

МАТЕРИАЛЫ

VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии

21–23 декабря 2021 г., Москва

MATERIALS

of the 6th All-Russian Conference on Molecular Oncology

Moscow, 21–23 December 2021

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

Геномика и эпигеномика злокачественных новообразований: фундаментальные и прикладные аспекты	9
Молекулярные механизмы прогрессии и метастазирования опухолей	35
Молекулярная диагностика опухолей	77
Молекулярно-биологические подходы к противоопухолевой терапии.....	114

MATERIALS OF THE 6TH ALL-RUSSIAN CONFERENCE ON MOLECULAR ONCOLOGY

Genomics and epigenomics of malignant lesions: fundamental and applied aspects	9
Molecular mechanisms of progression and metastatic dissemination of tumors	35
Molecular diagnostic of tumors	77
Molecular biological approaches towards anti-neoplastic treatment	114

Список сокращений

АФК — активные формы кислорода	ОР — отношение рисков
БКГ — базальноклеточная гиперплазия	ОСК — опухолевые стволовые клетки
БРМЖ — билатеральный рак молочной железы	ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
БТШ — белки теплового шока	ОШ — отношение шансов
ВКМ — внеклеточный матрикс	ПГ — протеоглики
ВПЧ — вирус папилломы человека	ПКР — почечно-клеточный рак
ВЭБ — вирус Эпштейна–Барр	ПСА — простатический специфический антиген
ГИСО — гастроинтестинальные стромальные опухоли	ПЦР — полимеразная цепная реакция
ГКЛ — гистиоцитоз из клеток Лангерганса	РЖ — рак желудка
ДИ — доверительный интервал	РЛ — рак легкого
ДШМ — дисплазия шейки матки	РМЖ — рак молочной железы
ЗНО — злокачественные новообразования	РПЖ — рак предстательной железы
ИГХ — иммуногистохимический	РПК — рак прямой кишки
ИКТ — иммунные контрольные точки	РШМ — рак шейки матки
ИЛ — интерлейкин	РЩЖ — рак щитовидной железы
ИФА — иммуноферментный анализ	РЯ — рак яичника
ИФН — интерферон	СМТ — саркомы мягких тканей
КРР — колоректальный рак	скПКР — светлоклеточный почечно-клеточный рак
ЛСП — лимфосаркома Плисса	ФДТ — фотодинамическая терапия
МА — моноклональные антитела	ХЛЛ — хронический лимфолейкоз
МГБ — мультиформная глиобластома	ХМЛ — хронический миелоидный лейкоз
МЛУ — множественная лекарственная устойчивость	ХТ — химиотерапия
мРНК — матричная РНК	ХЛТ — химиолучевая терапия
МРЛ — мелкоклеточный рак легкого	ЦОК — циркулирующие опухолевые клетки
МЭП — мезенхимально-эпителиальный переход	ЩЖ — щитовидная железа
НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого	ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход
НХТ — неoadъювантная химиотерапия	
ОМЛ — острый миелоидный лейкоз	

ГЕНОМИКА И ЭПИГЕНОМИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

Анализ однонуклеотидного полиморфизма G(-2548)A промоторной области гена лептина у больных раком молочной железы

К.А. Алиев, К.Д. Малый

Институт «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского»
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им.
В.И. Вернадского», Симферополь

Введение. Среди гормонально-регуляторных механизмов, влияющих на развитие РМЖ, описана роль лептина — цитокина, регулирующего энергетический обмен, а также ангиогенез, гематопоез, адаптивный иммунитет, что оказывает влияние на прогрессирование опухолевого процесса и метастазирование. Известно, что полиморфизм его промоторной области, а именно мутация G(-2548)A (rs 7799039) ассоциируется с экспрессией гена лептина и его уровнем, что и послужило основой данного исследования.

Цель исследования — изучение полиморфизма G(-2548)A промоторной области гена лептина в популяции жителей Крыма и его взаимосвязь с развитием РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включены 116 больных РМЖ (средний возраст $41,3 \pm 9,8$ года), прошедшие лечение в Крымском онкологическом диспансере им. В.М. Ефетова в период с 2010 по 2019 г. Контрольную группу составили практически здоровые женщины ($n = 51$, $40,8 \pm 8,9$ лет). Исследовали образцы ДНК с помощью аллель-специфической ПЦР с флуоресцентными зондами (ПЦР real-time, амплификатор CFX-96). Наблюдаемые частоты генотипов проверяли на отклонение от равновесия Харди — Вайнберга с помощью критерия Пирсона (χ^2 test), сравнивая частоты локусов и аллельных пар локусов с расчетными, а также между обследуемыми группами. Различия частот пар локусов в обследуемых группах также сравнивали с использованием критерия χ^2 , отвергая нулевую гипотезу при $p < 0,05$.

Результаты. Анализ различий в частоте встречаемости аллелей G и A между обследуемыми группами не выявил статистически значимых отличий.

При сравнении частот аллельных сочетаний (гомозигот GG и AA и гетерозигот GA) различия наблюдаемых и ожидаемых частот внутри каждой группы также не были статистически значимыми. Однако при сравнении аллельных частот между группой пациентов и группой контроля частота гомозиготного варианта аллельного сочетания AA в контрольной группе регистрируется достоверно чаще ($p = 0,054$), т.е. наличие данного аллельного сочетания ассоциируется с меньшей вероятностью развития РМЖ.

Выводы. Исследование частоты встречаемости G(-2548)A в группе больных РМЖ демонстрирует выраженный полиморфизм данной области. Наблюдаемые различия частот встречаемости полиморфных вариантов по сравнению с группой контроля позволяют говорить об участии лептина в развитии РМЖ, что необходимо учитывать при анализе предикторов данного заболевания.

Различие молекулярно-генетических профилей светлоклеточного рака почки с разными клинико-гистологическими особенностями

А.В. Балбуцкий¹, Н.А. Королева¹, С.Д. Бежанова¹,
О.Г. Ковтун, В.И. Логинов², А.А. Лушникова¹

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

²ФГБУ «НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАН»,
Москва

Введение. Светлоклеточный рак почки (СРП) составляет 80–90 % всех случаев рака почки в России и представлен высоко полиморфными опухолями (Оп), для которых малоэффективны химиолучевая и таргетная терапии. Анализ молекулярно-генетических профилей СРП в клинических образцах актуален как для понимания механизмов канцерогенеза рака почки, так и для выбора тактики лечения, прогноза и улучшения качества жизни пациентов.

Цель исследования — анализ спектра мутаций и полиморфизмов гена-супрессора *VHL* в Оп СРП

с различными клинико-гистологическими характеристиками.

Материалы и методы. Парные образцы хирургических биопсий опухолевой и нормальной тканей почки от пациентов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина верифицированы патологоанатомом. Структурные изменения гена *VHL* изучены с помощью ПЦР с праймерами к каждому из 3 экзонов *VHL* с последующим секвенированием по Сэнгеру. Профиль миРНК исследован с помощью специализированных микрочипов, статистический анализ выполнен в Statistics 6.0.

Результаты В случайной выборке №1 ($n = 169$) 85,3 % Оп отнесены к СРП, из них 45 % – Grade I, 10 % – Grade II 27,5 % (умеренно дифференцированные Оп без отдаленных метастазов), 19 % – Grade III (низкодифференцированные метастатические Оп) и 17,5 % – Grade IV (анapластические Оп с быстрой диссеминацией). По степени распространенности 43 и 16 % соответственно T1 и T2, первичные Оп, ограниченные почкой; 37 % – T3, Оп с распространением в окружающие ткани в пределах фасции Герота; 4 % – T4, Оп с отдаленными метастазами. В выборке №2 ($n = 62$) представлены образцы с узловым типом роста Оп, из них 78 % СРП: 66 % – Grade I, 17 % – Grade II, 5 % – Grade III и 12 % – Grade IV. По распространенности опухолевого процесса 39 и 26 % соответственно T1 и T2, 30 % – T3, 5 % – T4. По сравнению с предвзятой выборкой №2 в первой выше доля Оп СРП (85,3 vs 78,0 %) и низкодифференцированных агрессивных Оп (36,5 vs 17 %; $p < 0,05$) с более высоким метастатическим потенциалом. Однако Оп с низким метастатическим потенциалом в выборке №1 меньше – 55 vs 83 %. В случайной выборке частота мутаций *VHL* в 1-м экзоне составила 42 %, во 2-м – 6 %, в 3-м – 14 %, как и по литературным данным. Среди всех генетических изменений преобладают SNP с заменой аминокислоты. В Оп из предвзятой выборки №2 обнаружены только единичные (~2 %) мутации *VHL* – чаще SNP в экзоне 1. Анализ профилей миРНК в этой группе выявил высокий уровень метилирования, не характерный для случайной выборки СРП.

Выводы. Молекулярно-генетическое исследование подтверждает высокий полиморфизм гена *VHL* в выборке случайных клинических образцов СРП (средняя частота мутаций 62 %), ранее обнаруженный нами в первичных клеточных линиях рака почки. Крайне низкая частота (~2 %) структурных изменений гена *VHL* в Оп с преимущественно умеренной дифференцировкой и узловой формой роста указывает на различие типов регуляции клеточной пролиферации в этих группах Оп почки. Такая регуляция в узловых Оп связана не с мутациями гена-супрессора *VHL* и активацией *VHL*-зависимого сигналинга, а с эпигенетическими механизмами, что отражает специфичный профиль экспрессии миРНК в опухолях СРП с узловой формой роста. Вероятны также мутации в других онкогенах. Дальнейший анализ позволит уточнить

диагностическое и прогностическое значение этих клинико-генетических особенностей СРП.

