид	87,8	3,9	8,3
Берберин	73,1	29,3	37,2

Наиболее яркий проапоптотический эффект был отмечен для берберина, использованного в эксперименте в качестве положительного контроля. Экспозиция с 2 рассматриваемыми метаболитами приводит к изменению соотношения клеток, находящихся

на различных стадиях апоптоза, что можно расценивать как отражение реализации цитотоксического эффекта.

В эксперименте на линии HeLa CCL2 был показан умеренный проапоптотический эффект для 2 из 6 вторичных метаболитов *P. hybridus* L. Тем не менее согласно аналитическим данным и сведениям литературы дальнейшее исследование соединений из белокорытника гибридного представляется перспективным для поиска действующих веществ с противоопухолевым эффектом.

Влияние хромосомных aberrаций на резистентность к ритуксимабу у больных хроническим лимфолейкозом

А.Н. Зельцер, Ю.В. Шатохин, И.В. Снежко

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Одной из проблем в лечении больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) является развитие резистентности при проведении иммунополихимиотерапии 1-й линии. Механизмы развития резистентности к ритуксимабу при ХЛЛ окончательно не ясны. Возможными причинами могут быть выработка антител к ритуксимабу, реактивация вирусных инфекций. Кроме этого, известно, что ХЛЛ — гетерогенное заболевание, которое по своему течению чрезвычайно разнообразно.

Наличие хромосомных aberrаций, таких как делеция хромосомы 17p (del(17p)) или мутация TP53, у пациентов с ХЛЛ, имеющих показания к началу терапии, позволяет отнести их к группе высокого риска с резистентностью к цитостатической терапии. Режим FCR (флудара, циклофосфан, ритуксимаб) как 1-я линия терапии позволяет получить полную ремиссию только у 5 % больных. Нами при обследовании 144 больных ХЛЛ del(17p) была выявлена у 66 пациентов. У 30 (45,5 %) пациентов обнаружено прогностически значимое количество «положительных ядер» (более 15 %). Проведение у последних полихимиотерапии по схеме FCR в стандартных дозах (6 курсов) привело к достижению ремиссии в 2 (6,7 %) клинических случаях. Остальным 28 (93,3 %) пациентам был назначен внутривенный иммуноглобулин класса G на 3–5 дней в суточной дозе 5 г. Положительный результат был отмечен у 5 (16,6 %) больных: у 1 (3,3 %) — полная, у 4 (13,3 %) — частичная ремиссия. При контрольном проведении флуоресцентной гибридизации *in situ* отмечено снижение количества «положительных ядер», не выше предельно допустимых значений для del(17p).

Таким образом, применение иммуноглобулинов класса G у больных ХЛЛ с неблагоприятным прогнозом является патогенетически оправданным для преодоления резистентности при проведении иммунополихимиотерапии.

Исследование свойств и оптимизация структуры рекомбинантных носителей для доставки противораковых средств в ядра клеток-мишеней

Т.С. Карягина¹, Т.А. Сластникова¹, А.А. Розенкранц^{1,2}
А.В. Уласов¹, Ю.В. Храмцов¹, Т.Н. Лупанова¹, А.С. Соболев^{1,2}

¹ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Для ряда онкологических заболеваний характерным признаком является сверхэкспрессия опухолевыми клетками на своей поверхности таких рецепторов, как фолатный рецептор α (FR α) и рецептор к эпидермальному фактору роста (EGFR). Нами были разработаны несколько вариантов рекомбинантных носителей на основе модульных нанотранспортеров (МНТ), способных к избирательному связыванию с EGFR (МНТ_{C-EGF}, МНТ_{N-EGF}, МНТ_{N-аффибиди}) и с FR α (МНТ-ПЭГ-Ф). Все они имели в своем составе модули, позволяющие выходить из эндосом и транспортироваться в ядро, что делало возможным доставку в ядра опухолевых клеток, экспрессирующих EGFR или FR α , локально действующих цитотоксических агентов, таких как эмиттер электронов Оже ¹¹¹In.

В ходе работы была исследована функциональная активность каждого модуля для всех типов транспортеров, а также их способность к рецептор-специфической интернализации и накоплению внутри ядер клеток-мишеней. Методом клонированного анализа было показано, что ¹¹¹In-NOTA-МНТ-ПЭГ-Ф, ¹¹¹In-NOTA-МНТ_{C-EGF}, ¹¹¹In-NOTA-МНТ_{N-EGF} и ¹¹¹In-NOTA-МНТ_{N-аффибиди} обладают многократно большей цитотоксичностью по сравнению со свободным ¹¹¹In. Действие ¹¹¹In-NOTA — МНТ_{C-EGF} и ¹¹¹In-NOTA-МНТ_{N-аффибиди} на целевые клетки было сходным между собой, тогда как ¹¹¹In-NOTA-МНТ_{N-EGF} оказывал в 3 раза меньший эффект.

Также помимо цитотоксического воздействия было оценено влияние исследуемых МНТ на рост клеток, экспрессирующих на поверхности EGFR и FR α , поскольку согласно данным литературы связывание EGFR и FR α со своими природными лигандами приводит к запуску каскадов реакций, влияющих на различные свойства клеток, в частности которые могут приводить к ускорению их пролиферации. Нами было продемонстрировано, что МНТ_{C-EGF}, МНТ_{N-аффибиди} и МНТ-ПЭГ-Ф не оказывают статистически значимого влияния на пролиферацию опухолевых клеток-мишеней, тогда как добавление в среду свободного EGF, фолиевой кислоты или МНТ_{N-EGF} приводит к достоверному увеличению пролиферации в 3,5; 1,3 и 2 раза относительно контроля соответственно.

Результаты проведенных экспериментов показали, что положение EGF в составе молекулы транспортера

влияет на его свойства. Из всех исследованных вариантов МНТ МНТ-ПЭГ-Ф, МНТ_{C-EGF} и МНТ_{N-аффибоди} являются наиболее перспективными для избирательной доставки в ядра опухолевых клеток-мишеней эмиттера электронов Оже ¹¹¹In.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-14-01304).

Модель плаценты-на-чипе *in vitro* для оценки транспорта и токсичности химиотерапевтических препаратов

Е.Н. Князев^{1,2}, А.Ю. Христиченко^{1,3}, Т.Н. Герасименко¹,
О.В. Киндеева^{1,4}, В.А. Петров^{1,5}, Д.А. Сахаров^{1,6}

¹ООО «НТЦ «БиоКлиникум», Москва;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;

³ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва;

⁴ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Москва;

⁵ФГБУН «Институт нанотехнологий микроэлектроники РАН», Москва;

⁶ФГБОУ ВО «РХТУ им. Д.И. Менделеева», Москва

Модель плаценты-на-чипе *in vitro* на основе клеток человека с циркуляцией среды позволяет изучать транспорт препаратов через плацентарный барьер с хорошей воспроизводимостью и относительной простотой выполнения экспериментов. Нами были изучены транспорт и токсичность препаратов, входящих в состав ХТ стандартного режима FAS при РМЖ у беременных женщин.

