

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

«Молекулярная онкология: итоги и перспективы»

16–17 декабря 2015 г., Москва

MATERIALS OF THE CONFERENCE

“Molecular Oncology: Results and Prospects”

Moscow, 16–17 December 2015

Секция I

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Использование компьютерной модели регуляторки щитовидной железы в изучении механизмов клеточной гибели и злокачественного роста клеток фолликула

А.А. Абдувалиев¹, М.С. Гильдиева²,
М. Сайдалиева³, М.Б. Хидирова³

¹Ташкентская медицинская академия,
Республика Узбекистан;

²Республиканский онкологический научный центр Минздрава
Республики Узбекистан, Ташкент;

³Центр разработки программных продуктов и аппаратно-
программных комплексов при Ташкентском университете
информационных технологий, Республика Узбекистан

В работе рассматриваются некоторые результаты анализа клеточных механизмов функционирования фолликула щитовидной железы (ФСЖ) методами математического и компьютерного моделирования. Эти исследования направлены на определение основных закономерностей возникновения, развития и установления различных форм злокачественных новообразований, а также на выявление эффективных мер профилактики и возможных путей управления раковым процессом в организме.

Математическое моделирование клеточных процессов ФСЖ осуществляется на основе твердо установленных биологических закономерностей относительно механизмов управления функционированием клеточных сообществ, кооперативного характера биологических процессов, эффекта ингибирования конечным продуктом и особенностей комбинированной обратной связи жизненных явлений. В качестве класса математических уравнений для количественного анализа закономерностей функционирования клеточной системы ФСЖ использованы функционально-дифференциальные уравнения регуляторки

функциональной единицы клеточных сообществ многоклеточных организмов.

Существующие медико-биологические экспериментальные данные и теоретические положения о структурно-функциональной организации щитовидной железы на клеточном уровне позволяют строить математические модели для количественного анализа регуляторки численности клеточного сообщества ФСЖ в норме и при патологиях на основе метода моделирования регуляторных механизмов живых систем и уравнений регуляторки клеточных сообществ. Наши модельные исследования показали, что хронический рост значения параметра размножения приводит к аномальному поведению численности клеточного сообщества ФСЖ: нарушается стационарное состояние, возникают автоколебания с переходом к нерегулярным колебаниям с непредсказуемым размножением клеток ФСЖ и далее — к эффекту «черной дыры», т. е. резкому срыву колебательных решений. Нерегулярные колебания и «черная дыра» идентифицируются неконтролируемым размножением и резким деструктивным изменением численности клеток ФСЖ.

Работа поддержана Комитетом по координации развития науки и технологий при Кабинете министров Республики Узбекистан (грант № F4-FA-F006).

Перспективы фармакологической регуляции mTOR и IGF-1 для профилактики преждевременного старения и рака

В.Н. Анисимов

ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, пос. Песочный

Диетические вмешательства, имитирующие хроническое ограничение калорийности питания, в настоящее время рассматриваются как наиболее пер-

спективные средства для применения в клинической практике в качестве геропротекторов. К ним относятся препараты, угнетающие передачу сигналов в системах гормон роста — инсулин — инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) — глюкоза, а также в системе, опосредованной белком-мишенью рапамицина (mTOR) млекопитающих и S6-киназой; препараты, активирующие аденозинмонофосфат-зависимую киназу (AMPK) или специфические белки семейства сиртуинов. Протеинкиназа mTOR играет ключевую роль в регуляции роста и клеточного деления у эукариот при воздействии нутриентов (аминокислот, глюкозы, жирных кислот) и митогенов (IGF-1 и инсулина); стимулирует рост клеток, вызывает их гипертрофию, активирует HIF-1-зависимую транскрипцию, включая транскрипцию VEGF и COX-1, активирует секрецию PAI-1, VEGF, IGF-1, FGF, MMP и других биоактивных молекул. Активация mTOR — необходимое условие для достижения клетками состояния старения (cell senescence). Торможение или полная блокада mTOR, достигаемая с помощью генетических модификаций, сопровождается увеличением продолжительности жизни у дрожжей, нематод, плодовых мушек и мышей. Предполагают, что mTOR является ключевым звеном в реализации увеличивающего продолжительность жизни действия диеты с ограниченной калорийностью у различных видов живых организмов (от дрожжей до обезьяны). Как было показано в 65 экспериментах на лабораторных животных, миметики диеты с ограниченной калорийностью — антидиабетические бигуаниды (фенформин, буформин и метформин) — в 86 % случаев тормозили развитие спонтанных и индуцируемых различными агентами опухолей у грызунов. Антиканцерогенный эффект бигуанидов был выявлен в отношении общей частоты опухолей и новообразований в 17 тканях-мишенях при использовании 17 линий мышей (аутбредных, линейных, трансгенных, нокаутных), 4 линий крыс и 1 линии хомячков, 16 химических канцерогенов прямого и непрямого действия различных классов (полициклических ароматических углеводородов, нитрозосоединений, эстрогенов), ионизирующей радиации, вирусов, специальной высокожировой диеты при различных протоколах их воздействия, включая двухстадийную модель канцерогенеза, при разных дозах, режимах и способах введения бигуанидов (с кормом, с питьевой водой, зондированием, инъекционно) и начале их введения в разном возрасте. В 14 % случаев бигуаниды не оказали антиканцерогенного эффекта. Стимуляция канцерогенеза бигуанидами не наблюдалась ни в одной модели. Таким образом, имеются существенные доказательства способности метформина и других антидиабетических бигуанидов предупреждать развитие опухолей. Введение антибиотика рапамицина, угнетающего активность протеинкиназы mTOR, а также генетические модификации, выключающие ее активность, оказывали антиканцерогенный и геропротекторный эффект

у грызунов. В последние годы установлено, что применение метформина на 25–40 % снижает риск злокачественных новообразований многих локализаций и увеличивает продолжительность жизни у больных сахарным диабетом 2-го типа. В настоящее время идут и планируются новые клинические испытания геропротекторной активности метформина у лиц без диабета.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ) (гранты № 14-04-01653/14 и № 15-04-50841).