Прогностическая оценка экспрессии генов, связанных с гипоксией, у пациенток с раком молочной железы

О.И. Бровкина, Г.М. Юсубалиева, Д.С. Ходырев, А.Г. Никитин

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России», Москва

Введение. В настоящее время основными подходами для лечения РМЖ являются системная (хемо- и иммунотерапия, гормональная и таргетная терапии) и местная (хирургическое вмешательство либо лучевая терапия) терапии. При этом выбор терапевтической стратегии определяется в основном классическими клинико-патоморфологическими параметрами, такими как возраст пациента, стадия заболевания, размер и тип опухоли, зачастую не принимая во внимание молекулярно-биологические характеристики. При этом было показано, что важно проводить оценку как опухолевых, так и прилежащих условно здоровых тканей. Именно показатели стромы более 50 % случаев РМЖ определяют развитие гипоксии, которая способствует развитию резистентности опухоли к лучевой терапии и химиотерапии.

Цель работы – анализ открытых баз данных, имеющих сведения о профилях экспрессии в образцах пациентов с РМЖ и данные по выживаемости пациентов.

Материалы и методы. Для анализа были использованы открытые данные проекта METABRIC, полученные с помощью секвенирования RNAseq. Нормализация данных проводилась с помощью пакета DeSeq2. Для того, чтобы разбить полученную совокупность днРНК на отдельные кластеры, были использованы алгоритмы PCA и tSNE. Далее отбирались днРНК с ДЭ, имеющими значения p -критерия с поправкой на множественные данные $< 0,05$. Для того, чтобы выявить взаимосвязи между генами, была применена модель математического обучения XGBoost. С помощью корреляционного анализа оценена связь выбранных генов с кривыми выживания пациентов.

Результаты. Экспрессия 36 генов была в значительной степени индуцирована гипоксией. В число этих генов вошли факторы, индуцируемые гипоксией (HIF), гены, играющие центральную роль в метаболизме глюкозы (*SLC2A1*, *PFKFB4*, *LDHA*, *ALDOA*, *ALDOC*), ангиогенеза (*ANGPTL4*, *VEGFA*), пролиферации и апоптоза (*BNIP3L*, *BNIP3*, *NDRG1*). Помимо известных ранее генов, были гиперэкспрессированы ген альфа-лактальбумин

LALBA и ген экзонуклеазы, стимулированный интерфероном *ISG20*. Оба этих гена были связаны с пониженной выживаемостью пациентов. Интересно, что экспрессия гена *LALBA* является тканеспецифичной.

Выводы. Гипоксия напрямую влияет на пластичность и гетерогенность малигнизированных клеток, способствуя увеличению данных характеристик. Оценка профилей экспрессии генов, связанных с гипоксией, позволит обнаружить метастатический потенциал на ранних стадиях и выбрать оптимальную стратегию лечения.

Нарушение интерактома мРНК-днРНК-миРНК способствует метастазированию у пациентов с раком яичников

О.И. Бровкина^{1,2}, И.В. Пронина¹, А.М. Бурденный¹, Л.А. Урошлев^{1,3}, Е.А. Филиппова¹, М.В. Фридман³, Т.П. Казубская⁴, К.И. Жордания¹, В.И. Логинов², Н.Е. Кушлинский⁵, Э.А. Брага¹

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

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва;

³ ФГБНУ «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

⁴ ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова ДЗМ»;

⁵ ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России

Введение. Растущее число случаев рака яичников в России за последние годы свидетельствует о необходимости усилить раннюю диагностику этого заболевания. Регуляторная роль длинных некодирующих РНК (днРНК) в процессе развития онкологических патологий была подтверждена многими отечественными и зарубежными исследованиями. При этом особое внимание привлекает связь днРНК с микроРНК (миРНК), поскольку они конкурентно регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне, дестабилизируя мРНК-мишени посредством образования комплекса днRNA-миРНК-мРНК.

Цель работы — изучение интерактома днРНК в условиях развития опухоли рака яичников для выявления диагностической значимости днРНК и анализа их роли в развитии онкологической патологии.

Материалы и методы. Для достижения поставленных целей мы осуществили скрининг профилей экспрессии в образцах опухолевой ткани и прилежащей нормы пациентов с раком яичников, информация по которым представлена в базе данных TCGA. Были идентифицированы значимые дифференциально экспрессируемые гены днРНК. С помощью специализированных

баз данных провели поиск миРНК и мРНК, имеющих значимую корреляцию с выбранными днРНК. Результаты биоинформатического анализа были проверены методом ПЦР в реальном времени. Для этого в исследование были включены парные образцы от 35 пациентов с раком яичников, собранные и морфологически охарактеризованные в НМИЦ онкологии. Для полученных данных по уровням экспрессии днРНК, миРНК и мРНК в опухолевых образцах и норме была рассчитана межпарная корреляция.

Результаты. С помощью биоинформатического анализа были установлены 23 пары статистически значимых корреляций между миРНК и днРНК. Среди значимых днРНК были выбраны: *MLK7-AS1*, *LINC00339*, *NEAT1*, *UCA1*, *MALAT1*, *DSCAM-AS1*, *OIP5-AS1*, *TUG1*, *MAFG-DT*. Данные днРНК были связаны со следующими миРНК: miR-124, miR-137, miR-148a, miR-191, miR-203, miR-375. Таргетными генами для этих некодирующих РНК были: *ADAM9*, *c-MET*, *CDK4*, *MAPK1*, *SNAIL1*, *AURKA*, *AXL*, *SOX4*, *YAP1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *BCL2*, *TGFB*. Данные *in silico* были подтверждены с помощью ПЦР в реальном времени. Большинство днРНК были гиперэкспрессированы, в то время как показатели миРНК свидетельствовали о низкой экспрессии. Выбранные таргетные гены участвуют в ЭМП опухолевых клеток.

Выводы. Нарушение интерактома указанных днРНК запускает начальные этапы метастазирования при раке яичников.

Роль варианта rs34275479 гена *APOBEC1* в развитии рака яичников у женщин из республики Башкортостан

Я.В. Валова^{1,2}, Э.Т. Мингажева¹, Г.Р. Махиянова¹, Д.С. Прокофьева¹, Э.К. Хуснутдинова^{1,3}

¹ ФГБОУ «Башкирский государственный университет» Уфа;

² ФБНУ «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека»;

³ ФГБНУ «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН»

Введение. Среди всех злокачественных новообразований рак яичников является наиболее смертельным из всех видов рака женской репродуктивной системы. В связи с этим, разработка и усовершенствование методов ранней диагностики рака яичников являются одной из приоритетных задач онкогинекологии. Важнейшая роль в формировании злокачественных опухолей яичников отводится генетическим факторам. Ген *APOBEC1* кодирует фактор комплементации (AICF), являющийся компонентом комплекса редактирования информационной РНК аполипопротеина-В, который участвует в различных клеточных процессах и действует как онкоген при многих раковых заболеваниях.

Цель работы — проведение ассоциативного анализа варианта rs34275479 гена *APOBEC1* с риском развития рака яичников у женщин из республики Башкортостан.

Материалы и методы. В качестве материала исследования были использованы образцы ДНК, выделенные из венозной крови больных наследственными формами рака яичников ($n = 47$), больных с диагнозом рак яичников ($n = 204$) и женщин без онкологических заболеваний на момент забора крови ($n = 207$) из Республики Башкортостан. Генотипирование проводилось с использованием системы высокопроизводительного ПЦР на жидкостных микрочипах Fluidigm BioMarkHD 192.24 SNPtype Genotyping Technology (Fluidigm, США).

Результаты. Поиск данного варианта в группе больных раком яичников и здоровых индивидов выявил наличие 1 (0,49 %) носительницы изучаемого варианта среди пациенток с раком яичников, 2 (4,25 %) носительниц среди пациенток с наследственными формами рака яичников и 2 (0,96 %) среди здоровых женщин в гетерозиготном состоянии. Однако выявленные различия не достигли уровня статистической значимости ($p > 0,05$).

Выводы. Таким образом, нами не было выявлено ассоциаций варианта rs34275479 гена *APOBEC1* с риском развития рака яичников у женщин из республики Башкортостан.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-34-90003, гранта РФФИ № 18-29-09129, по государственному заданию Министерства науки и высшего образования РФ (FZWU2020-0027), Образования Российской Федерации (HAAAA-A16-116020350032-1).

Эпигенетические предикторы дизмиелопоэза у пациентов с неходжкинскими злокачественными лимфомами

Ю.А. Веряскина¹, С.Е. Титов¹, И.Б. Ковынев²,
Т.И. Поспелова², И.Ф. Жимулев³

¹АО «Вектор-Бест», Новосибирск

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;

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

Введение. Неходжкинские лимфомы (НХЛ) представляют собой группу опухолевых образований лимфатической системы. Вероятно, что влияние микроокружения локально расположенной опухоли может способствовать нарушению костномозгового кроветворения за счет вариабельности содержания микроРНК (миРНК). С клинической точки зрения

важно дифференцировать вторичные миелодисплазии при НХЛ от неопухолевых патологий крови (НОП), а также миелодиспластического синдрома (МДС). Важной задачей, стоящей перед клинической онкологией, является поиск дополнительных молекулярно-генетических маркеров с возможностью интеграции их в существующие международные прогностические системы. Одними из наиболее перспективных маркеров в этом отношении являются миРНК.