Клеточную линию BeWo b30, схожую по свойствам с клетками цитотрофобласта, выращивали в среде DMEM с 2 mM L-глутамина, содержанием глюкозы 4,5 г/л, 10 % FBS, 1x раствором заменимых аминокислот, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в культуральных вставках из 96-луночного планшета Transwell, помещенных в микрофлюидный чип с циркуляцией среды. Клетки высевали с плотностью 10 тыс. клеток на вставку. Через 7 дней к клеткам на 1 ч добавляли 5-фторурацил (25 мкг/мл), доксорубицин (125 мкг/мл), циклофосфамид (150 мкг/мл) или все 3 препарата одновременно. Клетки контролировали с помощью измерения импедансного спектра. Концентрацию препаратов, прошедших через модель плацентарного барьера, определяли методом ВЭЖХ-МС/МС. Жизнеспособность клеток оценивали с использованием набора реагентов CellTiter-Blue.

После 1 ч инкубации с лекарственными средствами трансэпителиальное электрическое сопротивление (TEER) снижалось в эксперименте и контроле в среднем с 90 до 25 Ом × см², а через 24 ч TEER составляло 67,3 ± 17,9 Ом × см² для контроля, 67,8 ± 16,4 Ом × см²

для циклофосфамида, 90,0 ± 20,1 Ом × см² для 5-фторурацила и снизился до 16 Ом × см² для доксорубицина и смеси препаратов. Жизнеспособность клеток значительно не различалась между контролем, 5-фторурацилом и циклофосфамидом, но снижалась до 40 ± 9 % от контроля при воздействии доксорубицина и смеси препаратов. Проницаемость модели для 5-фторурацила составила 1,3–1,5 % из-за высокой гидрофильности молекулы, для доксорубицина — 0,3–1,1 % из-за большого размера и высокой степени связывания с белками и ДНК, а для циклофосфамида — 7,3–8,0 % из-за липофильности, малого размера и низкой связываемости с белками.

Таким образом, разработанная модель плаценты-на-чипе *in vitro* подходит для оценки транспорта и токсичности ксенобиотиков, включая ХТ-препараты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.» (соглашение № 14.588.21.0007, уникальный идентификатор: RFMEFI58817X0007).

Реактивация эпигенетически репрессированного гена GFP противоопухолевыми препаратами в тест-системе HeLa TI

Ю.В. Макусь¹, В.П. Максимова², М.Г. Якубовская²,
К.К. Кирсанов^{2,3}

¹ФГБОУ ВО «Российский технологический университет», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

³ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Эпигенетические aberrации наряду с генетическими изменениями играют важную роль в возникновении и прогрессии злокачественных новообразований. К настоящему моменту для многих онкологических заболеваний выявлены характерные эпигенетические нарушения, связанные с изменением профиля метилирования ДНК и модификаций гистонов, которые могут привести к инактивации экспрессии различных генов, в том числе генов супрессоров опухолей. Эпигенетическая реактивация этих генов с помощью противоопухолевой терапии является механизмом, посредством которого можно контролировать развитие злокачественных новообразований. Кроме этого, показано, что использование эпигенетически активных препаратов (ингибиторов метилтрансфераз и гистоновых деацетилаз) в комбинации с ХТ, радиотерапией, иммунотерапией повышает эффективность терапии таких заболеваний, как рефлекторно-рефрактерная

диффузная крупно-В-клеточная лимфома, острый миелоидный лейкоз, РМЖ, бронхогенная карцинома.

В данной работе мы изучили способность ряда противоопухолевых препаратов реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированного гена *GFP* в тест-системе HeLa TI.

HeLa TI — субпопуляция клеток HeLa с интегрированным эпигенетически репрессированным геном *GFP*. Процент GFP-положительных клеток в интактной популяции составляет 5 %. Исследуемое вещество считалось эпигенетически активным при двукратном увеличении доли GFP-положительных клеток (по сравнению с отрицательным контролем). Увеличение доли GFP-положительных клеток в популяции детектировали с помощью проточной цитофлуориметрии. Для исследования были выбраны следующие противоопухолевые препараты: авелумаб, гемцитабин, gefitinib, золедроновая кислота, иматиниб, иринотекан, оксалиплатин, оларатумаб, пазопаниб, темозоломид, цетуксимаб, цитарабин, энзастаурин, эрибулин, 5-фторурацил.

Мы показали, что следующие противоопухолевые препараты реактивируют экспрессию эпигенетически репрессированного гена *GFP*: гемцитабин (увеличение количества флуоресцирующих клеток в 3,8 раза), оксалиплатин (в 6,8 раза), цетуксимаб (в 2,7 раза), цитарабин (в 4,2 раза) и энзастаурин (в 3,0 раза).

С учетом полученных данных можно сделать вывод о том, что такие противоопухолевые препараты, как гемцитабин, оксалиплатин, цетуксимаб, цитарабин и энзастаурин, способны реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированных генов, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных кандидатов для использования в эпигенетической противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-75-00115).

Влияние золедроновой кислоты на рост асцитной карциномы Эрлиха

И.А. Мамичев, Н.С. Сапрыкина, В.А. Сюваткин, Т.А. Богуш
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Золедроновая кислота (ЗК) — бисфосфонат, применяемый при лечении остеопороза, в том числе вызванного метастатическим поражением. В исследованиях *in vitro* продемонстрирован прямой противоопухолевый эффект препарата: остановка клеточного цикла, индукция апоптоза и, что особенно важно, ингибирование эпителиально-мезенхимального перехода, ключевого процесса в метастазировании злокачественных опухолей.

Цель исследования — на экспериментальной модели асцитного РМЖ Эрлиха оценить влияние местного и системного введения ЗК на динамику роста опухоли.

Материалы и методы. Исследованы самки мышей линии Balb/c (средняя масса тела — 21,2 г) с внутрибрюшинно трансплантированным РМЖ Эрлиха (3 группы по 12 особей, включая контрольную группу, не получавшую препарат) в концентрации 1 млн клеток/мл. Изучено влияние 2 режимов введения препарата ЗК (местного внутрибрюшинного (в/б) и системного внутривенного (в/в)) на объем асцитической жидкости и количество опухолевых клеток. Препарат вводили ежедневно в концентрации 0,4 мг/кг, начиная со дня трансплантации опухоли по 10-е сутки. По 3 животных из каждой группы выводили из эксперимента на 7-й и 11-й дни опыта.

Результаты. В ходе эксперимента обнаружено существенное снижение объема асцитической жидкости и концентрации свободных опухолевых клеток в асцитической жидкости животных, получавших ЗК, по сравнению с животными контрольной группы вне зависимости от способа введения.

На 11-е сутки эксперимента объем жидкости у животных контрольной группы составил $2,9 \pm 0,5$ мл. В обеих экспериментальных группах накопление жидкости шло медленнее, и на 11-е сутки эксперимента объем жидкости в группе в/б-введения составил $0,4 \pm 0,8$ мл, в группе в/в-введения — $0,5 \pm 0,8$ мл.

На 7-е сутки после трансплантации отмечено более чем двукратное снижение количества опухолевых клеток на миллилитр асцитической жидкости по сравнению с нелеченым контролем в группе в/б-введения (226 ± 218 vs 617 ± 161 тыс. клеток/мл) и в группе в/в-введения (348 ± 237 vs 617 ± 161 тыс. клеток/мл). Эффект сохранился на 11-е сутки: 136 ± 35 vs 688 ± 213 тыс. клеток/мл в группе в/б-введения и 139 ± 185 vs 688 ± 213 тыс. клеток/мл в группе в/в-введения.