Клеточная линия HeLa-TI как потенциальная система скрининга ксенобиотиков на эпигенетическую активность

**А.Ю. Бейзер^{1,2}, И.А. Хитрово¹, Л.Р. Тилова¹,
Е.А. Лесовая^{1,3}, А.Ю. Портянникова¹, Г.А. Белицкий¹,
М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов¹**

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова»;

³ГБОУ ВПО «Рязанский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России

В настоящее время эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов рассматриваются в качестве связующего звена между окружающей средой и геномом. Изменение эпигенетического статуса клетки при воздействии факторов окружающей среды может нарушить основные клеточные процессы и привести в конечном счете к неопластической трансформации и развитию опухоли. В качестве экзогенных агентов, способных оказывать влияние на основные компоненты системы эпигенетической регуляции транскрипции генов, могут выступать как различные компоненты питания и фармакологические препараты, так и экологические факторы. Ранее нашим отделом впервые был предложен метод скрининга эпигенетически активных соединений на модельной системе клеток человека (HeLa), несущих ретровирусный геном с интегрированным в него эпигенетически репрессированным флуоресцентным белком GFP.

Основной целью данной работы являлось исследование возможности использования данной модельной системы для изучения эпигенетических эффектов ксенобиотиков, подвергающихся в организме метаболической активации.

Для оценки состояния ферментативной системы метаболизма ксенобиотиков в клетках линии HeLa-TI были проведены: 1) исследование конститутивного и индуцированного уровней экспрессии мРНК основных изоформ цитохрома P450; 2) оценка генотоксического эффекта ряда проканцерогенных веществ на

клетки HeLa-TI; 3) изучение динамики метаболизма проканцерогенного бенз(а)пирена в клетках HeLa-TI.

С использованием спектрально-флуоресцентного метода мы продемонстрировали, что остаточное количество бенз(а)пирена в среде было обратно пропорционально плотности посадки клеток и времени инкубации. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени была показана конститутивная экспрессия целого ряда изоформ цитохрома P450 в клетках HeLa-TI, а также повышение уровня мРНК данных ферментов под действием соответствующих индукторов микросомных монооксигеназ. Генотоксический эффект циклофосамида, 3-метилхолантрена, бенз(а)пирена и *орто*-аминоазотолуола, выявленный при помощи метода ДНК-комет, свидетельствовал о функциональной активности микросомных монооксигеназ.

Полученные данные говорят о наличии в клетках линии HeLa-TI активной системы метаболизма проканцерогенов, что позволяет использовать данную клеточную линию при изучении эффектов ксенобиотиков без применения внешних метаболических смесей (например, микросомальной фракции печени крыс S9).

Производные этил-2-амино-пиррол-3-карбоновой кислоты влияют на полимеризацию тубулина, индуцируют арест опухолевых клеток в G2/M-фазе клеточного цикла и ингибируют их пролиферацию *in vitro*

А.Р. Галембикова¹, С.С. Зыкова², С.В. Бойчук¹,
Б.Р. Рамазанов¹, Р.Р. Хуснутдинов¹

¹ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России;

²ФКОУ ВПО «Пермский институт Федеральной службы исполнения наказаний России»

Исследована активность 27 соединений, относящихся к производным этил-2-амино-пиррол-3-карбоновой кислоты (АПК). Цитотоксическую активность АПК оценивали МТС-тестом на различных опухолевых клеточных линиях: лейомиосаркома SK-LMS-1, рабдомиосаркома RD, гастроинтестинальная стромальная опухоль GIST T-1, остеосаркома U-2 OS, а также саркома Юинга A673.

Обнаружено, что 2 соединения, именуемые в дальнейшем АПК-20 и АПК-24, существенно снижали жизнеспособность клеток различных типов сарком мягких тканей, остеосарком, а также гастроинтестинальных стромальных опухолей *in vitro*. Цитотоксическое действие АПК-20 и АПК-24 было время- и дозозависимым.

Результаты иммуноблоттинга свидетельствовали о том, что под влиянием АПК в опухолевых клетках

происходило повышение экспрессии гистона H2AX, фосфорилированного по Ser139. Тем не менее данное изменение не сопровождалось активацией ATM- и ATR-опосредованных путей активации. Эффект АПК был обусловлен исключительно активацией сигнального пути DNA-PK и Chk2-опосредованным механизмом фосфорилирования H2AX в M-фазе клеточного цикла.

Результаты проточной цитометрии подтвердили накопление опухолевых клеток в G2/M-фазе клеточного цикла, а увеличение количества pH3 (Ser10)-позитивных клеток (по данным проточной цитометрии и иммунофлуоресцентной микроскопии) после воздействия АПК свидетельствовало об их накоплении в M-фазе.

Для изучения влияния АПК на динамическое состояние микротрубочек был проведен тест на полимеризацию тубулина *in vitro*, показавший способность АПК-20 и АПК-24 дозозависимо ингибировать процесс полимеризации тубулина.

Результатом воздействия АПК на опухолевые клетки явилось усиление их гибели по механизму апоптоза, о чем свидетельствовало значительное время- и дозозависимое повышение уровня экспрессии расщепленных форм каспазы-3 и поли-(аденозиндифосфатрибоза)-полимеразы по сравнению с контролем.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-04-00255).

Влияние постоянного освещения и мелатонина на уровень синтеза часового белка CRY1 в опухолях кожи у мышей SHR

Е.А. Губарева¹, А.В. Панченко¹, М.А. Майдин¹,
И.А. Виноградова²

¹ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, пос. Песочный;

²ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

Актуальность. Нарушение суточных ритмов увеличивает риск развития опухолей различных локализаций. Освещение ночью блокирует синтез мелатонина, гормона эпифиза, синхронизирующего ритмы периферических осцилляторов с центральным. За поддержание циркадианных ритмов на клеточном уровне отвечает система часовых генов и белков, экспрессия которых изменяется при канцерогенезе. Влияние постоянного освещения и введения экзогенного мелатонина на экспрессию часовых генов в опухолях и нормальных периферических тканях мало изучено.