Материалы и методы. В качестве материала для исследования использованы препараты костного мозга с верифицированными диагнозами: НХЛ без миелодисплазии (НХЛ (-МД)) ($n = 22$), НХЛ с вторичной миелодисплазией без анемии (НХЛ (+МД) (-А)) ($n = 11$), НХЛ с вторичной миелодисплазией и анемией (НХЛ (+МД) (+А)) ($n = 8$), МДС ($n = 19$), а также от больных с НОП ($n = 58$). Выделение нуклеиновых кислот из клинических образцов проводилось с использованием набора реагентов «Реал Бест экстракция 100» («АО Вектор-Бест», Россия). Анализ уровней экспрессии миРНК проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Результаты. Сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК между образцами НХЛ, МДС и НОП показал, что уровни экспрессии miR-26a-5p, miR-181a-5p, miR-185-5p, miR-96-5p, miR-1246, miR-199b-5p, miR-145-5p и miR-150-5p понижены в НХЛ (-МД) ($p < 0,05$); уровень экспрессии let-7a-5p повышен, а уровни экспрессии miR-26a-5p, miR-199b-5p, miR-145-5p и miR-150-5p понижены в НХЛ (+МД) (-А) ($p < 0,05$); уровень экспрессии let-7a-5p повышен, а уровни экспрессии miR-26a-5p, miR-96-5p, miR-1246, miR-199b-5p, miR-145-5p и miR-150-5p понижены в НХЛ (+МД) (+А) ($p < 0,05$); уровень экспрессии let-7a-5p повышен, а уровни экспрессии miR-26a-5p, miR-181a-5p, miR-185-5p, miR-1246, miR-199b-5p, miR-145-5p и miR-150-5p понижены при МДС ($p < 0,05$). Следует отметить, что уровень экспрессии let-7a-5p был существенно повышен во всех группах миелодиспластических заболеваний по сравнению с НОП ($p < 0,05$).

Выводы. В данной работе впервые разработан профиль экспрессии миРНК в образцах костного мозга у первичных пациентов с НХЛ и вторичной миелодисплазией.

Метилирование генов *miR-34a*, *miR-34b* и *miR-203* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме

Е.Н. Воропаева¹, М.И. Чуркина², Т.И. Поспелова²,
Т.А. Агеева², В.Н. Максимов¹

¹НИИ терапии и профилактической медицины ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Института цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Цель исследования — оценить частоту метилирования генов микро-РНК *miR-203*, *miR-34a* и *miR-34b/c* в опухолевой ткани больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ).

Материалы и методы. Проанализировано 140 образцов ДНК опухолевой ткани пациентов с ДВККЛ. Бисульфитную конверсию ДНК проводили с применением наборов EZ DNA Methylation-Gold Kit. Определение статуса метилирования гена проводили методами метил-специфичной ПЦР и метил-чувствительного анализа кривых плавления на аппарате Rotor-Gene 6000. Для контроля полноты конверсии применялся набор Human Methylated and Unmethylated DNA Control Kit и метод прямого бисульфитного секвенирования на аппарате Hitachi 3500 Genetic Analyzer. Для оценки специфичности метилирования использовалась ДНК здоровых доноров. Количественный анализ сочетанного выявления метилирования изученных генов проводился путем вычисления Log2 Odds Ratio и одностороннего точного критерия Фишера (*p*-value). С помощью процедуры Бенджамини — Хохберга была рассчитана частота ложных открытий (FDR) (*q*-value).

Результаты. Частота метилирования генов микро-РНК *miR-34b/c*, *miR-34a* и *miR-203* в опухолевой ткани ДВККЛ составила 70, 28 и 73 % соответственно, при этом в ДНК доноров данные гены в метилированном состоянии не выявлены.

Проведен анализ сочетанного метилирования генов *miR-34b/c*, *miR-34a* и *miR-203*. Выявлена ассоциация между метилированием пар генов *miR-34b/c* и *miR-34a* (*p* < 0,001, *q* < 0,001), а также *miR-34b/c* и *miR-203* (*p* = 0,013, *q* = 0,020).

Выводы. Аберрантное метилирование промоторов изученных генов может представлять собой один из механизмов снижения экспрессии онкосупрессорных микро-РНК *miR-34b/c*, *miR-34a* и *miR-203* в ДВККЛ. Метилирование генов *miR-34b/c* и *miR-34a*, а также *miR-34b/c* и *miR-203* при лимфоме возникает сочетанно и носит опухоль-специфичный характер. Таким образом, аберрантное метилирование генов изученных микро-РНК может являться как потенциальным биомаркером, так и терапевтической мишенью при ДВККЛ.

*Работа выполнена в рамках бюджетной темы
по Государственному заданию
№ АААА А17 117112850280—2.*

Потенциальное применение *miR-1246* при злокачественных глиомах

И.Ф. Гареев¹, Бейлерли Озал Арзуман оглы¹, Jingxian Sun²,
Guang Yang², Э.Р. Валитов³, А.Т. Сохацкий^{2,4}, Shiguang Zhao²

¹ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии»
Минздрава России, Тюмень;

²Первый аффилированный госпиталь Харбинского
медицинского университета, Китай;

³БУ Ханты-Мансийского автономного округа — Югры
«Няганская окружная больница»;

⁴ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Уфа

Введение. Глиомы представляют собой агрессивные опухоли головного мозга. Ни один из современных методов лечения не считается эффективным в борьбе с глиомами. Это обусловило необходимость в разработке новых методов терапии, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Установлено, что опухолевый супрессор p53 является целевым для *miR-1246* при канцерогенезе, что сделало актуальным изучение роли *miR-1246* в патогенезе ряда злокачественных новообразований. Данная микроРНК действует как промотор опухолевой прогрессии, регулирует пролиферацию клеток, инвазию опухоли, ангиогенез и апоптоз.

Цель исследования — анализ изменений содержания *miR-1246* в клетках линии злокачественной глиомы U87, в тканях и крови пациентов с глиомами для определения потенциальной роли *miR-1246* в патогенезе и возможности использования *miR-1246* в диагностике.

Материалы и методы. В работе использовали линию глиобластомы человека U87, опухолевую ткань и сыворотку крови пациентов с глиомами. Нормальные человеческие астроциты (банк клеток коллекции типовых культур Китайской академии наук) и сыворотка крови здоровых волонтеров были использованы в качестве образцов контрольной группы. Для оценки уровня экспрессии *miR-1246* использовали количественную ПЦР в реальном времени. Анализ на цитотоксичность *miR-1246* проводили с помощью МТТ-теста и его модификации при использовании набора ССК-8. Для подавления экспрессии *miR-1246* использовали anti-*miR-1246*.

Результаты. Установлено, что уровень экспрессии *miR-1246* повышен в клетках линии U87, опухолевой ткани и сыворотке больных с GBM в разной степени по сравнению с контрольной группой. Гиперэкспрессия *miR-1246* способствует жизнеспособности, пролиферации, миграции и инвазии опухолевых клеток. После трансфекции anti-*miR-1246* в клетках линии U87 уровень экспрессии *miR-1246* был значительно снижен. С помощью анализа ССК-8 и МТТ-теста установлено, что anti-*miR-1246*, вызывающая нокдаун *miR-1246*, обладает цитотоксическим действием.

Выводы Уровень экспрессии *miR-1246* повышен в клетках линии злокачественной глиомы человека

U87, а также в опухолевой ткани и сыворотке крови пациентов с глиомами. При нокдауне miR-1246 снижается выживаемость клеток. Эти результаты показывают, что ингибирование экспрессии miR-1246 может быть эффективным подходом к терапии данных типов опухолей, а изменение экспрессии циркулирующей miR-1246 в сыворотке предполагает возможность создания неинвазивных методов для диагностики и прогнозирования заболевания.

Уровень метилирования CpG-островков генов мРНК как перспективный маркер немелкоклеточного рака легкого

М.С. Губенко, А.М. Бурденный, В.И. Логинов,
И.В. Пронина

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей
патологии и патофизиологии», Москва

Введение. Немелкоклеточный рак легкого — одна из самых распространенных онкопатологий человека. В связи с этим актуален поиск новых маркеров для его выявления на ранних стадиях, и одним из таких маркеров может стать метилирование CpG-островков генов мРНК (миРНК).

Цель работы — изучение уровня метилирования CpG-островков генов мРНК как перспективных маркеров немелкоклеточного рака легкого.

Материалы и методы. В исследовании использовали репрезентативную выборку из 80 парных (опухоль/норма) образцов немелкоклеточного рака легкого. Анализ метилирования проводился с использованием метода количественной метилспецифичной ПЦР. Статистический анализ уровней метилирования выполнен с применением непараметрического U-теста Манна-Уитни. Оптимальные системы маркеров выбирали по результатам ROC-анализа. Использованы математические пакеты IBM SPSS Statistics 22.

Результаты. Исследован статус метилирования 10 генов мРНК, установлены значимые различия между уровнями метилирования в образцах опухолей и гистологически нормальной ткани пациентов немелкоклеточного рака легкого для генов: *miR124a-1/3*, *125b-1*, *127*, *129-2*, *137*, *339* и *375* ($p < 0,05$).

Выводы. Таким образом, новые гиперметилируемые гены мРНК могут найти применение в качестве потенциальных биомаркеров для диагностики немелкоклеточного рака легкого на ранних стадиях

Исследование выполнено при поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ ФГБНУ «НИИОПП».

Оценка элементного состава карциномы легкого Льюиса у мышей при действии *Pastinaca sativa* L., обладающего противоопухолевой активностью

В.П. Дерягина¹, Н.А. Голубкина², Н.И. Рыжова¹,
Л.А. Савлущинская¹, И.С. Голубева¹, К.И. Кирсанов¹
¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва;

²ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»,
Московская обл., Одинцовский район, п. ВНИИССОК

Введение. Ранее была показана способность опухолевых клеток аккумулировать ионы металлов, обладающих генотоксическим эффектом (например ионы кадмия, алюминия, ртути, свинца). Накопление этих элементов в опухолях увеличивает генетическую нестабильность в клетках и способствует быстрому развитию процессов канцерогенеза и опухолевой прогрессии. Снижение концентрации металлов, обладающих генотоксическим эффектом, в опухолях с помощью природных антиканцерогенов и антиоксидантов представляется перспективным подходом для разработки новых стратегий терапии опухолей. Нами было показано, что водно-этанольный (3,2 %) экстракт «черного» пастернака (*Pastinaca sativa* L., (ПЧ), клубни которого подвергались длительной тепловой обработке в условиях высокой влажности) способен ингибировать на 56 % рост подкожно-перевиваемой карциномы Льюиса, а также оказывать антиметастатическое действие, предотвращая у 60 % животных образование метастазов в легких. Вероятно, одним из механизмов такого действия экстракта «черного» пастернака является его способность снижать уровень металлов в самой опухоли.