Заключение. Выявлено ингибирующее воздействие ЗК на рост асцитного РМЖ Эрлиха при ежедневном введении бисфосфоната. Эффект препарата реализуется независимо от способа введения.

Топология экстрамембранных доменов транспортера NaPi2b в условиях злокачественной трансформации клеток

Л.Ф. Минигулова¹, А.К. Нургалиева¹, Д.В. Савенкова¹,
В.С. Скрипова¹, М.Н. Журавлева¹, М.В. Богданов²,
Р.Г. Киямова¹

¹ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Республика Татарстан;

²Научно-медицинский центр Техасского университета в Хьюстоне, Медицинская школа Макговерна, Хьюстон, США

Одной из самых актуальных проблем современной онкологии является поиск специфичных мишеней для диагностики и терапии злокачественных новообразований,

включая опухолеспецифические эпитопы белков. Мы предлагаем новую концепцию появления опухолеспецифических эпитопов интегральных мембранных белков за счет изменения их топологии и конформации в условиях, характерных для опухоли, а именно изменения липидного состава мембран, наличия мутаций, степени гликозилирования, изменения pH и гипоксии на модели фосфатного трансмембранного транспортера NaPi2b.

Натрийзависимый фосфатный транспортер NaPi2b (SLC34A2, NaPi-1b, NPT2b) принадлежит к семейству транспортеров SLC34A2 и участвует в поддержании фосфатного гомеостаза в организме человека. NaPi2b экспрессируется в ряде нормальных и опухолевых тканей, включая РЯ, РМЖ и рак поджелудочной железы. NaPi2b является интегральным мембранным белком с большим экстрамембранным доменом 4 (ЭМД4, 234–362 aa), N- и C-концевыми доменами, расположенными в цитоплазме, и представляет собой удобную мишень для таргетной терапии. На сегодняшний день ряд МА, направленных против ЭМД4 транспортера, проходят клинические испытания для лечения РЯ и рака легкого (ХМТ-153, Rebma200). Нами клонирован район эпитопа в границах ЭМД4 (311–340 aa) для антител MX35 и L2 (20/3) и показано, что распознавание NaPi2b этими МА обусловлено дисульфидными связями, гликолизированием в районе эпитопа и отменяется мутацией в положении Т330V. Мы показали, что в образовании дисульфидной связи участвует цистеин 350, который стабилизирует большой ЭМД4 транспортера, что важно для его транспортной активности. Выявлено, что топология белка и липидный состав клетки претерпевают значительные изменения в условиях гипоксии и низкого pH, при этом его N-концевой фрагмент может быть локализован снаружи опухолевой клетки, что делает его еще одним потенциальным опухолеспецифическим доменом транспортера. Полученные данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение при разработке новых таргетных противоопухолевых препаратов высокой специфичности.

Работа выполнена за счет субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Оценка микрососудистой плотности в опухоли при раке шейки матки при применении неоадьювантной химиотерапии с бевацизумабом

Н.А. Назаралиева¹, А.Ю. Максимов¹, Е.Ф. Комарова²,
Е.Ю. Комарова³

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»

Минздрава России, Москва;

³ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Цель исследования — изучить влияние НХТ самостоятельно и в сочетании с бевацизумабом на плотность микрососудов опухоли при местно-распространенном РШМ.

Материалы и методы. Проведено исследование биоптатов плоскоклеточного РШМ (местно-распространенный РШМ) T1b2 — T2bNxM074 до лечения (группа сравнения, $n = 30$) и после оперативного вмешательства. Пациентки рандомизировано были разделены на основную группу ($n = 49$), которым была проведена НХТ с включением в схему бевацизумаба, и контрольную группу ($n = 25$), которым выполнена стандартная НХТ. Внутриопуховую микрососудистую плотность оценивали стандартным ИГХ-методом с применением CD34. Количество сосудов определяли в каждом поле зрения препарата при использовании объектива $\times 40$.

Результаты. Подсчет количества микрососудов показал, что в группе сравнения у 70 % пациенток (21 из 30 случаев) окрашены от 4 до 10 сосудов и у 30 % (9 из 30) — от 2 до 3 сосудов. В контрольной группе в 76 % случаев (19 из 25) насчитывалось 2–3 сосуда, из них 20,8 % составили больные с эндофитным вариантом местно-распространенного РШМ, и в 24 % (6 из 25) — не более 1 сосуда в поле зрения. В основной группе в 83,7 % случаев (41 из 49) встречались единичные сосуды, и только у пациенток с эндофитной формой РШМ были отмечены 2–3 сосуда в поле зрения (16,3 % от общего числа пациенток данной группы). Среднее количество сосудов микроциркуляторного русла в поле зрения у пациенток основной группы было ниже по сравнению с опухолями в контрольной группе и группе сравнения на 38 и 87 % соответственно ($p < 0,05$).

Заключение. Снижение количества микрососудов в опухоли местно-распространенного РШМ при дополнении НХТ бевацизумабом более выраженное, чем в самостоятельном варианте, характеризует эффективность использования бевацизумаба, действие которого связано с блокированием образования ангиогенного сигнала. Эндофитный вариант характеризуется большей устойчивостью к примененной терапии, в связи с чем необходимы дальнейшие исследования влияния антиангиогенной терапии с учетом формы роста РШМ.

Низкая концентрация иматиниба в плазме крови как неблагоприятный прогностический фактор течения хронического миелолейкоза

О.С. Оксенюк¹, С.И. Куцев^{2,3}, Ю.В. Шатохин¹

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», Москва;

³ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

В целях поиска зависимости цитогенетического ответа (ЦО) на терапию иматинибом от значений остаточной концентрации (C_{trough}) препарата в плазме крови был обследован 321 пациент с хроническим миелолейкозом в хронической фазе на фоне терапии иматинибом в дозе 400 мг/сут.

Материалы и методы. C_{trough} иматиниба в плазме крови определяли через 24 ± 3 ч после последнего приема препарата методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме MRM 494,2 $\rightarrow$ 394,2 для иматиниба и 502,5 $\rightarrow$ 394,1 для внутреннего стандарта с применением хроматографа Agilent 1200, детектора Agilent 6140 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, США). Метод прошел международную валидацию.

Результаты. Все больные были распределены на 4 квартили (по возрастанию концентрации). В каждом квартиле пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от достигнутого ЦО на терапию иматинибом согласно критериям ELN. Первый квартиль (Q1) включал пациентов ($n = 81$) с наименьшими значениями C_{trough} иматиниба от 0 до 670 нг/мл, Q2 — пациентов ($n = 80$) со значениями C_{trough} от 671 до 1042 нг/мл, Q3 — пациентов ($n = 80$) с концентрацией от 1043 до 1362 нг/мл и Q4 — больных ($n = 80$) с наибольшими значениями C_{trough} иматиниба от 1363 до 3826 нг/мл.