Целью исследования было изучение влияния постоянного освещения и мелатонина на уровень синтеза часового белка CRY1 в нормальной коже и опухолевой ткани.

Материалы и методы. В опытах использовали мышей-самцов SHR в возрасте 14 месяцев. Животных

поместили в условия 12-часовой смены дня и ночи (группа LD) или постоянного освещения (группа LL), часть из них при этом получала мелатонин (группы LDMT и LLMT) в ночное время с питьевой водой. Животным на кожу спины 2 раза в неделю в течение 2 нед наносили диметилбензантрацен (ДМБА), а затем 12-0-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат (ТФА) до конца эксперимента, в контроле наносили ацетон. Анализ экспрессии белка CRY1 проводили иммуногистохимическим методом в 10 образцах кожи и опухолей от животных каждой группы. На микрофотографиях подсчитывали процент позитивно окрашенных ядер в базальном слое кожи и папиллом в программе ImageJ (NIH, США). Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием U-критерия Манна–Уитни и t-критерия Стьюдента в программе MS Excel 2013.

Результаты. Выявлено статистически достоверное увеличение числа животных с опухолями в группе LL по сравнению с LD ($p = 0,0476$) и снижение в группе LLMT по сравнению с LL ($p = 0,0383$). Процент ядер, экспрессирующих CRY1, в коже достоверно не различался между контрольными группами (LD – $41 \pm 5,22$ % и LL – $39 \pm 3,54$ %), тогда как в коже с места аппликации канцерогена он был достоверно ниже во всех группах: LD – $24,96 \pm 4,65$ % ($p = 0,0001$), LL – $28,36 \pm 3,15$ % ($p = 0,0007$), LDMT – $29,36 \pm 4,86$ % ($p = 0,002$), LLMT – $24,38 \pm 3,36$ % ($p = 0,002$). Статистически значимое снижение процента позитивно окрашенных ядер было выявлено в опухолях по сравнению с кожей во всех группах: LD – $17,96 \pm 4,72$ % ($p = 0,0002$), LL – $18,5 \pm 5,09$ % ($p = 0,0008$), LDMT – $20,08 \pm 3,84$ % ($p = 0,001$), LLMT – $17,69 \pm 3,40$ % ($p = 0,0001$). В коже с места аппликации процент позитивно окрашенных ядер достоверно различался при разных режимах освещения ($p_{LL-LD} = 0,0002$; $p_{LLMT-LDMT} = 0,003$), а также при введении мелатонина ($p_{LD-LDMT} = 0,01$; $p_{LL-LLMT} = 0,002$). В опухолях при нормальном освещении введение мелатонина не влияло на экспрессию CRY1, тогда как при постоянном освещении у животных, получавших мелатонин, процент позитивно окрашенных ядер был достоверно выше ($p = 0,0007$).

Выводы. 1. Постоянное освещение стимулирует канцерогенез кожи, вызванный ДМБА и ТФА. 2. Воздействие на кожу канцерогена и постоянное освещение существенно изменяют уровень синтеза часового белка CRY1. 3. В условиях постоянного освещения уровень синтеза белка CRY1 в опухолях кожи повышается при введении мелатонина.

Связь морфологического разнообразия рака молочной железы с хромосомными нарушениями и опухолевой стволовостью: взгляд на механизмы опухолевой эволюции

Е.В. Денисов^{1,2}, Н.А. Скрябин^{2,3}, Л.А. Таширева¹,
Т.С. Геращенко^{1,2}, М.В. Завьялова^{1,2},
Н.В. Чердынцева^{1,2}, В.М. Перельмутер¹

¹ФГБНУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии»;

²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики», Томск

Принято считать, что рак молочной железы (РМЖ) является эволюционно-адаптивной системой, клеточный состав которой меняется во времени под влиянием факторов опухолевой природы, микроокружения и терапии. При РМЖ описано 5 типов морфологических структур (тубулярные, альвеолярные, солидные, трабекулярные и дискретные), представляющих различные пространственные формирования опухолевых клеток, наличие и количественный состав которых в значительной степени варьируют как от случая к случаю, так и в пределах одной опухоли. В данной работе мы попытались понять, насколько внутриопухолевая морфологическая гетерогенность РМЖ связана с хромосомными aberrациями (ХА) и наличием опухолевых стволовых клеток (ОСК), и проследить ее филогенез в контексте опухолевой эволюции. В исследование было включено 35 пациенток с РМЖ, использованы лазерная микродиссекция, микроматричная сравнительная геномная гибридизация, иммунофлуоресцентный анализ и стандартные статистические подходы. Результаты исследования показали, что разные морфологические структуры характеризовались вариабельностью по ХА, однако их количество в большинстве случаев не зависело от типа структур. Не было найдено общих ХА для всех структур, что может говорить о том, что более мелкие aberrации (например, мутации в генах) выступают в роли первичных предковых мутаций. Кроме того, не было идентифицировано специфических ХА для разных типов структур. В частности, кластерный анализ показал отсутствие схожести структур одного типа по ХА. Процент ОСК варьировал между разными структурами от преобладания в солидных и альвеолярных до полного отсутствия в дискретных. На основании вышесказанного, а также по данным филогенетического анализа мы заключили, что формирование морфологического разнообразия (как и, вероятно, появление общего предкового опухолевого клона) РМЖ не связано с ХА, происходит либо локально

и независимо в пределах анализируемых участков опухоли, либо носит хаотический характер и может зависеть от ОСК.

Исследование выполнено за счет Российского научного фонда (РНФ) (грант № 14-15-00318).

Влияние препаратов, полученных из трополоновых алкалоидов, на активность топоизомераз I и II, межнуклеосомную деградацию ДНК и множественную лекарственную устойчивость клеток дрожжей *S. cerevisiae*

А.А. Ибрагимов, О. Касымов, З.М. Еникеева,
А.Ч. Абдирова, Ш.Н. Ибрагимов

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

В исследованиях фундаментальной онкологии при изучении развития фенотипов множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) показано, что в культивируемых клетках, резистентных за счет топоизомеразы II, обнаруживается либо снижение активности этого фермента, либо уменьшение его количества (Kurosawa M., Okabe M., 1996).