Цель исследования — сравнительная оценка элементного состава опухолей карциномы Льюиса у мышей, получавших и не получавших ПЧ.

Материалы и методы. Исследование проведено на мышах BDF, которые получали водно-этанольный экстракт ПЧ 14 дней до перевивки карциномы Льюиса и 25 дней — после нее. Определение полифенолов в ПЧ проводили методом Фолина — Чокальтеу, общую антиоксидантную активность анализировали титриметрически. Элементный состав (24 элемента) в опухолях определяли методом масс-спектрометрии на индуктивно-связанной плазме ICP — MS.

Результаты. Продолжительное выдерживание клубней пастернака при 70°C и 95 % влажности увеличивало в 2,8 раза его антиоксидантную активность, способствовало повышению полифенолов в 6,3 раза. ПЧ вызывал достоверные изменения концентрации 15 элементов в опухолях, выраженно уменьшая концентрацию металлов, обладающих генотоксическим потенциалом: Cd (89 %), Pb (90 %), Hg (40 %), Al (39 %), а также микроэлементов Mn (40 %), I (51 %), Sr (28 %)

и Se (39 %). Одновременно ПЧ увеличивал концентрацию Si (121 %), Ca (30 %), V (27 %). Уменьшение содержания металлов, обладающих генотоксической активностью, по всей видимости, связано со способностью флавоноидов ПЧ хелатировать металлы, снижая их токсические и канцерогенные эффекты. Зарегистрированный рост концентрации общего Ca в карциноме Льюиса (часто рассматриваемый как индикатор опухолевой прогрессии) при действии ПЧ может быть следствием некротических процессов, наблюдаемых в опухолях на терминальной стадии роста.

Выводы. Выявлено существенное снижение концентрации проявляющих генотоксичность элементов (Cd, Pb, Hg, Al) в опухолях при действии богатого полифенолами «черного» пастернака, что может вносить свой вклад в его противоопухолевую и антиметастатическую активность.

Исследование профилей экспрессии мРНК 62 генов, участвующих в регуляции основных клеточных функций в неизмененном эпителии разных отделов толстой кишки у здоровых доноров

Е.Л. Джикия, М.В. Захаренко, У.С. Станоевич,
Т.М. Кулинич, Н.В. Мельникова, А.Л. Сенчукова,
Я.Ю. Киселева, В.К. Боженко

ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

Цель исследования — сравнительный анализ молекулярно-генетических фенотипов клеток слизистой оболочки в 5 анатомических отделах толстой кишки в группе условно здоровых доноров путем сопоставления профилей экспрессии мРНК 62 генов, обеспечивающих внутриклеточный гомеостаз и ответственных за основные процессы, участвующие в канцерогенезе.

Материалы и методы. В работе использовался биоптат морфологически неизмененной слизистой оболочки толстой кишки. Образцы были получены в ходе профилактической колоноскопии условно здоровых доноров, проходивших обследование в ФГБУ «РНЦРР» с 2018 по 2019 г. и давших информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено комитетом по биомедицинской этике РНЦРР (протокол №4 от 26.04.18). Анализ экспрессии мРНК 62 генов был проведен методом RT-PCR, всего проанализировано 180 образцов тканей, включавших 33 биоптата восходящего отдела, 35 — поперечного, 35 — нисходящего, 43 — сигмовидного, 34 — прямой кишки.

Результаты. По результатам дискриминантного анализа экспрессии 62 генов молекулярный фенотип тканей прямой кишки достоверно отличается от других

отделов толстой кишки и классифицируется со 100 % точностью. При парном сравнении с отделами ободочной кишки ткани прямой кишки также достоверно отличаются по уровню экспрессии 42 генов. Ключевыми генами, в наибольшей степени определяющими принадлежность образцов к отделу толстой кишки, являлись гены, регулирующие процессы пролиферации (*CCND1*, *HER2/neu*), дифференцировки (*CYP19A*), а также факторы роста (*IGF1*, *SCUBE2*) и факторы иммунного ответа (*IL2Ra*, *IL8*, *IL12a*, *IL15*, *GATA3*).

Выводы. Проведенное исследование позволило оценить молекулярные фенотипы и определить референсные значения уровня экспрессии мРНК 62 генов в 5 отделах толстой кишки здоровых доноров. Выявлена четкая дифференциация профиля экспрессии генов в зависимости от отдела толстой кишки. Полученные результаты создают предпосылки для формирования базы данных значений экспрессии генов с учетом анатомического отдела толстой кишки, а также демонстрируют возможность разработки новых подходов к дифференциальной диагностике патологических процессов.

Анализ числа копий и экспрессии генов ABC-транспортёров в опухоли молочной железы: связь с эффектом неoadъювантной химиотерапии и прогнозом заболевания

Д.С. Долгашева, М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова,
К.А. Гаптулбарова, И.А. Цыденова, Н.В. Литвяков

Научно-исследовательский институт онкологии,
ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»

Цель работы — оценить хромосомные aberrации и уровень транскриптов всех известных 49 генов ABC-транспортёров в опухоли молочной железы.

Материалы и методы. Обследовано 129 больных РМЖ IIА–IIIВ стадии. В качестве материала были использованы биопсийные опухолевые образцы и операционный материал после неoadъювантной химиотерапии. Оценка хромосомных aberrаций (CNA — copy number aberrations) и экспрессии генов ABC во всех образцах опухоли проводилась с использованием микрочипов CytoScanTM HD Array и Clariom S Assay, human.

Результаты. Показано, что частота CNA генов ABC в группе больных с объективным ответом достигает 69 %, а у пациентов без ответа не превышает 40 %. Частота встречаемости делеций генов *ABCB1* (7q21.12) и *ABCB4* (7q21.12) в группе с объективным ответом составляет 17 % (15/88 случаев), в группе больных без ответа — 2,4 % (1/41 случаев), ($p = 0,01$). Ген *ABCB8* делетирован у больных с полной и частичной

регрессией в 19,3 % (17/88) случаев, в группе со стабилизацией и прогрессированием у 2,4 % (1/41) больных ($p = 0,02$). Высокая частота амплификаций гена *ABCB10* сопряжена хорошим ответом на лечение (69,3 %, 61/88 случаев), при этом в группе без ответа данный показатель был в 2 раза ниже (36,6 %, 15/41 случаев) ($p = 0,0003$). Установлено, что пациенты с наличием делеции в генах *ABCB1*, *ABCB4*, *ABCC1*, *ABCC6* имели безметастатическую выживаемость 100 %. 10-летняя безметастатическая выживаемость у данных больных составила 40 и 39 % соответственно для генов *ABCB1/4* и *ABCC1/6*, различия статистически значимые ($p = 0,003$ и $p = 0,01$). Также у больных с люминальным В раком молочной железы оценена экспрессия генов семейства ABC до и после неoadъювантной химиотерапии. В группе с объективным ответом экспрессия статистически значимо снижается 28/49 (57 %) (при $6e-5 < p < 0,04$). У пациентов с отсутствием ответа наблюдается повышение экспрессии большинства генов ABC. Всего экспрессия повышается у 32/49 (65 %), статистически значимо — у 35 %, 17/49 генов (при $6e-4 < p < 0,01$). Анализ связи безметастатической выживаемости с экспрессией показал, что у 16 (41 %) из 39 обследованных пациентов развились отдаленные метастазы в сроки 4–130 мес с момента постановки диагноза. Показатели 1- и 2-летней безметастатической выживаемости составили 94,9 и 75,0 % соответственно, тогда как 5-летняя всего 58,3 %.

Выводы. Показано, что абберации некоторых генов ABC-транспортёров, также как и снижение их экспрессии в процессе неoadъювантной химиотерапии, являются предикторами эффективности терапевтического лечения и потенциальными прогностическими маркерами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 21-15-00243).

ВПЧ16-индуцированные опухоли: роль клеточной микроРНК-135а в механизмах противовирусной защиты

Д.С. Елкин, Р.С. Фасхутдинов, Н.В. Елкина,
Д.Ю. Берлина, Л.С. Павлова, А.Н. Катаргин,
М.Д. Федорова, С.В. Винокурова

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

Введение. Основной причиной развития рака шейки матки является инфекция вирусом папиллом человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска. Чаше инфекция проходит бессимптомно благодаря элиминации вируса иммунной системой. Однако в ряде случаев наблюдается длительная персистенция ВПЧ, сопровождающаяся увеличением экспрессии вирусных онкогенов *E6* и *E7* и прогрессией ВПЧ-ассоциированных

поражений до РШМ. Нарушение эпигенетической регуляции экспрессии вирусных и клеточных генов с вовлечением клеточных микроРНК может являться основной причиной как опухолевой прогрессии при РШМ, так и нарушения противовирусного ответа, обеспечивающего эффективную элиминацию ВПЧ при инфицировании.

Цель работы — исследование клеточных микроРНК, вовлеченных в регуляцию экспрессии вирусных онкогенов и генов противовирусного ответа при РШМ.

Материалы и методы. Количественную оценку уровня микроРНК и мРНК исследуемых генов проводили методом секвенирования нового поколения и количественной ПЦР. Изменение экспрессии исследуемых белков оценивали с помощью Вестерн-блоттинг анализа. Экспрессию генов оценивали после трансфекции клеток цервикальной ВПЧ16-положительной клеточной линии SiHa и первичных культур опухоль-ассоциированных стромальных клеток синтетическими аналогами микроРНК.