С увеличением значения квартиля (а следовательно, и с ростом концентрации) отчетливо прослеживалась тенденция увеличения числа пациентов с оптимальным ЦО и уменьшением с отсутствием и субоптимальным ЦО. Так, оптимальный ЦО в Q1 наблюдался у 48,1 % ($n = 39$) пациентов, в Q2 — у 77,5 % ($n = 62$), в Q3 — у 81,3 % ($n = 65$), в Q4 — у 85,0 % ($n = 68$). Тогда как субоптимальный ЦО в Q1 отмечался у 27,2 % ($n = 22$) пациентов, в Q2 — у 16,3 % ($n = 13$), в Q3 — у 12,5 % ($n = 10$), в Q4 — у 6,2 % ($n = 5$), а группа с отсутствием ЦО составили в Q1 — 24,7 % ($n = 20$), в Q2 — 6,2 % ($n = 5$), в Q3 — 6,3 % ($n = 5$), в Q4 — 8,8 % ($n = 8$). Статистическая значимость различий показателей между Q1 и Q2 составила 0,0002, для Q1 и Q3 — 0,00005, для Q1 и Q4 — 0,00000, что подтверждает замеченную зависимость ЦО на терапию от значения C_{trough} препарата в плазме крови.

Анализ результатов исследований в группах

пациентов, разделенных на квартили в зависимости от значений C_{trough} иматиниба в плазме, показал, что C_{trough} иматиниба в плазме крови может оказывать влияние на достижение оптимального ЦО. Исследование C_{trough} иматиниба в плазме крови целесообразно проводить у больных хроническим миелолейкозом с субоптимальным ответом и отсутствием ответа на терапию иматинибом в целях оптимизации суточной дозы препарата.

Ингибиторы REDD1 для снижения побочных эффектов глюкокортикоидов

А.В. Савинкова^{1,2}, Е.С. Лылова¹, Л.Р. Тилова¹,
О.В. Морозова¹, К.И. Кирсанов¹, М.Г. Якубовская¹,
И.В. Будунова³, Е.А. Лесовая^{1,4}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

²ГБУЗ «МКНЦ им. А.С. Логинова ДЗМ», Москва;

³Northwestern University, Chicago, IL, USA;

⁴ФГБОУ ВО «РязГМУ им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России, Рязань

Широкое применение глюкокортикоидов (ГК) в комбинированной ХТ злокачественных новообразований кроветворной системы обусловлено их высокой терапевтической активностью, а также неотъемлемо связано с развитием ряда осложнений. Механизм действия ГК осуществляется посредством связывания с рецептором глюкокортикоидов (GR). Известно, что повышение экспрессии GR-зависимого гена *REDD1* в ответ на длительное действие стероидов является причиной возникновения ГК-индуцированных побочных эффектов. В связи с этим был осуществлен биоинформатический скрининг ингибиторов *REDD1* в базе данных LINCS. Наиболее перспективные соединения, модуляторы сигнального пути PI3K/Akt/mTOR (LY294002, Wortmannin и AZD8055), были отобраны для дальнейшего исследования.

Настоящая работа была направлена на изучение возможности применения данных соединений в терапии гемобластозов для повышения ее безопасности и эффективности.

Было показано, что комбинация ингибиторов *REDD1* и дексаметазона (Dex) не снижает цитотоксический эффект и индукцию апоптоза, а комбинация Dex с LY294002 обладает синергическим действием. Все выбранные соединения проявляли способность подавлять как базальный, так и Dex-индуцированный уровень экспрессии *REDD1*, а также ингибировали функциональную активность GR. LY294002 подавлял рост ксенографтов лимфомы *in vivo*. Совместное введение LY294002 с Dex защищало кожу от Dex-индуцированной атрофии, а также снижало развитие остеопороза *in vivo*, нормализуя соотношение RANKL/OPG и повышая экспрессию Col1a2.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об эффективности ингибирования гена *REDD1*.
Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ
(грант № 17-75-20124).

Роль базальной и геминдуцированной экспрессии гемоксигеназы 1 в защите опухолевых клеток человека от окислительного стресса

Т.А. Сидорова, Э.Ш. Соломко, А.А. Прокофьева,
Д.А. Хоченков

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Молекулярной основой радио- и фотодинамической терапии, а также механизма действия ряда противоопухолевых химиопрепаратов является окислительный стресс (OS), индуцируемый в опухолевых клетках. Белок/фермент гемоксигеназа 1 (HO-1), молекулярный маркер OS, — ключевой участник механизма защиты и адаптации опухолевых клеток в условиях стресса.

В настоящем исследовании предстояло выяснить, зависит ли чувствительность опухолевых клеток к OS от базального и геминдуцированного уровней экспрессии HO-1.

В работе были использованы опухолевые клетки человека: меланомы линий A375, MeWo, Mel IL; НМРЛ линии A549. Базальный и препаратиндуцированный уровни экспрессии мРНК HO-1 изучали методом ОТ-ПЦР в реальном времени, индукцию OS в клетках оценивали методом проточной цитометрии, цитотоксичность препаратов — МТТ-методом. Гемин и апигенин использовали в качестве модуляторов экспрессии мРНК HO-1, H_2O_2 — для индукции OS в клетках.

По нашим данным, клетки исследуемых линий имели разный по величине базальный уровень экспрессии гена *HO-1*. С учетом величины экспрессии (в условных единицах (у. е.)) были выделены 2 типа опухолевых клеток: с высоким уровнем ($5-10 \times 10^{-3}$ у. е.) — клетки меланомы линии Mel IL и аденокарциномы линии A549; с низким уровнем ($<1 \times 10^{-3}$ у. е.) — клетки меланомы линий MeWo и A375. По нашим данным, чувствительность опухолевых клеток к H_2O_2 , индуктору OS, не зависела от базального уровня экспрессии гена *HO-1*. В присутствии апигенина (в субтоксической концентрации 40–50 мкМ) регистрировалось снижение базального уровня экспрессии мРНК HO-1 в среднем в 2 раза в клетках всех 4 линий. В этих же условиях цитотоксичность H_2O_2 увеличивалась для опухолевых клеток (в 2–4 раза), и эффект сенситизации коррелировал с увеличением внутриклеточной концентрации ROS в исходных клетках. По нашим данным, ур-регуляция экспрессии мРНК HO-1 гемом (50 мкМ)

наблюдалась только в клетках с исходно низким базальным уровнем экспрессии гена (MeWo и A375) и сопровождалась увеличением в 2–4 раза устойчивости клеток к H_2O_2 . Модуляция экспрессии мРНК HO-1 гемом в клетках MeWo и A375 не приводила к изменению базального уровня внутриклеточного ROS, что свидетельствует о ROS-независимом механизме защиты от токсичности H_2O_2 .

Таким образом, результаты нашего исследования позволяют рекомендовать природный флавоноид апигенин, модулятор экспрессии HO-1, для включения в схему ХТ и фотодинамической терапии опухолей в целях увеличения их эффективности (в частности меланом человека, как правило, исходно устойчивых к фотодинамической терапии).