Целью исследования было сравнение новых цитостатиков Дэквина, К-19 и К-20, полученных модификацией трополоновых алкалоидов, с этопозидом и доксорубицином при влиянии на МЛУ, активность топоизомераз и межнуклеосомную деградацию ДНК на модели клеток дрожжей *S. cerevisiae*.

Материалы и методы. В эксперименте в чашках Петри использовали интактную твердую среду для дрожжей *S. cerevisiae*, на которой высевали клетки после суточного культивирования в присутствии соответствующего противоопухолевого препарата. Эффективность воздействия препаратов на рост исследуемых клеток оценивали по количеству колоний. Активность топоизомераз I, II и межнуклеосомную деградацию ДНК определяли методом электрофореза ДНК клеток исследуемых вариантов в 1,5 % агарозном геле.

Результаты. Показано заметное преодоление лекарственной устойчивости К-19 и Дэквином — на 57 и 45 % соответственно. Для К-20 и доксорубицина этот показатель был меньше — по 33 %. Этопозид, наоборот, стимулировал рост резистентных клеток на 75 %.

Процент ингибирования топоизомераз I и II был наиболее высоким при воздействии Дэквина — 74 %. Также высокий процент ингибирования топоизомераз (63–68 %) показан для К-19, К-20 и этопозиды, который является известным ингибитором топоизомеразы II и имеет субстратную специфичность к лекарственным транспортерам Pgp/Pdr5p. Доксорубицин ингиби-

вал активность топоизомераз на 41 %. На электрофореграмме показано, что все исследуемые соединения и препараты сравнения способствуют высокой деградации ДНК (65–70 %), наблюдается фрагментация ДНК в виде шлейфа по сравнению с интактной нативной ДНК.

Выводы. Дэквин и К-19 заметно преодолевают МЛУ. При применении терапевтических доз К-19, К-20 и Дэквина наблюдается более выраженное ингибирование активности топоизомеразы II по сравнению с этопозидом.

Работа выполнена при поддержке гранта ФДСС 12.7.

Изменения уровня TNF-α и его растворимого рецептора sTNF-RI в клетках шейки матки при дис- и неопластической трансформации

Е.В. Каюкова, Б.С. Хышиктуев

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России

Известно, что TNF-α является провоспалительным цитокином, играющим важную роль во многих звеньях канцерогенеза. Его эффекты плеiotропны. С одной стороны, он оказывает цитотоксическое действие, активизирует апоптоз, участвует в дифференцировке клеток, межклеточном взаимодействии; с другой — способствует опухолевой прогрессии, иммунной агрессии в патологическом очаге. Доказано, что увеличение уровня TNF-α является неблагоприятным фактором, указывающим на прогрессирование злокачественного процесса, что коррелирует со снижением общей выживаемости. Учитывая широкую медицинскую и социальную значимость рака шейки матки во всем мире, актуальность изучения молекулярных звеньев канцерогенеза бесспорна.

Исследовано содержание уровня TNF-α и его растворимого рецептора sTNF-RI в клетках шейки матки методом иммуноферментного анализа в группах «рак» (рак шейки матки IA–IV стадии) и «предрак» (цервикальная интраэпителиальная неоплазия III степени). Материалом исследования послужили биоптаты шейки матки, полученные путем прицельной ножевой биопсии во время проведения расширенной кольпоскопии или интраоперационно. Образцы контрольной группы были взяты у 25 практически здоровых женщин с их информированного согласия.

В клинической группе «предрак» в клетках цервикального эпителия независимо от их локализации не было выявлено достоверных различий по уровню TNF-α и sTNF-RI, что, вероятнее всего, отражает механизмы избегания противоопухолевой иммунной защиты. При злокачественной трансформации клеток

шейки матки пул TNF- α и sTNF-RI увеличился в 2,6 и 1,7 раза соответственно ($p < 0,001$).

Высокий уровень TNF- α и его растворимого рецептора в клетках экзоцервикса при неоплазии можно объяснить, во-первых, генетической детерминированностью. Во-вторых, уровень TNF- α может увеличиваться за счет его синтеза макрофагами в опухолевом очаге. Данный факт кажется закономерным, учитывая установленное нами ранее изменение пула клеток, экспрессирующих общий лейкоцитарный антиген (CD45), при предраковых состояниях и злокачественной трансформации экзоцервикса. В-третьих, это объясняется шеддингом рецептора, что, возможно, связано с особенностями жирнокислотного состава биологической мембраны опухолевой клетки.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о роли TNF- α и его растворимого рецептора в процессах цервикального онкогенеза.

Корреляционные взаимосвязи между величинами короткоцепочечных жирных кислот и уровнем пролиферативной активности, апоптотической реактивности, показателями клеточного цикла экзоцервикса при дис- и неопластической трансформации

Е.В. Каюкова, Б.С. Хышиктеув

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России

Известно, что нарушение липидного спектра биологических мембран клеток является одним из звеньев цервикального канцерогенеза. Однако в литературе отсутствуют сведения по изучению роли спектра короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) как компонентов биологических мембран клеток в процессах малигнизации.

Цель исследования — провести корреляционный анализ полученных нами ранее величин спектра КЖК клеток шейки матки, с одной стороны, и параметров пролиферативной активности, апоптоза и кинетики фаз клеточного цикла экзоцервикса при дис- и неопластической трансформации, с другой.