Результаты. В ходе исследования была выявлена микроРНК-135а, экспрессия которой снижена в тканях РШМ по сравнению с условно-нормальным прилежащим эпителием, что связано с делециями гена микроРНК-135а, а также зависит от экспрессии вирусного онкогена *E6* и степени метилирования ДНК. Более того, уровень микроРНК-135а в плазме крови пациентов с РШМ значительно снижен по сравнению со здоровыми донорами, что указывает на ее диагностический потенциал. В экспериментах *in vitro* показано, что микроРНК-135а подавляет экспрессию вирусного онкогена *E6*, а также увеличивает экспрессию генов системы врожденной противовирусной защиты. Было показано, что микроРНК-135а секретируется эпителиальными клетками в составе внеклеточных везикул. В опытах *in vitro* показано, что воздействие микроРНК-135а на опухоль-ассоциированные стромальные клетки вызывает в них индукцию экспрессии интерферона-альфа и интерферон-стимулируемых генов, а также секрецию факторов, запускающих противовирусный ответ в эпителиальных клетках.

Выводы. Таким образом, микроРНК-135а является потенциальной противовирусной микроРНК, обладающей диагностическим и терапевтическим потенциалом в отношении ВПЧ16-положительного РШМ.

Вирусные микроРНК как регуляторы экспрессии вирусных и клеточных генов при ВПЧ16-ассоциированном раке шейки матки

Н.В. Елкина, Д.Ю. Берлина, Д.С. Елкин, П.М. Абрамов,
А.Н. Катаргин, Л.С. Павлова, М.Д. Федорова,
С.В. Винокурова

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

Введение. Вирусы папиллом человека (ВПЧ) являются этиологическим фактором РШМ, а также опухолей аногенитальной области и ротоглотки. Механизмы эпигенетической регуляции вирусных и клеточных генов во время нормального вирусного цикла и онкотрансформации недостаточно изучены. Показано, что геномы различных типов ВПЧ кодируют собственные вирусные микроРНК, однако в настоящее время отсутствуют экспериментальные исследования их функций.

Цель исследования — анализ влияния вирусных микроРНК на экспрессию вирусных и клеточных генов и механизмов регуляции экспрессии вирусных микроРНК в ВПЧ16-положительных цервикальных клеточных линиях SiHa и CaSki и в клинических образцах РШМ.

Материалы и методы. Экспрессию вирусных микроРНК ВПЧ16 оценивали в линиях SiHa и CaSki и в образцах РШМ с эписомальной и интегрированной формами генома ВПЧ16. Поиск делеций генома ВПЧ16 проводили на ДНК образцов РШМ методом ПЦР.

Влияние ДНК-метилирования генома ВПЧ16 на экспрессию вирусных микроРНК оценивали после обработки клеток линий SiHa и CaSki 5'-аза-2'-деоксцитидином. Влияние вирусных микроРНК на экспрессию вирусных и клеточных генов оценивали через 72 часа после трансфекции их синтетических аналогов в клетки линий SiHa и CaSki методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Показана экспрессия двух вирусных микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 ВПЧ16 в клетках линий SiHa и CaSki, а также их наличие в составе внеклеточных везикул. Выявлено, что микроРНК-Н1 и микроРНК-Н2 экспрессируются в образцах РШМ эписомальной формой генома ВПЧ16, тогда как в случае интегрированного генома ВПЧ экспрессируется только микроРНК-Н2. Показано, что нарушение экспрессии микроРНК-Н1 в случае интеграции может происходить как в результате делеции, так и за счет гиперметилирования участка ДНК вируса, кодирующего микроРНК-Н1. Показано, что вирусные микроРНК (Н1 и Н2) регулируют экспрессию вирусных онкогенов *E6* и *E7*, а также генов *E1* и *E2*, участвующих в процессах репликации и транскрипции ВПЧ16. *In silico* анализ показал, что вирусные микроРНК могут регулировать различные процессы, включая клеточный цикл, иммунный ответ, адгезию,

инвазию и процессы онкотрансформации и экспериментально показано, что микроРНК ВПЧ16 снижают экспрессию клеточных генов *STAT5*, *ARID5B*, *BNC2* и *SNX27*.

Выводы. Вирусные микроРНК, кодируемые ВПЧ16, могут играть немаловажную роль в регуляции вирусного цикла и различных клеточных процессов, обеспечивая персистенцию вируса и выживание инфицированных клеток.

Взаимосвязь возникновения драйверных мутаций с наличием G-квадруплексных структур в ДНК при канцерогенезе на примере промоторной области гена *TERT*

А. Павлова¹, Э.К. Писарев¹, М.В. Монахова²,
Е.А. Кубарева², М.Э. Зверева¹

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

В основе этиологии онкологических процессов лежит «обогащение» геномов опухолевых клеток мутациями определенных видов в процессе прогрессии опухоли. Выявление молекулярно-биологических механизмов, обуславливающих появление строго определенных единичных нуклеотидных замен (драйверных мутаций) в кодирующей и не кодирующей областях генома — ключевой этап для понимания этого процесса и основа для создания неинвазивной диагностики рака. Нами сформулирована гипотеза, согласно которой появление тканеспецифичных мутаций связано с нарушением репарации геномных повреждений в неканонических структурах ДНК, в частности в G-квадруплексах (G4), образуемых G-богатыми последовательностями. В качестве модельной области генома, содержащей драйверные мутации, выбрана область промотора гена каталитической субъединицы теломеразы (*TERT*). Эти мутации приводят к неограниченному пролиферативному потенциалу и являются ранним событием. Кроме того, промоторная область гена *TERT* была выбрана из-за близкой к 100 % частоте возникновения в ней мутаций при раке мочевого пузыря, глиобластомы, меланомы и др. Образование G4-структур в *TERT*-промоторе может способствовать накоплению специфических точечных мутаций G→A в G-богатой цепи промотора *TERT*, что приводит к появлению новых участков связывания транскрипционных факторов, специфичных для отдельных тканей и активации теломеразы. Мы экспериментально подтвердили возможность образования неканонических структур в промоторной области гена *TERT* и провели поиск факторов

стабилизации G4-структур ДНК. Для этого созданы оригинальные системы, моделирующие *in vitro* образование стабильных G4-структур в тех типах клеток, в которых активация теломеразы связана с появлением высокоспецифичных мутаций в промоторной области *TERT*. Вторичная структура последовательности дикого типа и измененных последовательностей *TERT*-промотора, характерных для специфических «драйверных» мутаций трансформированных клеток, экспериментально протестирована. Найдена неохарактеризованная ранее новая некодирующая РНК, синтезирующаяся в промоторной области гена *TERT*. Исследовано влияние структурных особенностей G-квадруплексов на эффективность функционирования систем эксцизионной репарации «мисматчей» (белки MutS и MutL *E. coli* и *N. gonorrhoeae*) и оснований (урацил-ДНК-гликозилаза *E. coli*).

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00161).

Аффинность сангвинарина, кверцетина, кемпферола и тимохинона к G-квадруплексу, формируемому в промоторном районе гена *c-MYC*

Р.Г. Зенков¹, А.М. Оглоблина¹, Н.Ю. Карпеченко¹,
О.А. Власова¹, Г.Д. Беляев², Н.Г. Долинная²,
К.И. Кирсанов^{1,3}, М.Г. Якубовская¹

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

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

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
Москва

Введение. G-квадруплексы (G4) представляют собой альтернативные структуры ДНК, формируемые гуанин-богатыми последовательностями, которые распространены в геномах эукариот и преимущественно локализованы в промоторах онкогенов. Их взаимодействие с G4-распознающими белками и различными эндогенными и экзогенными факторами стабилизации влияет на экспрессию содержащих их генов. В частности, было продемонстрировано, что лиганды, стабилизирующие G4 из промотора гена *c-MYC*, ингибируют экспрессию этого гена.

Цель исследования — определить константы связывания растительных полифенолов сангвинарина, кемпферола, кверцетина и тимохинона с G4 промотора гена *c-MYC* и дуплексной ДНК, а также оценить возможность стабилизации G4 этими полифенолами.

Материалы и методы. Константы связывания растительных полифенолов к G4 и дуплексной ДНК оценивали с помощью метода замещения

флуоресцентного индикатора (Fluorescent Indicator Displacement, FID). В качестве вытесняемого индикаторного соединения использовали тиазоловый оранжевый (ТО), для которого K_b с G4 промотора гена *c-MYC* известна из ряда опубликованных исследований. В качестве дуплексной ДНК использовали 26-звенный олигонуклеотид, образующий шпильчатую дуплексную структуру, для которой также известна константа связывания ТО. Стабилизацию G-квадруплекса оценивали по изменению температуры плавления (регистрация температурной зависимости УФ-поглощения при 295 нм на спектрофотометре Hitachi U-2900, снабженном термоэлектрическим контролером).

Результаты. Константы связывания растительных полифенолов с G4 промотора гена *c-MYC* составили для сангвинарина — $7,76 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, для кверцетина — $5,33 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, для кемпферола — $1,16 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и для тимохинона — $0,63 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. При этом константы связывания сангвинарина, кверцетина и кемпферола с дуплексной ДНК были соответственно в 6, 139 и 33 раза ниже, а тимохинон вообще не вытеснял ТО из дуплексной ДНК. В присутствии эквимольных количеств сангвинарина и кверцетина наблюдалась стабилизация G-квадруплексной структуры из промотора гена *c-MYC*. В то же время тимохинон и кемпферол даже в 2-кратном избытке по отношению к G4 не влияли на температуру плавления квадруплекса.

Выводы. Растительные полифенолы сангвинарин, кемпферол, кверцетин и тимохинон обладают большей аффинностью к G4 промотора гена *c-MYC* по сравнению с дуплексной ДНК, однако в используемых экспериментальных условиях стабилизация G-квадруплекса регистрировалась лишь в присутствии сангвинарина и кверцетина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-15-01526).