Нокаут гена *PTPN11* в НК-клетках приводит к усилению CAR-зависимой цитотоксической активности

В.Г. Субракова^{1,2}, А.Н. Чикаев²

¹ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск;

²ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», Новосибирск

Клеточная иммунотерапия онкологических заболеваний представляет собой перспективный инструмент для элиминации опухолевых клеток в тех случаях, когда хирургическое удаление, ХТ, радио- и таргетная терапия не дают результата. В качестве эффекторов для клеточной иммунотерапии используют генетически модифицированные Т- или НК-лимфоциты человека. Генетическая модификация может заключаться в интеграции кассеты, кодирующей химерный антигенный рецептор (CAR) или секретируемый белок, либо может происходить удаление гена-негативного регулятора цитотоксической активности. Также оба способа могут сочетаться. Цитотоксическая активность НК-клеток может быть снижена, если клетка-мишень экспрессирует лиганды ингибирующих рецепторов в высокой плотности и сигналы от ингибирующих рецепторов на НК-клетках пересиливают сигналы от активирующих. Для того чтобы нивелировать действие сигналов от ингибирующих рецепторов, можно провести генетическое редактирование и удалить гены, кодирующие ингибирующие рецепторы. Этот путь показал свою эффективность для Т-лимфоцитов, которым свойственна экспрессия лишь нескольких разных ингибирующих рецепторов, однако для НК-клеток этот подход менее применим из-за значительно большего числа самых разнообразных ингибирующих рецепторов на их поверхности. Для решения этой проблемы мы предлагаем нокаутировать ген *PTPN11*, который кодирует белок SHP-2, являющийся ключевым звеном в передаче сигналов от большинства ингибирующих рецепторов.

Нами были созданы лентивирусные конструкции, кодирующие Cas9 и sgRNA, комплементарные двум кодирующим районам гена *PTNP11*. С применением этих конструкций была проведена трансдукция НК-клеточной линии YT, после чего клетки были моноклонированы, индивидуальные клоны анализировали на предмет наличия мутаций в гене *PTNP11*. Для 4 из проанализированных клонов были получены биаллельные мутации, которые предотвращают синтез функционального белка SHP-2. Цитотоксическую активность нокаутных YT-клеток изучали в контексте экспрессии простатического специфического мембранного антигена (PSMA) CAR на мишенях аденокарциномы предстательной железы Du145-PSMA с помощью платформы RTCA iCELLigence. В качестве контролей использовали клетки YT дикого типа, а также клетки CAR-YT без мутаций в гене *PTNP11*. Обнаружено достоверное увеличение цитотоксической активности клеток CAR-YT, нокаутных по гену *PTNP11*, по сравнению с клетками CAR-YT немутантного фенотипа.

Таким образом, нокаут гена *PTNP11* приводит к увеличению CAR-зависимой цитотоксичности, что может быть использовано для создания более эффективных терапевтических НК-клеточных линий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1246 (RFMEFI60417X0169)).

Изучение механизма противоопухолевого действия антибиотика гелиомицин

А.С. Тихомиров^{1,2}, Г.Я. Надывесов^{1,2}, Р.Л. Chueh³,
А.Е. Щекотихин^{1,2}

¹ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

²ФГБОУ ВО «РХТУ им. Д.И. Менделеева», Москва;

³National Chung Hsing University, Taiwan

Гелиомицин (резистомицин), относящийся к классу поликетидных антибиотиков, обладает широким спектром биологической активности. Несмотря на то что высокая антипролиферативная активность гелиомицина была открыта почти 20 лет назад, механизм ингибирования опухолевого роста этим антибиотиком остается неизученным. К настоящему моменту в литературе имеются сведения лишь о связывании гелиомицина с ДНК ($K_b = 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (R. Vijayabharathia et al. Spectrochim. Acta A 2012;89:294.), а также о способности в высоких концентрациях ингибировать гистондеацетилазу HDAC1 ($IC_{50} \sim 100 \text{ мкМ}$) (M.S. Abdelfattah et al. 3 Biotech 2018;8:282.).

Нами обнаружено, что гелиомицин блокирует рост широкой панели опухолевых клеток, включающей линии с множественной лекарственной устойчивостью,

демонстрируя значения IC_{50} , близкие к таковым у доксорубина (0,1–0,5 мкМ). Показано, что, несмотря на планарную полициклическую структуру, присущую многим интеркаляторам, гелиомицин слабо связывается с дуплексом ДНК и не оказывает влияния на активность топоизомеразы I. Обработка клеток рака мочевого пузыря T24 гелиомицином не вызывает генерации АФК, а также не индуцирует апоптоз опухолевых клеток. Анализ маркеров апоптоза методом вестерн-блоттинга показал, что гелиомицин незначительно увеличивает общую экспрессию p53. Анализ клеточного цикла показал, что гелиомицин вызывает «арест» опухолевых клеток в фазе G₁. Кроме этого, отсутствие изменений в расщеплении Bak, Bcl-2 и PARP подтверждает неапоптотический каспазозависимый механизм гибели клеток T24.

Таким образом, высокая антипролиферативная активность гелиомицина, способность преодолевать механизмы множественной лекарственной устойчивости и оригинальный путь индукции клеточной гибели свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований противоопухолевых свойств и механизма действия гелиомицина и разработки на его основе новых лекарственных средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и МНТ (проект № 19-53-52008).

Количественная оценка взаимодействия доминантно-негативного белка ОтоМус с белками МАХ и с-Мус

А.В. Уласов¹, Ю.В. Храмцов¹, Т.Н. Лупанова¹,
А.А. Розенкранц^{1,2}, А.С. Соболев^{1,2}

¹ФГБНУ «Институт биологии гена РАН», Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Транскрипционный фактор Мус участвует в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки, метаболизма, ангиогенеза и апоптоза. Повышенная экспрессия Мус наблюдается в значительной части опухолей. Для связывания с регуляторным элементом E-box генов-мишеней Мус необходимо образовать димер с белком МАХ. Нарушение взаимодействия с-Мус с МАХ является одной из основных стратегий при разработке подходов, нацеленных на подавление активности с-Мус. Применение низкомолекулярных соединений для этой цели затруднено из-за большой площади белок-белковых взаимодействий и отсутствия карманов, куда бы такая молекула могла встроиться. Использование белковых молекул, например фрагментов антител, пептидов, лишено этих ограничений, однако требует проработки способов доставки в клетки. Ранее был описан доминантно-негативный вариант ОтоМус, созданный на основе bHLHZip домена с-Мус с 4 аминокислотными заменами, изменяющими его

специфичность димеризации, позволяя ОмоМус образовывать гетеродимеры как с МАХ, так и с-Мус, снижая тем самым количество транскрипционно активного Мус.

Поскольку практическое использование ОмоМус требует создания подходов по его специфичной доставке в клетки-мишени, в настоящей работе были созданы варианты слитых конструкций ОмоМус с модульным нанотранспортером (МНТ), нацеленным на клетки со сверхэкспрессией EGFR. МНТ представляет собой рекомбинантный белок, позволяющий распознавать и интернализироваться в клетки-мишени, выходить из эндосом и достигать клеточного ядра вместе с доставляемой эффекторной частью. Последовательность ОмоМус была получена мутагенезом на основе Addgene plasmid #37608 и заклонирована на С-конец МНТ. МНТ-ОмоМус был наработан в *Escherichia coli*, выделен с помощью Ni-NTA аффинной хроматографии и очищен гель-фильтрацией на колонке Superdex 200. Для проверки сохранения функциональности ОмоМус в составе МНТ-ОмоМус было изучено связывание с с-Мус и МАХ методом терморефореза. Для этой цели были получены рекомбинантные белки EGFP-Мус и EGFP-МАХ. Результаты проведенных экспериментов показали, что ОмоМус в составе МНТ-ОмоМус сохраняет способность связываться с с-Мус и МАХ, при этом K_d EGFP-Мус с МНТ-ОмоМус оказалась в несколько раз выше (58 ± 5 нМ), чем для комплекса с EGFP-МАХ ($9,4 \pm 0,6$ нМ), что согласуется с опубликованными в 2019 г. данными о преимущественной гетеродимеризации ОмоМус с МАХ в клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-14-01304).