Анализируя выявленные корреляционные взаимоотношения между изучаемыми параметрами, можно констатировать их тесные патогенетические взаимосвязи в процессах малигнизации цервикального эпителия. Так, вероятнее всего, КЖК обладают антиканцерогенным действием, реализуя его через следующие эффекты: во-первых, антипролиферативный, проявляющийся наличием отрицательных взаимосвязей

между концентрациями КЖК, с одной стороны, и пулом CD45-негативных клеток, экспрессирующих Ki-67 (в паранеопластических биоптатах), и долей G2/М-клеток (в очаге предрака, паранеопластических и здоровых клетках), с другой. Наличие положительных корреляций уровня S_{40} с долей пролиферирующих клеток и G2/М-клеток при предраке, вероятно, следует расценивать как «парадоксальный» эффект последних, что нашло свое отражение и в литературных источниках. Во-вторых, КЖК проявляют проапоптотический эффект, что ярко визуализируется в очаге диспластической трансформации, где обнаружена сильная связь последних с клетками, находящимися в разных стадиях апоптоза. В-третьих, выявлено модулирующее влияние КЖК на фазы клеточного цикла с формированием клеточных блоков.

Выявленные механизмы действия КЖК на клетки цервикального эпителия при предопухолевой трансформации и малигнизации отражают степень их участия в опухолевом процессе. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что в условиях дефицита КЖК в клетках экзоцервикса как при предраковых состояниях, так и при малигнизации их антиканцерогенный эффект минимален, что приводит к дестабилизации фаз клеточного цикла, повышению пролиферативного потенциала, изменению апоптотической реактивности клеток.

Таким образом, наличие большого количества корреляционных взаимосвязей между уровнем КЖК и параметрами апоптоза, некроза, фазами клеточного цикла указывает на их тесное патогенетическое участие в процессах цервикального онкогенеза.

Биологические эффекты узкобороздочных лигандов

К.И. Кирсанов¹, Т.И. Фетисов^{1,2}, Е.А. Лесовая^{1,3}, Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская¹

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

²ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России;

³ГБОУ ВПО РязГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России

Узкобороздочные лиганды (УБЛ) представляют собой класс соединений разной химической структуры, обладающих аффинностью к малой (узкой) бороздке ДНК. Большинство этих соединений нековалентно связываются с ДНК за счет образования водородных и ван-дер-ваальсовых связей. Благодаря достаточно высокой аффинности к ДНК они влияют на функционирование соответствующих белков метаболизма ДНК и транскрипционных факторов. Соединения этого класса оказались активными в противомикробной терапии и при лечении заболеваний, вызываемых простейшими. Кроме того, УБЛ, обладающие способностью к флуоресценции при взаимодей-

ствии с ДНК, за последние 50 лет получили большое распространение в экспериментальной биологии.

Работа посвящена исследованию спектра биологической активности малых молекул, взаимодействующих с ДНК по малой бороздке. При этом был получен ряд новых эффектов и изучены новые закономерности, среди которых наиболее важными являются следующие: 1) некоторые из распространенных бисбензимидазольных красителей ДНК, а также производных карбазолов обладают рекомбиногенной активностью; 2) практически все АТ-специфические УБЛ способны специфически ингибировать *in vitro* и *in vivo* ДНК-зависимую активацию PARP-1 путем разобщения связи фермента с ДНК-активатором по конкурентному механизму; 3) при обработке личинок *D. melanogaster* некоторыми УБЛ в ядрах клеток дрозофилы происходит исключение PARP-1 из зон конденсированного гетерохроматина, что приводит к реактивации «молчащих» ретротраспозонов и накоплению их мРНК в цитоплазме; 4) УБЛ влияют на эпигенетическую регуляцию транскрипции, связанную как с процессами модификации гистонов, так и метилирования ДНК; 5) УБЛ обладают специфичностью к определенным АТ-богатым последовательностям; 6) некоторые УБЛ проявляют сильные антиканцерогенные и противоопухолевые свойства в экспериментах *in vivo*.

Таким образом, впервые получен ряд приоритетных научных результатов о влиянии УБЛ на процесс канцерогенеза и продемонстрирована перспективность их использования для профилактики канцерогенеза и в противоопухолевой терапии.

Механизмы действия ингибитора тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста тирфостина AG1478: двуликий Янус

Е.С. Корнилова

ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) в норме участвует в регуляции пролиферации, апоптоза, клеточной подвижности и дифференцировки ряда клеток эпителиального происхождения. Злокачественная трансформация таких клеток часто связана с нарушениями в системе ЭФР-зависимой регуляции. ЭФР воздействует на клетки через высокоспецифичный трансмембранный рецептор — тирозинкиназу, принадлежащую к семейству c-ErbB. Активация тирозинкиназы в результате формирования ЭФР-рецепторного комплекса приводит к автофосфорилированию остатков тирозина в цитоплазматическом домене рецептора, что запускает целый спектр сигнальных каскадов. Параллельно инициируется эндоцитоз ЭФР-рецепторных

комплексов, в результате которого и ЭФР, и рецептор доставляются в лизосомы и деградируют там, приводя к аттенуации стимулированных каскадов. Поскольку опухолевый рост часто коррелирует с гиперэкспрессией рецептора или мутациями, поддерживающими постоянную активность рецепторной тирозинкиназы, использование ее специфических ингибиторов является очевидным терапевтическим подходом, который, однако, не всегда оказывается эффективным.

Анализируя действие обратимого ингибитора тирозинкиназы рецептора ЭФР тирфостина AG1478 на культивируемые клетки карциномы линии A431, мы обнаружили, что он эффективно подавляет фосфорилирование рецептора по тирозину. При отмывке ингибитора фосфорилирование восстанавливалось, однако его уровень не превышал 70–80 % от первоначального. Используя антитела, «узнающие» определенные остатки фосфотирозина, мы обнаружили, что фосфорилирование Y1173, инициирующего митогенный MAP-киназный каскад, восстанавливалось полностью, тогда как сайт Y1045, отвечающий за взаимодействие с ключевым белком, регулирующим доставку рецептора в лизосомы, — убиквитинлигазой c-Cbl, повторно не фосфорилировался. Таким образом, после удаления ингибитора из инкубационной среды митогенный сигнал начинал генерироваться вновь, тогда как механизм его негативной регуляции практически полностью подавлялся.