Анализ роли полиморфизмов в гене *POLQ* при раке молочной железы

М.А. Золотых, А.И. Нестерова^{1,2}, А.И. Билялов¹,
А.М. Гимранов², А.А. Жданова^{1,2}, А.А. Ахунзянов¹,
Ю.В. Филина¹, А.А. Ризванов¹, Р.Р. Мифтахова¹

¹Институт фундаментальной медицины и биологии,
ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет»;

²ГАОУЗ «Республиканский клинический онкологический
диспансер МЗ РТ», Казань

Введение. Нарушения в структуре генов, кодирующих белки ДНК-репарационной системы, являются ключевым фактором развития наследственных форм РМЖ. ДНК-полимераза θ , кодируемая геном *POLQ*, участвует в репликации поврежденной ДНК и восстановлении двунитевых разрывов. Ткани опухоли молочной железы характеризуются повышенной экспрессией

данного белка по сравнению с нормальными тканями, при этом роль генетических полиморфизмов *POLQ* в развитии заболевания остается малоизученной.

Цель работы — оценка спектра полиморфизмов гена *POLQ* и их ассоциации с риском развития РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены 67 пациенток с РМЖ, из них 29 — с наследственным трижды негативного подтипа (ТНРМЖ) и 38 — с гормон-рецептор-положительным (люминальным). В контрольную группу включены 36 здоровых добровольцев без онкологической отягощенности в семейном анамнезе. ДНК выделяли из клеток периферической крови, секвенирование проводили на платформе Illumina NextSeq (Illumina, США) с использованием кастомной панели для таргетного обогащения кодирующих участков 21 гена. Для статистической обработки результатов использовали критерии Фишера и хи-квадрат с поправкой на непрерывность (поправка Йетса).

Результаты. Было проанализировано распределение частот полиморфизмов rs487848, rs3218634, rs702017, rs532411, rs1381057, rs3218649, rs3218651, rs139982859, rs41540016, rs3218636, rs2306211, rs3218642 в гене *POLQ* среди пациенток с ТНРМЖ, люминальным РМЖ и в контрольной группе. Гетерозиготные полиморфизмы rs3218634 и rs532411 были выявлены у 21,1 % пациенток с люминальным РМЖ, в то время как у участниц контрольной группы частота составляла 2,8 % (ОШ 9,3, 95 % ДИ 1,22–106,1, $p = 0,003$), полиморфизмы не были выявлены среди пациенток с ТНРМЖ. Согласно алгоритмам SIFT и PolyPhen-2, варианты rs3218634 (p. Leu2538Val) и rs532411 (p. Ala2304Val) приводят к изменению структуры ДНК-полимеразы θ .

Выводы. Однонуклеотидные варианты rs3218634 и rs532411 в гене *POLQ* могут быть ассоциированы с повышенным риском развития гормон-рецептор-позитивного РМЖ.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Полнотранскриптомный анализ опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии

М.К. Ибрагимова^{1,2}, М.М. Цыганов¹, Н.В. Литвяков^{1,2}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

²Институт биологии, экологии, почвоведения сельского и лесного хозяйства ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Цель исследования — проведение полнотранскриптомного анализа опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии (НХТ).

Материал и методы. В исследование включены 60 больных РМЖ T1–4N0–2M0 (IIA — IIIB стадии) люминального В HER2-негативного подтипа, в возрасте 22–68 лет ($46,2 \pm 0,4$). Пациенты получали 4–8 курсов системной НХТ по схемам FAC, AC, CAH, CP, ACT и AT. Материалом служили парные образцы биопсийного (до лечения) и операционного материала (после НХТ) для каждого из пациентов. РНК из исследуемого материала выделялась набором RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany). Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводился на микрочипах Clariom™ S Assay, human (ThermoFisher Scientific, USA). Для анализа данных использована программа Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0.

Результаты. Проведено сравнение экспрессионного профиля пациенток с РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия гематогенного метастазирования до и после проведения НХТ. Было показано, что количество дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) в опухоли до лечения у больных с наличием и без гематогенного метастазирования составило 24 гена (19 Up-regulated, 5 Down-regulated). После проведения НХТ резидуальные опухоли больных с наличием и без гематогенного метастазирования различались по 154 ДЭГ (36 Up-regulated, 118 Down-regulated). Построение диаграммы Венна показало, что ДЭГ у пациентов с наличием/отсутствием гематогенного метастазирования до лечения и после НХТ пересекаются по 1 гену — *EHD2* (19q13.33). *EHD2* признан прогностическим параметром для плоскоклеточного рака пищевода — экспрессия данного гена вовлечена в его патогенез, и может рассматриваться в качестве фактора прогрессирования для пациентов с раком молочной железы. Он является негативным регулятором миграции и инвазии в клетках РМЖ.

Выводы. Оценка изменения экспрессии опухолевых генов в процессе НХТ у больных в зависимости от статуса гематогенного метастазирования может быть полезна для разработки в дальнейшем панели генов, определение изменения которых позволит судить о вероятности возникновения отдаленного метастазирования.

Поиск новых маркеров канцерогенеза щитовидной железы, связанных со статусом рецепторов ER, AR и PR

В.В. Конончук, Е.Ю. Алексеенко, Т.С. Калинина

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск

Введение. В настоящее время существует множество методов исследования, которые позволяют отслеживать состояние щитовидной железы и осуществлять контроль над течением ее заболеваний. Однако по-прежнему не во всех случаях возможно поставить окончательный диагноз до операции. Так, тонкоигольная аспирационная биопсия, применяемая при дооперационной диагностике, не позволяет отличить доброкачественные фолликулярные опухоли (аденомы) от злокачественных (карцином). Рак щитовидной железы чаще встречается у женщин, однако у мужчин чаще развиваются его агрессивные формы. Это указывает на то, что эстрогеновый, прогестероновый и андрогеновый рецепторы (ER, PR и AR) могут играть важную роль в канцерогенезе щитовидной железы. Также представляет интерес связь изменения экспрессии микроРНК (miR) с канцерогенезом щитовидной железы. Однако попытки связать нарушения экспрессии рецепторов с нарушениями экспрессии микроРНК в ходе развития и прогрессии рака щитовидной железы пока не предпринимались.

Материалы и методы. Чтобы найти новые маркеры рака щитовидной железы, мы проанализировали уровни экспрессии ER, PR, AR, микроРНК (miR-19b, -22, -181a, -185, -193b, -205, -221, -222, -378), для которых эти рецепторы являются мишенями, а также других генов-мишеней выбранных микроРНК (ID4, FOXE1, VEGFA, BCL2, ITGB3, SLC24A4, TSHR) в 90 образцах новообразований щитовидной железы с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Образцы были получены в ходе операции в 4-м онкологическом отделении ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница № 1».

Результаты. Выявлено, что доброкачественные новообразования можно отличить от злокачественных по уровням экспрессии miR-181a, miR-205 и их генов-мишеней — PR, VEGFA, BCL2, TSHR. Показано, что уровень miR-22 может быть маркером наличия метастазов в лимфатических узлах: уровень микроРНК снижался у пациентов с метастазами. Также на основании полученных результатов можно предположить, что существует взаимосвязь между уровнями miR-222, -19b, -22, -193b, -205, -181a, -378a и уровнем экспрессии ER, PR, AR при развитии опухоли щитовидной железы.

Выводы. Таким образом, идентифицированы маркеры, по уровню которых можно различить типы опухолей щитовидной железы (miR-181a, miR-205, PR,

VEGFA, BCL2 и TSHR). Показано, что уровень miR-22 связан со статусом лимфатических узлов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-415-543010.

Поиск маркеров канцерогенеза молочной железы, связанных со статусом эстрогенового рецептора

В.В. Конончук, Е.Ю. Алексеенко, Т.С. Калинина

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск

Введение. Достижения в области терапии и диагностики рака привели к увеличению выживаемости женщин с диагнозом РМЖ. Однако при метастатическом РМЖ 5-летняя относительная выживаемость остается около 30 %. Ранее мы идентифицировали микроРНК (miR), потенциально регулируемые эстрогеновым, прогестероновым и андрогеновым рецепторами (ER, PR и AR), изменение уровня которых было связано с наличием метастазов в лимфатических узлах у пациентов с РМЖ (miR-193b, -190a, -190b, -423). Самый распространенный метод диагностики рака — иммуногистохимический анализ. Поэтому поиск белковых маркеров является актуальной задачей.

Материалы и методы. Мы определили предполагаемые гены-мишени для вышеупомянутых микроРНК, которые преимущественно экспрессируются в ткани молочной железы согласно The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>). Проанализировали экспрессию выбранных генов (OXTR, TRPS1, STC2 и AKR1C2) в образцах РМЖ ($n = 117$) и в клетках MCF-7, обработанных в течение 6, 24, 48 ч 100 нМ эстрадиола (E2), прогестерона (P4) или тестостерона (T). Образцы ткани РМЖ и нормальной ткани были собраны в ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница № 1».

Результаты. Уровень мРНК OXTR увеличивался в клетках после инкубации со всеми гормонами. Наиболее значительное увеличение было в клетках, обработанных E2 в течение 48 ч (в 2,4 раза). Уровень мРНК TRPS1 увеличился в 1,6 раза в клетках, обработанных E2 в течение 48 ч, уровень мРНК STC2 — в 1,4 раза после обработки E2 или T в течение 6 ч. Уровень мРНК AKR1C2 снизился в 1,4 раза в клетках, обработанных T, в течение 24 и 48 ч. Экспрессия E2-чувствительных OXTR, STC2, TRPS1 была увеличена в ER-и/или PR-положительных опухолях по сравнению с ER-и-PR-отрицательными опухолями. Было обнаружено, что уровень мРНК OXTR и TRPS1 выше в опухолях пациентов с метастазами в лимфоузлах при люминальных опухолях, не экспрессирующих HER2.