Глутатионовая система плазмы крови после хирургической резекции и платиносодержащей химиотерапии больных колоректальным раком

А.Ю. Федотова¹, Н.С. Хирдина^{1,2}, И.Р. Мягдиева¹,
И.И. Антонеева^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»,
Ульяновск;

²ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер»,
Ульяновск

Введение. КРР считается основной причиной смертности во всем мире (К.С. Kadakia и соавт., 2019). После хирургической резекции стандартом лечения является платиносодержащая ХТ (FOLFOX и XELOX). Глутатионовая система, включающая восстановленный глутатион и ассоциированные ферменты, обеспечивает адаптивный антиоксидантный ответ — один из факторов формирования лекарственной устойчивости опухолевых клеток (R.E. Ozols, 2000).

Цель исследования — оценка параметров глутатионовой системы в плазме крови больных КРР до и после хирургической резекции и ХТ по схеме FOLFOX.

Материалы и методы. В плазме крови 10 больных КРР II стадии (Т3N0M0) и 7 больных КРР III стадии (Т3N1M0) определяли уровни (ммоль/г белка) глутатион-S'-трансферазы (GST), глутатионпероксидазы (GPO), глутатионредуктазы (GR) и глутатиона (GSH) (А.И. Карпищенко, 2013). Средний возраст пациентов составил $61,5 \pm 2,3$ года. Контрольную группу составили практически здоровые пациенты ($n = 25$) в возрасте 22–45 лет. При сравнении полученных данных использовали непараметрический критерий Манна — Уитни ($p \leq 0,05$).

Результаты. Установлено значимое повышение в плазме крови первичных больных КРР уровней GR ($0,204 \pm 0,16$ ммоль/г при II стадии и $0,144 \pm 0,011$ ммоль/г при III стадии против $0,075 \pm 0,008$ ммоль/г в группе контроля; $p_{1,2} = 0,001$) и GPO ($13,094 \pm 1,629$ ммоль/г при II стадии и $13,367 \pm 0,455$ ммоль/г при III стадии против $9,059 \pm 0,529$ ммоль/г в группе контроля; $p_1 = 0,009$, $p_2 = 0,001$). При этом у пациентов с III стадией также оказался повышенным уровень GSH ($0,129 \pm 0,012$ ммоль/г против $0,084 \pm 0,003$ ммоль/г; $p = 0,001$). Хирургическая резекция значимо снижала уровень GST у пациентов со II стадией ($0,273 \pm 0,006$ ммоль/г против $0,301 \pm 0,031$ ммоль/г; $p = 0,001$) и III стадией КРР ($0,266 \pm 0,012$ ммоль/г против $0,298 \pm 0,010$ ммоль/г; $p = 0,003$), а ХТ значимо повышала его уровень ($0,294 \pm 0,012$ ммоль/г; $p = 0,023$ и $0,303 \pm 0,019$ ммоль/г; $p = 0,003$ соответственно).

Заключение. Таким образом, в плазме крови пациентов с II и III стадиями КРР повышалась активность ферментов глутатионовой системы по сравнению с аналогичными параметрами в группе контроля. При этом ХТ по схеме FOLFOX сопровождалась дальнейшим повышением активности, более выраженным на III стадии заболевания.

Действие экстракта каштана конского на пролиферацию опухолевых клеток и изолированные митохондрии

Т.А. Федотчева^{1,2}, А.И. Радимич²

¹ФГБОУ ВО «РНМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

²ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных
и ароматических растений», Москва

Экстракты каштана конского (ЭКК), содержащие эсцин, широко используются как венотонизирующие средства, механизм действия которых не изучен. Впервые из семян каштана конского получен сухой ЭКК с содержанием эсцина более 50 %, подлинность которого подтверждена методом ядерно-магнитного

резонанса. ЭКК и тритерпеновый сапонин эсцин обладают дозозависимым цитотоксическим действием на клетки РШМ человека. Показано, что эсцин в концентрации 30 мкг/мл подавляет жизнеспособность опухолевых клеток на 85 %, а ЭКК в той же концентрации подавляет их жизнеспособность на 83 %, несмотря на то что содержит только 50 % эсцина. При уменьшении концентрации в 4 раза цитотоксический эффект не наблюдается.

Установлено, что на изолированных митохондриях печени крыс эсцин в зависимости от концентрации снижает мембранный потенциал, активирует индукцию митохондриальной поры (МРТР) ионами кальция, снижает скорость транспорта ионов кальция в митохондрии. Специфическое регуляторное действие эсцина и ЭКК на МРТР, проявляющееся в увеличении проницаемости мембраны митохондрий и индукции поры при увеличении их концентрации: быстрое, обратимое для ЭКК и медленное, необратимое для эсцина. Влияние эсцина и ЭКК на клеточную гибель опосредовано транспортом ионов кальция в митохондрии. Для подтверждения специфического действия эсцина и ЭКК на набухание митохондрий было изучено влияние ингибитора МРТР циклоспорина на их эффекты. Показано, что циклоспорин полностью устраняет действие эсцина и ЭКК. Тот факт, что действие эсцина и ЭКК снимается циклоспорином, свидетельствует о том, что как эсцин, так и ЭКК являются специфическими регуляторами МРТР и транспорта ионов кальция в митохондрии, влияя на клеточную гибель и кальцийзависимые сигнальные пути.

Состав и противоопухолевая активность фуранохинолизидиновых алкалоидов препарата лютенурина из кубышки желтой (*Nuphar lutea* L. Smith.)

Т.А. Федотчева, О.П. Шейченко, В.И. Шейченко, О.Н. Толкачев

ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», Москва

Во Всероссийском НИИ лекарственных и ароматических растений физико-химическими и спектральными методами исследования изучен алкалоидный состав произрастающей на территории Евразии кубышки желтой (*Nuphar lutea* L. Smith), которая представляет большой интерес как источник физиологически активных димерных серосодержащих фуранохинолизидиновых алкалоидов (ДФХА) с гидроксильными группами: нуфлеина 6,6'-дигидрокси-тиобинуфаридина, $C_{30}H_{42}N_2O_4S$ (I) и другие ДФХА. Разработанный в институте антимикробный препарат лютенурин представляет собой сумму солей нуфлеина

бисангидродихлорида $C_{30}H_{42}N_2O_4SCl_2$ (II) и других ДФХА. В процессе исследования показано, что эти алкалоиды обладают противоопухолевой активностью. Ранее было установлено, что активным компонентом является соль доминантного алкалоида нуфлеина, для которого была установлена структура, содержащая активный виниламмониевый хромофор, обладающий электрофильными свойствами.