Очевидно, что значительные колебания концентрации ингибитора могут возникать как в ходе курса терапии, так и после его окончания, когда уровень ингибитора резко падает. Возможность такого рода эффектов следует учитывать при разработке протоколов клинических испытаний новых ингибиторов тирозинкиназ.

Работа выполнена при поддержке РФФИ.

Ферменты репарации ДНК и их ингибиторы как потенциальные лекарства

О.И. Лаврик

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) — основной фермент, обеспечивающий процессинг ковалентных аддуктов топоизомеразы 1 (TOP1) с ДНК, а также удаление других модификаций с 3'-конца ДНК. Недавно нами было показано, что TDP1 может инициировать репарацию апуриновых/апиримидиновых (AP) сайтов, расщепляя их с образованием однонуклеотидных брешей с фосфатами на 3'- и 5'-концах. Эта активность не наблюдается у мутантной формы TDP1 SCAN1, ответственной за развитие нейродеге-

неративного заболевания — спиноцеребеллярной атаксии. Было показано, что активность TDP1 по расщеплению AP-сайтов стимулируется ключевым регулятором эксцизионной репарации оснований — PARP1. Эти данные свидетельствуют о вовлеченности TDP1 в новый APE1-независимый путь эксцизионной репарации оснований у млекопитающих. TDP1 — многообещающая мишень для противораковой терапии, основанной на повреждениях ДНК, обусловленных действием ингибиторов TOP1. Были синтезированы и протестированы в качестве потенциальных ингибиторов TDP1 ряд новых соединений — производных бензопентатиепина и диазаадамантиана. Полученные результаты позволяют рассматривать эти классы соединений как перспективные ингибиторы TDP1 (концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) для бензопентатиепинов — 0,2–6,0 мкМ, для диазаадамантианов — 5–70 мкМ). Благодаря центральной роли в регуляции процессов репарации ДНК PARP1 является также перспективной мишенью для разработки ингибиторов — эффективных противораковых препаратов. В качестве ингибиторов PARP1 исследован ряд соединений, в том числе дисахаридные нуклеозиды и их производные. Эти соединения оказались конкурентными ингибиторами PARP1 со значениями IC_{50} 25–250 мкМ. Наилучшие ингибиторные свойства проявили производные тимидина независимо от наличия, типа и расположения второго рибозного остатка, поэтому они могут представлять интерес как основа для дальнейшего усовершенствования структуры в целях усиления ингибиторных свойств.

Работа поддержана РНФ (грант № 14-24-00038) и РФФИ (грант № 14-04-00268).

***Helicobacter pylori* и факторы прогрессии рака желудка**

М.А. Сеньчукова^{1,2}, О.Н. Томчук¹,
Н.В. Пучихина^{1,3}, Н.В. Зайцев^{1,2}

¹ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России;

²ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер»;

³ГБУЗ «Онкологический диспансер № 2» Минздрава Краснодарского края, Сочи

Изучены особенности инфекции *Helicobacter pylori* и их связь с активностью воспаления и ангиогенеза, клинко-морфологическими особенностями рака желудка (РЖ). Ткань опухоли и прилежащей слизистой оболочки желудка (СОЖ) у 47 больных РЖ исследованы иммуногистохимически с использованием антител к *H. pylori*, CD4, CD8, CD20, CD68, CD34. Полученные результаты сопоставлены с клинко-морфологическими характеристиками опухоли и отдаленными результатами лечения. В Оренбургской области

отмечена высокая инфицированность *H. pylori* пациентов с РЖ (84,5 %), при этом умеренная и высокая степень обсемененности (СО) СОЖ отмечена более чем у половины (51,3 %) больных. При иммуногистохимическом исследовании у пациентов с РЖ преобладали кокковые формы *H. pylori*, которые наблюдались у 93,4 % инфицированных больных, причем только кокковые — у 68,9 %. Анализ показал, что средняя и высокая СО СОЖ *H. pylori* чаще наблюдались при диффузном типе РЖ (в 59,1 и 25,0 % случаев соответственно при диффузном и кишечном типах РЖ; $p = 0,024$) и при низкодифференцированном РЖ (в 6,7; 55,6; 71,4 и 53,3 % соответственно при высоко- (1), умеренно (2), низкодифференцированной аденокарциноме и недифференцированном раке (3) и перстневидно-клеточном раке (4); $t_{1-2} = 0,014$; $t_{1-3} = 0,005$; $t_{1-4} = 0,010$). Примечательно, что высокая и средняя СО СОЖ кокковыми формами *H. pylori* встречалась достоверно чаще при единичных метастазах в регионарные лимфатические узлы (N1), чем при множественных (в 21,7; 83,3 и 52,9 % случаев соответственно при стадиях РЖ N0, N1 и N2; $p = 0,011$). При высокой и средней СО СОЖ кокковыми формами *H. pylori* отмечено достоверное снижение 3-летней безрецидивной выживаемости больных РЖ (81,0 и 47,4 % соответственно; $p = 0,017$; отношение шансов 4,89; доверительный интервал 1,11–21,47). Связи этого показателя с 3-летней общей выживаемостью пациентов с РЖ не выявлено. Не установлено также связи между СО СОЖ *H. pylori* и уровнем полиморфно-клеточной инфильтрации и количеством лимфоидных фолликулов в СОЖ, плотностью CD4, CD8, CD20 и CD68 в строме опухоли и СОЖ, ПМС. Этот факт, возможно, связан с преобладанием у больных РЖ кокковых форм бактерий, реализация агрессивного потенциала которых может осуществляться не только за счет активации воспалительных процессов в СОЖ, но и других механизмов, например способности бактерий повышать уровень генных мутаций, нарушать процессы апоптоза и пролиферации клеток желудочного эпителия.