Выводы. Таким образом, наше исследование указывает на связь между экспрессией OXTR, STC2, TRPS1

и экспрессией ER при РМЖ. Мы обнаружили, что повышенный уровень мРНК *OXTR* и *TRPS1* является потенциальным маркером метастазирования в лимфоузлы при ER-и/или PR-положительных опухолях с иммуногистохимической оценкой HER20.

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

Метагеномный профиль опухолей предстательной железы

Д.С. Кутилин, Д.И. Оверкин

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

Введение. Рак предстательной железы является вторым по распространенности онкологическим заболеванием, диагностируемым у мужчин во всем мире. В настоящее время представлено множество данных о влиянии урогенитальных инфекций на развитие злокачественных опухолей мочеполовой системы. Хроническое воспаление — один из ключевых факторов развития рака предстательной железы, но исследований взаимосвязи между инфицированностью конкретными микроорганизмами и риском данного заболевания мало. Лабораторные методы (бакпосев) позволяют определить лишь незначительную часть микробиома сообщества. Современным методом, позволяющим выявить широкий спектр бактерий и архей, является высокопроизводительное секвенирование библиотек фрагментов рибосомальных оперонов.

Цель работы — анализ биопсийных образцов злокачественных и доброкачественных (гиперплазия, аденома) опухолей предстательной железы для идентификации потенциальных онкопатогенов.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты с раком предстательной железы T2a-3bN0M0 (II–III стадии) и пациенты с аденомой предстательной железы. Таксономический анализ бактериального сообщества проводили путем высокопроизводительного секвенирования гипервариабельной области V3-V4 гена *16S* рРНК с праймерами 319F (5'-ACTCCTACGGGAGGCA GCAG-3')/806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') на платформе Illumina. Таксономическая идентификация последовательностей *16S* проводилась с помощью баз данных RDP (SILVA), CosmoID Metagenomics, KEGG Pathogen, MicrobeNet и PATRIC 3.6.8. Линейный дискриминантный анализ (LDA) бактериального сообщества между группами с раком и аденомой предстательной железы проводили на языке R.

Результаты. Было выявлено таксономическое многообразие микроорганизмов в образцах рака и аденомы предстательной железы (от 130 до 800 различных микроорганизмов домена Bacteria). Дискриминантный анализ позволил установить различия между образцами рака и аденомы предстательной железы, касающиеся представителей родов *Prevotella*, *Veillonella*, *Oxobacter*,

Varibaculum, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Actinobacter*, *Enhydrobacter*, *Bdellovibrio*, *Klebsiella*, *Shinella*, *Tepidimonas*, *Haemophilus*, *Aerococcus*, *Sporosarcina* и *Lactococcus*.

Выводы. Исследование позволило установить особенности метагеномного профиля образцов рака предстательной железы, отличающиеся от аденомы предстательной железы: повышенное количество представителей родов *Prevotella*, *Veillonella*, *Oxobacter*, *Rhodococcus*, *Actinobacter*, *Enhydrobacter*, *Bdellovibrio* и *Klebsiella*, а также наличие (в отличие от аденомы предстательной железы) неклассифицированных представителей родов *Varibaculum*, *Mycobacterium*, *Shinella*, *Tepidimonas*, *Haemophilus*, *Aerococcus*, *Sporosarcina* и *Lactococcus*.

Мутации в регуляторном домене ДНК-метилтрансферазы DNMT3A, наблюдаемые у пациентов с гематологическими заболеваниями, нарушают метилирование ДНК

А.Г. Лойко, А.И. Генатуллина, Е.С. Громова

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

Введение. Канцерогенез сопровождается интенсивным изменением профиля метилирования ДНК. Ген *de novo* ДНК-метилтрансферазы *DNMT3A* часто мутирует у пациентов с такими заболеваниями, как острый миелоидный лейкоз, миелодиспластический синдром и др. Недавно обнаружено, что наряду с мутациями в активном центре *DNMT3A* имеются мутации в регуляторном PWWP-доме фермента, отвечающем за его взаимодействие с нуклеосомой за счет узнавания ДНК и хвоста гистона H3, триметилированного по 36-му остатку лизина (H3K36me3). Такие мутации ассоциированы с плохим прогнозом течения онкозаболеваний, однако их роль в функционировании фермента неизвестна.

Цель исследования — определение влияния ряда мутаций в регуляторном PWWP-доме на каталитическую активность *DNMT3A*.

Материалы и выводы. Получены конструкции, несущие мутантные варианты PWWP-домена, наиболее часто встречающиеся у онкогематологических больных: P307R, R326H и W409R. Мутантные формы полноразмерного фермента и изолированного PWWP-домена были экспрессированы в клетках штамма *E. coli* BL21 (DE3) и выделены методом аффинной хроматографии. Эффективность метилирования ДНК определялась по защите ДНК, метилированной *DNMT3A*, от расщепления эндонуклеазой рестрикции Hin6I. Комплексообразование PWWP-домена с компонентами нуклеосомы изучалось по торможению в геле

ДНК-дуплекса, меченного флуоресцеином (F-ДНК), а также по поляризации флуоресценции флуоресцентно-меченного пептида рНЗК36ме3, имитирующего хвост гистона НЗК36ме3.

Результаты. Неожиданно мутация R326H привела к снижению метилирующей активности полноразмерной *DNMT3A* в 4 раза, в то время как мутации P307R и W409R практически полностью подавили ее активность. Мутантные формы P307R и W409R в контексте изолированного PWWP-домена, в отличие от R326H, подвергались сильной внутриклеточной фрагментации. Мутация R326H, в свою очередь, умеренно ослабила взаимодействие PWWP с пептидом рНЗК36ме3 и F-DNA.

Мутация остатка P307, примыкающего к карману связывания хвоста гистона НЗК36ме3, сказалась на устойчивости PWWP-домена и одновременно на каталитической активности *DNMT3A*. Мутация W409R приводила к аналогичному эффекту, несмотря на далекое расположение остатка от места связывания НЗК36ме3. Умеренное влияние мутации R326H на способность PWWP-домена к связыванию компонентов нуклеосомы находится в хорошем согласии с неполным снижением каталитической активности в рамках полноразмерного фермента.

Выводы. Таким образом, мутации вне каталитического домена могут иметь прямое влияние на функционирование *DNMT3A*. Полученные данные позволят установить связь между нарушенным функционированием мутантных форм *DNMT3A* и развитием патологий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-04-00533).

Современные взгляды на молекулярно-генетические основы первичных аневризменных костных кист: перспективы патогенетической терапии

Г.Н. Мачак¹, А.И. Снетков¹, А.А. Снетков¹, Д.В. Рогожин², Л.А. Семенова³

¹ФГБУ «НМИЦ травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, Москва;

²Обособленное структурное подразделение Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

³ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва

Первичные аневризменные костные кисты (пАКК) — доброкачественные опухоли, которые встречаются преимущественно в детском и подростковом возрасте, характеризуются местнодеструктивным ростом

с потенциальной угрозой ортопедических осложнений. Основным методом лечения остается хирургический, однако при агрессивном течении и сложных анатомических локализациях операции сопряжены с высоким риском функциональных потерь. В последние годы ведется поиск альтернативных, менее инвазивных подходов при сложных клинических ситуациях. Одним из них является антирезорбтивная терапия (АРТ) бисфосфонатами или ингибиторами RANKL. Литературные данные, а также собственные клинические наблюдения свидетельствуют о положительном клинко-рентгенологическом эффекте АРТ при местно-распространенных процессах, когда наступает значительное снижение активности кисты, ее оссификация, ячеисто-трабекулярная перестройка и уменьшение кистозного компонента. После АРТ некоторым пациентам могут выполняться менее агрессивные хирургические вмешательства. Молекулярные механизмы данных эффектов до конца не понятны и продолжают изучаться. Установлено, что в основе патогенеза пАКК лежат транслокации с участием протоонкогена *USP6*, расположенного в 17-й хромосоме (17p13.2). В промоторную зону перемещаются гиперактивные промоторы других генов (*CDH11*, *COL1A1*, *RUNX2* и др., всего не менее 24 генов), в результате чего инициируется транскрипция гена *USP6*. Эта драйверная мутация запускает онкогенную программу, включающую подавление остеобластической дифференцировки опухолевых клеток (ингибирование (↓) BMP-4, стимуляция (↑) Gremlin-1, Smurf ↑, Runx2 ↓, Wnt ↓, IGF-1 ↓, IGF-2 ↓), формирование воспалительного микроокружения (NF-κB ↑, c-Jun-AP-1 ↑, MMP-9 и 10 ↑, JAK2-STAT3 ↑), стимуляцию ангиогенеза (VEGF ↑), стимуляцию остеокластогенеза (RANKL ↑, M-CSF ↑), формирование порочного круга (деградация внеклеточного матрикса → высвобождение факторов роста → поддержание онкогенеза в опухолевых клетках, а также рекрутинг, стимуляция роста и функции остеокластов) и др. Результатом гиперэкспрессии *USP6* является нарушение механизмов костеобразования с преобладанием остеоклазии над остеогенезом. Предполагается, что АРТ оказывает влияние на молекулярные механизмы формирования костной ткани и межклеточный диалог на уровне микроокружения. В докладе будут представлены современное состояние проблемы, собственные клинические наблюдения, а также направления дальнейших исследований патогенетической терапии пАКК.