Установлено также, что II, преобладающий среди ДФХА с иммониевыми фрагментами, обладает высоким цитотоксическим действием на опухолевые клетки РШМ, на 2 порядка превышающим активность препарата цисплатин. Разработана технология получения фармацевтической субстанции лютенурина, использующая ортофосфорную кислоту на стадии твердофазной экстракции (головная стадия технологического процесса), позволяющей извлекать стереоизомерные фуранохинолизидиновые алкалоиды с преобладанием соединений с двумя иммониевыми группами. В спектрофотометрическом методе количественного определения суммы фуранохинолизидиновых алкалоидов (в ультрафиолетовом спектре) в максимум поглощения 293 нм вносят вклад все алкалоиды с иммониевым фрагментом ($S-CH=N^+$).

Применение АТФ-теста при анализе хемочувствительности клеток сарком мягких тканей *ex vivo*

Т.И. Фетисов¹, Е.Е. Антошина¹, Л.С. Труханова¹, Т.Г. Горькова¹, Л.Я. Фомина¹, Б.Ю. Бохян¹, М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,2}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Саркома мягких тканей (СМТ) — разнообразная группа заболеваний, включающая более 30 морфологических типов опухолей. В гистологическом отношении они имеют мезенхимальное и нейроэктодермальное происхождение и растут в большинстве случаев из мезодермальных тканей конечностей и туловища. Несмотря на значительное расширение спектра ХТ- и таргетных препаратов в онкологической практике за последние годы, эффективность лекарственной терапии СМТ остается невысокой. Такая ситуация связана прежде всего с низкой эффективностью прогноза на основе молекулярно-генетических данных и отсутствием тестов экспериментального определения чувствительности СМТ к противоопухолевым агентам *in vitro* для персонализированного выбора курса ХТ. В течение последних 2 десятилетий появилось большое количество новых методов для определения хемочувствительности опухолей до начала курса ХТ, которые смогут преодолеть основные технические ограничения данного анализа, такие как низкая эффективность

и плохая воспроизводимость. Одним из перспективных на сегодняшний день является АТФ-тест, который позволяет определять эффективность действия ХТ-препаратов *in vitro*. Данный тест исследован в отношении различных типов солидных опухолей: РМЖ, РЯ, рак желудочно-кишечного тракта и др.

Цель исследования — разработка методики получения переживающих культур при работе с СМТ и оценка чувствительности опухолевых клеток к генотоксическим препаратам и их комбинациям методом высокочувствительного биoluminesцентного анализа на жизнеспособность по уровню АТФ.

В результате выполненной работы от отделения общей онкологии НИИ клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина было получено 84 образца СМТ. Среди них большая часть случаев приходилась на плеоморфные саркомы. Проведена оптимизация методики получения переживающих культур при работе с СМТ и протокола оценки чувствительности опухолевых клеток к генотоксическим препаратам с использованием высокочувствительной АТФ-люминометрии. С применением данных методик было проведено тестирование хемирезистентности переживающих культур, полученных от 41 пациента, к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину и их комбинациям. Параллельно с анализом хемирезистентности был выполнен цитологический анализ состава популяции клеток после культивирования в подобранных нами условиях, который подтвердил, что доля опухолевых клеток практически во всех получаемых суспензиях превышает 90 %.

В настоящий момент проводится сопоставление полученных нами данных с клиническим ответом пациентов на ХТ. В дальнейшем эти данные могут послужить основой для создания наборов реактивов для экспериментального тестирования хемирезистентности опухоли к ХТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09095мк).

Влияние циклофилина А на Т-клеточное звено иммунитета

Л.М. Хромых, А.А. Калинина, Д.Б. Казанский
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Циклофилин А (ЦФА) — консервативный многофункциональный белок (18 кДа), обладающий изомерной активностью и не проявляющий видовой специфичности у человека и мыши. Данный белок является хемоаттрактантом для клеток врожденного и адаптивного иммунитета, провоспалительным фактором и хорошо изучен в качестве фактора патогенеза многих заболеваний. Вместе с тем ЦФА принимает участие в формировании иммунного ответа в норме, с этой точки зрения данный белок малоизучен.

Цель исследования — изучение механизмов взаимодействия ЦФА с Т-лимфоцитами здорового организма.

Работу проводили на мышах F1 (СВА/Лас х С57BL/6) с использованием рекомбинантного ЦФА человека (рЧЦФА). Действие рЧЦФА оценивали по изменению уровня пролиферации и экспрессии поверхностных активационных маркеров Т-клеток и молекулы CD147 — основного рецептора ЦФА.

Было показано, что курсовое подкожное введение рЧЦФА (3,0 мг/мышь, 7 дней) ведет к увеличению относительного содержания Т-эффекторов (CD8⁺CD62L⁺CD44⁺) в крови обработанных мышей, что свидетельствует о хемоаттрактивном действии рЧЦФА в отношении данной субпопуляции клеток. Курсовое введение рЧЦФА (0,1–3,0 мг/мышь) приводило к дозозависимой активации Т-лимфоцитов *in vivo*. Инкубация *ex vivo* клеток селезенки обработанных мышей с конканавалином А (Кона, 4,0 мкг/мл) или рЧЦФА приводила к ингибции пролиферации данных клеток, что являлось отражением их избыточной активации. Данный эффект также имел место при регистрации угнетения иммунного ответа в реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей после курсового введения рЧЦФА.

Результаты проведенных экспериментов *in vitro* показали, что рЧЦФА не оказывал влияния на интактные Т-клетки, но значительно усиливал пролиферацию преактивированных Т-лимфоцитов (2 ч в присутствии Кона, 4,0 или 12 мкг/мл). Синергические активирующие действия Кона и исследуемого белка указывают на функции рЧЦФА как неспецифического дополнительного активатора Т-клеток и регулятора эффекторной фазы иммунного ответа. Комитогенное и костимуляторное действие рЧЦФА в отношении активированных Т-клеток реализовывалось посредством взаимодействия с рецептором CD147. При избыточной активации Т-лимфоцитов под действием рЧЦФА наблюдались уменьшение их пролиферативной активности и снижение экспрессии CD147. Таким образом, рЧЦФА является не только стимулятором, но и регулятором иммунного ответа.

Механизм воздействия циклофилина А на В-лимфоциты при формировании иммунного ответа в норме

Л.М. Хромых, А.А. Калинина, Д.Б. Казанский
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Циклофилин А (ЦФА) — древний консервативный белок (18 кДа), обладающий изомерной активностью и имеющий практически полную гомологию у человека и мыши. Данный белок существует во внутриклеточной и секреторной формах, способствует дифференцировке, созреванию и представлению антигена

дендритными клетками, является хемоаттрактантом для стволовых клеток и предшественников различных ростков дифференцировки, а также для зрелых клеток врожденного и адаптивного иммунитета (макрофагов, гранулоцитов, активированных Т-лимфоцитов). ЦФА является провоспалительным фактором, привлекающим клетки иммунной системы к месту локализации инфекции или другого антигена и формирующим очаг воспаления, участвует в патогенезе многих заболеваний. В настоящее время роль ЦФА в формировании иммунного ответа в норме слабоизучена.