Wnt-сигналинг: роль в канцерогенезе и возможности фармакологической регуляции

В.В. Татарский (мл.)¹, В.С. Кочубей^{2,3}, А.В. Колячкина^{2,3},
А.А. Штиль¹, Р.В. Комбаров^{2,3}, Д.В. Генис^{2,3}

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

²ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», Москва;

³ООО «Новые научные технологии», Москва

Активирующие мутации сигнального каскада Wnt играют ключевую роль в развитии новообразований, в частности опухолей толстой кишки. Белки каскада Wnt рассматриваются как новые мишени противоопу-

холевой терапии. Скрининг химической библиотеки миметиков α -спирали на моделях клеточных культур рака толстой кишки человека, трансдуцированных репортерной β -катенин-зависимой конструкцией, выявил ингибиторы Wnt-каскада с оригинальным механизмом действия. Биотинилированное производное соединения-лидера ASX-339 связывается с компонентами транскрипционного комплекса β -катенина, преимущественно с DDX5 (p68) — белком, необходимым для β -катенин-зависимой транскрипции, p53 и рецептором эстрогенов. ASX-339 изменяет связывание β -катенина с компонентами цитоскелета, что соответствует фенотипу нокдауна p68. В наномолярных концентрациях лидерное соединение ингибирует Wnt-опосредованную экспрессию белков c-Мус, циклина D, TCF4, c-Met, CD44 и изменяет экспрессию других генов, приводя к G2/M-блоку клеточного цикла и последующей программированной гибели с активацией каспаз 3 и 9. Однако ингибирование компонентов транскрипционного комплекса, в том числе p68, не обеспечивает достаточное «терапевтическое окно» и неспецифично для опухолей с активацией Wnt-каскада: другие сигнальные пути также регулируются соединением ASX-339. Это характерно и для других ингибиторов Wnt-каскада, действующих на уровне транскрипционного комплекса. Обсуждается возможность таргетной терапии опухолей с активацией сигнального каскада Wnt, в частности посредством ингибирования YAP1-CTNBN1-зависимой транскрипции и функции CDK9.

Экспрессия гена сурвивина (*BIRC5*) и ErbB-2 (*HER-2/neu*) в лимфоцитах при раке молочной железы

Е.А. Шляхтунов, В.М. Семенов, И.С. Веремей

УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов медицинский университет»,
Республика Беларусь

В настоящее время известно, что наличие в опухоли инфильтрирующих лимфоцитов (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) является косвенным свидетельством активного противоопухолевого иммунитета и сочетается с улучшением прогноза у пациенток, страдающих операбельным раком молочной железы (РМЖ). Согласно данным литературы, у больных с высоким содержанием TILs проведение только химиотерапии ассоциировалось с 5-летней безрецидивной выживаемостью 91 %. Добавление анти-HER-2-направленного действия трастузумаба в этой группе не улучшало результатов лечения. Наоборот, было отмечено достоверное снижение 5-летней безрецидивной выживаемости до 80 %. Объяснения данного феномена пока нет. Возможно, это связано с антигенпрезентирующим механизмом самих лимфоцитов.

Цель исследования — изучить экспрессию гена сурвивина (*BIRC5*) и ErbB-2 (*HER-2/neu*) в лимфоцитах, инфильтрирующих ткань карциномы молочной железы, а также в лимфоцитах периферической крови больных РМЖ.

Материалы и методы. После гомогенизации образца замороженной опухоли выделены лимфоциты ($CD45^{+}$) методом сепарирования. Таким же методом выделены лимфоциты из периферической крови. При помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени исследована экспрессия гена *BIRC5* и ErbB-2 в лимфоцитах 16 образцов первичной инвазивной протоковой карциномы молочной железы, а также 26 образцов периферической крови пациенток, страдающих РМЖ.

Результаты. В лимфоцитах, выделенных из всех образцов карциномы, определялась экспрессия гена *BIRC5* и ErbB-2 со средним значением ($M \pm ms$) $2,00 \pm 1,29$ (min — 0,003; max — 4,283) для сурвивина и $0,57 \pm 0,29$ (min — 0,024; max — 1,459) для *HER-2/neu*.

В лимфоцитах, выделенных из всех образцов периферической крови, определялась экспрессия ErbB-2 (*HER-2/neu*) со средним значением ($M \pm ms$) $0,661 \pm 0,521$ (min — 0,259; max — 1,405). В 19 образцах (73 %) определялась экспрессия гена сурвивина со средним значением ($M \pm ms$) $0,248 \pm 0,171$ (min — 0,035; max — 0,488). В 7 образцах (27 %) получены отрицательные результаты экспрессии гена *BIRC5*.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о своеобразной «напряженности» клеточного иммунитета как непосредственно в опухолевой ткани, так и в кровяном русле. Широкий разброс показателей может говорить о различном иммунном ответе организма на опухоль. Это исследование указывает на возможное предикторное значение TILs как биомаркера, способного определить группу больных, которые высокочувствительны к химиотерапии и не нуждаются в добавлении трастузумаба. Однако эта гипотеза требует подтверждения в рандомизированных исследованиях.

Противоопухолевые лиганды на основе антрадиофендионов: модулирование биологических свойств путем модификации структуры боковых цепей

А.Е. Щекотихин

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва;
ФГБОУ ВПО РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва

Лиганды, стабилизирующие G-квадруплексные структуры ДНК, рассматриваются как перспективные кандидаты для поиска новых лекарственных средств. Модификация терминальных аминокислотных групп 4,11-бис(аминоалкиламино)антрадиофендионов в гуанидиногруппы

позволяет повысить сродство лигандов к G-квадруплексам (Cogoi S. et al., 2013). Так, был открыт бисгуанидин ЛХТА-1581, обладающий высоким сродством к теломерному квадруплексу и квадруплексам из промоторов онкогенов, способный блокировать теломеразу, транскрипцию онкогенов и опухолевый рост (Cogoi S. et al., 2014).

Моделирование комплексов лиганд–квадруплекс было использовано для дизайна нового поколения лигандов. Синтез соединений нового хемотипа, содержащих 3 боковые цепи с гуанидиногруппами, позволил получить производные антрадиофендиона, обладающие высокой аффинностью к теломерному G-квадруплексу и значительно большей селективностью связывания по сравнению с бисгуанидином ЛХТА-1581.

Продолжая оптимизацию лигандов G-квадруплексов, модификацией терминальных аминогрупп получена серия бис(хлорацетамидино)антрадиофендионов. Показано, что замена терминальных гуанидиногрупп в ЛХТА-1581 на хлорацетамидиногруппы (ЛХТА-1795) сохраняет аффинность лигандов к квадруплексам и увеличивает цитотоксические свойства препарата за счет более высокого аккумулярования в опухолевых клетках. Для нового соединения-лидера ЛХТА-1795 проведены углубленные исследования биологических свойств и механизма действия (Cogoi S. et al., 2015). Лиганд ЛХТА-1795 за счет стабилизации квадруплекса H-Ras-2 вызывает достоверное снижение (до 95–99 %) содержания продукта трансляции гена *HRAS* (белка p21 H-Ras) в опухолевых клетках. Бисхлорацетамидин ЛХТА-1795 не только вызывает остановку пролиферации, но и эффективно блокирует формирование колоний опухолевых клеток. На модели ксенографтов рака мочевого пузыря T24 выявлен высокий противоопухолевый эффект G-квадруплексного лиганда ЛХТА-1795.

Протеинкиназа С-дельта – новая молекулярная мишень производных акадезина

А.М. Щербаков¹, В.Б. Цветков^{2,3}, Б.В. Тяглов⁴,
К.В. Лобанов⁴, С.В. Яроцкий⁴, А.С. Мионов⁴,
Р.С. Шакулов⁴, А.А. Штиль¹

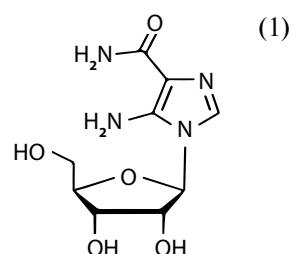
¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «Институт нефтехимического синтеза
им. А.В. Топчиева РАН», Москва;

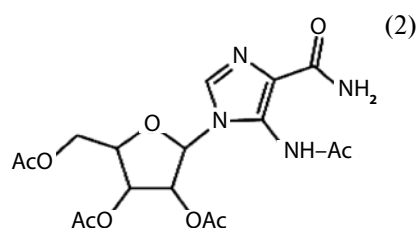
³ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-
химической медицины ФМБА России», Москва;

⁴ГНЦ РФ ФГУП «Государственный научно-
исследовательский институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов», Москва

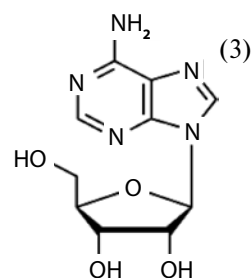
Акадезин (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид, AICAR) (1) — регулятор важных сигнальных каскадов, что обуславливает его перспективность в качестве лекарственного кандидата.



В результате химических модификаций молекулы нами получены новые производные с различными заместителями в гетероциклическом кольце и углеводном остатке. Сравнение способности акадезина и новых производных вызывать гибель культивируемых клеток рака кишки и молочной железы выявило 5-ацетиламино-4-ацетиламиноимидазолил-1-β-D-2',3',5'-триацетилрибофуранозид (2) как соединение-лидер.



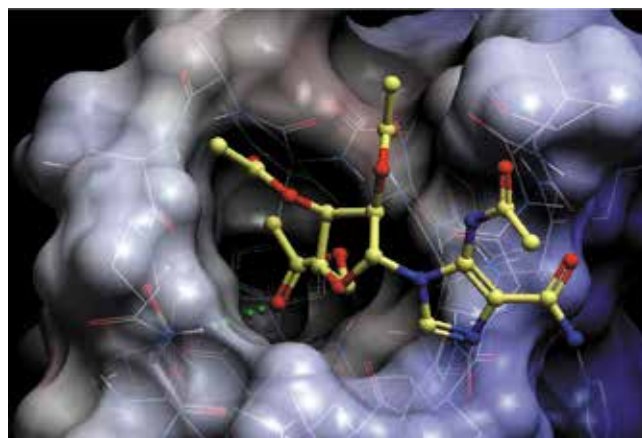
Это соединение активировало киназу АМРК — основную мишень акадезина. Кроме того, соединение (2) снижало базальную и индуцированную форболовым эфиром (ФЭ) NFκB-опосредованную трансактивацию гена-репортера. Это позволило предположить, что «классические» (Ca²⁺/фосфолипидзависимые) изоформы протеинкиназы С (ПКС) могут быть мишенями NFκB-ингибирующего действия соединения (2). Действительно, в субмикромольных концентрациях оно ингибировало δ-изоформу ПКС (ПКСδ) (по фосфорилированию пептидного субстрата в бесклеточной системе). Активность α1-, α2-, β- и γ-изоформ ПКС, а также протеинкиназ IKKα и IKKβ не изменялась или снижалась лишь при использовании существенно более высоких (2 порядка) концентраций соединения (2). В соответствии с этими результатами данное соединение снижало ФЭ-индуцированное фосфорилирование IκB и активацию NFκB в клетках рака молочной железы. По способности ингибировать ПКСδ соединение (2) активнее акадезина (1) в 37 раз и ближайшего физиологического аналога аденозина (3) в 2 раза.



Проведено моделирование взаимодействия соединений (1)–(3) с CYS2-доменом ПКСδ (PDB:1PTR) с помощью процедуры докинга, реализованного в программе ICM 3.8. Анализ результатов докинга показал, что соединения (2) (см. рисунок) и (3) связываются с ПКСδ в области встраивания активаторов (ФЭ, диацилглицерола), а акадезин (1) не имеет энергетически выгодных расположений в этой области.

Таким образом, химические модификации структуры акадезина позволили получить более активное производное и выявить внутриклеточную мишень — ПКСδ, важную для установления молекулярных механизмов действия соединений этого химического класса.

Работа поддержана грантом Президиума РАН.



Связывание соединения (2) с CYS2-доменом ПКСδ (PDB:1PTR)