Цель исследования — изучение механизмов взаимодействия ЦФА с В-лимфоцитами здорового организма.

Работу проводили на мышах F1 (CBA/Lac x C57BL/6) с использованием рекомбинантного ЦФА человека (рчЦФА).

Было показано, что курсовое подкожное введение рчЦФА (0,1; 1,0 и 3,0 мг/мышь, 7 дней) ведет к увеличению относительного содержания активированных В-лимфоцитов (B220⁺CD69⁺) в крови обработанных животных, а также к усилению гуморального иммунного ответа на модельный антиген (эритроциты барана). В опытах *in vitro* было показано, что рчЦФА в дозах 10–50 мкг/мл стимулирует активацию В-лимфоцитов (B220⁺CD19⁺) с исходным низким уровнем экспрессии активационных маркеров CD69 и CD86. Вместе с тем рчЦФА в этих же дозах способен регулировать эффекторные функции В-клеток, демонстрирующих высокий уровень экспрессии CD69 и CD86, посредством усиления их пролиферации и снижения экспрессии активационных маркеров на поверхности этих клеток. Данные эффекты не имели корреляции с уровнем экспрессии рецептора ЦФА (CD147) на поверхности этих клеток.

Таким образом, было установлено, что ЦФА является не только стимулятором, но и регулятором В-клеточного звена иммунного ответа в норме, выступая в роли бифазного модулятора функциональной активности В-лимфоцитов.

CRISPR/Cas9-опосредованный мутагенез для создания противоопухолевых НК-клеточных продуктов нового поколения

А.Н. Чикаев

ФГУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», Новосибирск

Применение геномного редактирования для получения клеточных продуктов с заданными свойствами является привлекательным биотехнологическим подходом. Поиск генов, снижение или увеличение активности которых может обеспечить требуемые изменения фенотипа, позволяет находить неизвестные

регуляторные модули интересующих процессов, что открывает широкие возможности для конструирования клеток с нужным профилем активности. НК-клеточные продукты на основе линий человеческих НК-клеток NK-92, KHYG-1 и YT все более активно тестируются в доклинических и клинических испытаниях в качестве противоопухолевых средств терапии. Так, генетическая модификация данных клеток за счет введения кассет, кодирующих химерные антигенные рецепторы (CAR), Fc-рецепторы, антитела или цитокины, позволяет повысить их противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo*. Однако очевидно, что для проявления НК-клетками специфической цитотоксичности активность многих генов не является необходимой, более того, ее уровень может напрямую модулироваться внутриклеточными белками-регуляторами пути передачи сигнала. В литературе описаны эксперименты, в которых нокаутирование уже известных негативных генов-регуляторов приводит к повышению активности НК-клеток человека и мыши.

Мы задались целью выявить новые гены, удаление или снижение активности которых позволит «усилить» цитотоксичность НК-клеток линии YT. Для этого была использована CRISPR/Cas9 делеционная библиотека GeCKO v2, созданная на основе лентивирусного вектора и состоящая из 2 суббиблиотек — А и В, каждая из которых кодирует по 3 гидовые РНК к большинству генов-мишеней человека. Библиотека была реамплифицирована и переведена в лентивирусный формат. Псевдовиральные частицы, соответствующие суббиблиотекам А и В, были использованы для трансдукции клеток CAR-YT, экспрессирующих CAR 2-го поколения, против поверхностного маркера клеток РПЖ простатического специфического мембранного антигена (PSMA). Полученные суббиблиотеки GeCKO-A и GeCKO-B затем коинкубировали с PSMA-положительными клетками-мишенями линии PC3-PSMA. После окраски полученных клеток антителами к маркеру дегрануляции НК-клеток CD107a из каждой суббиблиотеки был проведен сортирование 1000 клеток CAR-YT с максимальным уровнем флуоресценции. Такие клетки, потенциально несущие мутации в генах-негативных регуляторах цитотоксичности НК, были пассированы и подвергнуты еще 2 раундам скрининга. На каждом этапе из суббиблиотек брались аликвоты, анализ представленности sgРНК в которых был проведен посредством секвенирования нового поколения. В итоге были сформированы списки генов-кандидатов, по которым наблюдалось обогащение в одной или обеих суббиблиотеках, и их валидация проводится в настоящее время.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2019-1246, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0169).

Разработка липосом на основе экстракта пыльцы финиковой пальмы для экспериментальной противоопухолевой химиотерапии

В.И. Шляпкина, О.А. Куликов, В.П. Агеев, Д.С. Сокушев,
Мут Вакел, В.И. Инчина

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск

Введение. Изучение спектра фармакологической активности пыльцы финика пальчатого описано в различных источниках. Как показали результаты исследований, терапевтический потенциал пыльцы содержит противовоспалительный, антиоксидантный, противоопухолевый и другие эффекты.

Цель исследования — разработка липосомальной лекарственной формы на основе экстракта пыльцы финиковой пальмы с тропностью к опухолевой ткани.

Материалы и методы. Образец пыльцы (около 10 г) был взят на территории Республики Судан в середине фазы цветения пальмы *Phoenix dactylifera*. Пыльца была подвергнута качественному анализу для установления подлинности и химического состава. Были проведены микроскопия образца пыльцы, тонкослойная хроматография хлороформного экстракта, спектрофотометрия и ВЭЖХ экстракта при различных длинах волн (210–400 нм), рамановская спектроскопия пыльцы и экстракта, инфракрасная спектроскопия экстракта.

Полученный экстракт пыльцы был включен в состав липидной пленки при изготовлении простых липосом, содержащих доксорубицин в концентрации 1 мг/мл.

Полученные липосомы вводили внутривенно в хвостовую вену крысам-самкам линии Vistar с аденокарциномой молочной железы Walker-256 на 9-е сутки от момента перевивки опухоли. Для сравнительной оценки проводилась терапия сравнения доксорубицином в аналогичной дозе. Доза доксорубицина для крыс составила 4 мг/кг, а число животных в группах было равно 10. Суспензию опухолевых клеток вводили в область левого бедра внутримышечно. Размер опухолевого узла на месте введения измеряли, начиная с 5-х суток от момента перевивки опухоли до 21-го дня. Отдельную группу составили крысы без терапии.

Результаты. Анализы экстракта пыльцы показали наличие флавоноидов, фитостероидов, сапонинов, органических кислот и большого количества монотерпенов и смолистых соединений. Размер полученных липосом составил около 200 нм. К 21-м суткам летальность среди животных после введения липосом и доксорубицина составила 40 и 50 % соответственно. В группе без лечения летальность была наибольшей — около 70 %. Темп роста опухолевого узла был наиболее медленным в группе с введением липосом. На 21-е сутки средний объем опухолевого узла у крыс, получивших липосомы, был достоверно меньше по сравнению с группой крыс после введения доксорубицина и группой без лечения. Интересным является тот факт, что в группе с введением липосом 1 особь не была забита на 21-е сутки, так как имела выраженную отрицательную динамику роста опухоли и полную редукцию опухолевого узла к 40-му дню от момента перевивки.

Заключение. Полученные данные говорят о перспективности исследования растительного сырья, содержащего субстанции с гормональной активностью для создания средств терапии форм рака, проявляющих гормональнозависимый рост.