Скрининг варианта с. 1967_1969dupGTC в гене *BARD1* у больных раком яичников и здоровых женщин из Республики Башкортостан

Э.Т. Мингажева¹, Я.В. Валова^{1,2}, А.Д. Шайдуллина¹,
Д.С. Прокофьева¹, Э.К. Хуснутдинова^{1,3}

¹Башкирский государственный университет, Уфа;

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

³Институт биохимии и генетики ФГБНУ «Уфимский
федеральный исследовательский центр РАН»

Введение. Рак яичников является одной из наиболее часто встречающихся и агрессивных гинекологических опухолей у женщин. Одним из важных факторов риска рака яичников выступает наследственная предрасположенность. Высокий риск данной патологии в первую очередь связан с мутациями в генах-супрессорах опухолевого роста *BRCA1* и *BRCA2*. В развитие рака яичников также вовлечены другие гены с умеренной и низкой пенетрантностью. Одним из основных генов с низкой пенетрантностью, играющим важную роль в процессе гомологичной рекомбинации и репарации, является ген *BARD1*. В результате ранее проведенного таргетного секвенирования образцов ДНК больных наследственным раком яичников у 1 пациентки в 10-м экзоне гена *BARD1* был обнаружен ранее неизвестный вариант с. 1967_1969dupGTC, приводящий к сдвигу рамки считывания — p. (Gly656_Pro657insArg).

Цель работы — скрининг варианта с. 1967_1969dupGTC в гене *BARD1* в группе больных раком яичников и индивидов контрольной группы.

Материалы и методы. В качестве материала исследования были использованы образцы ДНК, выделенные из венозной крови больных наследственными формами рака яичников ($n = 47$), спорадическим раком яичников ($n = 264$) и женщин без онкологических заболеваний на момент забора крови ($n = 332$) из Республики Башкортостан. Генотипирование проводилось методом ПЦР-ПДРФ анализа.

Результаты. В ходе исследования вариант с. 1967_1969dupGTC в гене *BARD1* был обнаружен только у 1 (0,32 %) пациентки в гетерозиготном состоянии. Носительница изучаемого варианта по этнической принадлежности является русской. По клиническим данным у пациентки один из наиболее агрессивных типов рака яичников — серозный с высокой степенью злокачественности. У носительницы данного варианта не обнаружено зародышевых мутаций в высокопенетрантных генах *BRCA1* и *BRCA2*.

Выводы. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о низкой частоте встречаемости (0,32 %) варианта с. 1967_1969dupGTC в гене *BARD1*, приводящей к сдвигу рамки считывания, среди больных раком яичников из Республики Башкортостан.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 182909129, № 20-34-90003, государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FZWU-2020-0027).

Биоинформатический анализ потенциального участия транскрипционных факторов IRF3/IRF7 в активации проапоптотических сигнальных путей

И.А. Невзоров, К.Г. Шевченко^{1,2}, А.А. Дакс¹, Н.А. Барлев^{1,2}

¹ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва

Введение. Транскрипционные факторы IRF3 и IRF7 являются одними из важнейших факторов, участвующих в запуске провоспалительного ответа. Их основной ролью является регуляция экспрессии генов, кодирующих интерферон, — *IFNa* и *IFNb*, а также интерферон-стимулируемых генов. Данные гены вовлечены в патогенез различных заболеваний, в том числе онкологических, и являются привлекательной мишенью для разработки противоопухолевой терапии. При этом их связь с активацией клеточной гибели остается малоизученной.

Цель работы — биоинформатический анализ возможных путей участия IRF3/7 в проапоптотическом ответе, в том числе при онкологических заболеваниях, таких как рак поджелудочной железы.

Материалы и методы. Выбор генов-мишеней для анализа осуществлялся на основании литературных данных, при этом промоторные и энхансерные последовательности были выбраны из баз данных GeneCards, Ensembl и EPDnew. При помощи программного обеспечения MEME suite был проведен сравнительный анализ 131 энхансерных и промоторных регионов проапоптотических генов и 66 аналогичных регионов антиапоптотических генов, для которых в общей сложности известно 59 уникальных сайтов связывания транскрипционными факторами IRF3 или IRF7.

Результаты. В результате сравнительного анализа промоторных и энхансерных областей всех исследованных генов были определены 5 консенсусных последовательностей, распознаваемых транскрипционными факторами IRF3 и IRF7. Для проапоптотических генов было 5 таких сайтов связывания, при этом 2 из них были общими для IRF3 и IRF7, 2 — уникальными для IRF7 и 1 — уникальным для IRF3. Аналогичный анализ антиапоптотических генов показал

наличие 10 сайтов связывания исследуемых транскрипционных факторов, 3 из которых были общими для IRF3 и IRF7, 4 — уникальны для IRF3 и 3 — уникальны для IRF7. Важно отметить, что последовательности обоих уникальных сайтов связывания IRF7 для проапоптотических генов на 100 % совпали с таковыми для антиапоптотических.

Выводы. Данное наблюдение позволяет предположить более значимую роль этого транскрипционного фактора в регуляции апоптоза, чем предполагалось ранее. В дальнейшем мы планируем осуществить валидацию обнаруженных нами генов-мишеней IRF3/7, участвующих в запуске апоптоза, *in vitro* с использованием клеточных моделей рака поджелудочной железы человека.

Работа выполнена при поддержке госзадания по тематике «Исследование фармакологических мишеней, биологически активных соединений и систем их доставки в организм человека».

Индукция гибели опухолевых клеток катионными пептидами как перспективный способ преодоления лекарственной устойчивости

А.В. Онян¹, Н.А. Королева¹, А.А. Рудакова¹, А.И. Костарев¹,
К.В. Кожихова², С.М. Андреев², М.А. Барышникова¹,
А.А. Лушникова¹

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

²ФГБУ «Государственный научный центр Институт
иммунологии» ФМБА России, Москва

Введение. Ранее мы показали, что катионные пептиды с дендримерной структурой индуцируют апоптоз опухолевых клеток в результате взаимодействия с гиперэкспрессированными шаперонными белками нуклеолином (NCL) и нуклеофозмином (NPM). Такие катионные пептиды актуальны для терапии диссеминированных опухолей с приобретенной лекарственной устойчивостью (ПЛУ) как противоопухолевые агенты, а также как средство доставки препаратов, например доксорубина, в опухолевые клетки.

Цель исследования — анализ цитотоксичности катионных пептидов *in vitro* на культурах клеток с ПЛУ.

Материалы и методы. Четыре катионных пептида с дендритной молекулярной структурой, м. в. до 2 кДа, зарядом от 4+ до 14+, перевиваемые клеточные линии РМЖ HBL100 и резистентной к доксорубину линии HBL100/Dox, клеточные линии множественной миеломы RPMI 8226 и резистентной к бортезомибу RPMI 8226 BTZ, стромальной опухоли кишечника GIST/T1naive и резистентной к ипилимумабу (Гливек) GIST/T1 IMR, контроль — фибробласты кожи

человека линий H1036 и Wi38. Культуры клеток предоставлены Н.И. Моисеевой, Л.А. Лалетиной, П.Б. Копниным и А.Ю. Александровой (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина). Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Цитотоксичность катионных пептидов в разведениях 0,5–4 мкг/мл оценивали в стандартных МТТ-тестах на 3-суточных культурах в 3 независимых опытах, а также при инкубации суточных культур с флуоресцентно меченым Су-5 катионным пептидом с последующим окрашиванием Хекст 33342, DAPI или трипановым синим и иодистым пропидием. Для вестерн-блоттинга и иммуногистохимии использовали первичные моноклональные антитела к NCL, NPM, p53 и вторичные мышинные антитела (Abcam), для ОТ-ПЦР — Verco cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Sci.), для проточной цитометрии — меченые FITC каспазы 3,8 и 9, для анализа взаимодействий катионных пептидов (лиганда) с клеточными мишенями и докинга — пакет программ Maestro.

Результаты. Несмотря на различную природу ПЛУ и мутантный статус опухолевых клеток в изучаемых линиях, МТТ-тесты показали высокую избирательную цитотоксичность тестируемых катионных пептидов в отношении как чувствительных к препаратам, так и резистентных опухолевых клеток и нетоксичность в контроле. Это указывает на общий механизм индукции клеточной гибели. По результатам вестерн-блоттинга, ОТ-ПЦР он связан с инактивацией в опухолевых клетках NPM, NCL, а также со снижением экспрессии KPNA2 (импортин альфа1), вовлеченного в ядерно-цитоплазматический транспорт. В результате нарушаются ключевые функции клетки: пролиферация, сборка хроматина, биогенез рибосом, транскрипция, трансляция, внутриклеточный и межклеточный транспорт молекул, индуцируется апоптоз. После двухчасовой инкубации опухолевых клеток в присутствии Су-5-КП также наблюдался апоптоз, иммуногистохимическое окрашивание выявило совместную локализацию катионных пептидов, NCL, NPM и p53 в клеточном ядре/ядрышках с последующим экспортом NPM в цитоплазму.

Выводы. На перевиваемых клеточных линиях опухолевых клеток с ПЛУ показана специфичная цитотоксичность 4 катионных пептидов, обусловленная активацией каспаз и p53-зависимым апоптозом, индуцированным при связывании с пептидами рецепторного NCL, гиперэкспрессированного на мембранах опухолевых клеток. Данные катионных пептидов перспективны для дальнейшего исследования *in vivo*.

Необычный характер взаимодействия ключевых белков системы репарации «мисматчей» с фрагментом промотора гена *TERT*, содержащим G-квадруплексы

А.В. Павлова¹, В.Ю. Савицкая¹, М.В. Монахова²,
М.Э. Зверева¹, Е.А. Кубарева²

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Введение. Системы репарации ДНК играют важную роль в поддержании устойчивости генома. Распространенной мишенью взаимодействия для белков репарации являются G-квадруплексы (G4), образование которых сопряжено с генетической нестабильностью. Примечательно, что промоторы онкогенов обогащены последовательностями, способными формировать G4. Интересной и практически значимой моделью для исследования взаимодействий белков репарации с G4 является участок промотора гена обратной транскриптазы теломеразы человека (*hTERT*), формирующий 3 tandemных квадруплекса. В геноме человека при некоторых типах злокачественных опухолей определенные позиции в данной последовательности часто подвергаются точечным мутациям, включая 60–80 % уротелиальных карцином, меланом и глиобластом.

Цель работы — исследование взаимодействия белков системы репарации «мисматчей» (MMR) с одноцепочечным G-богатым участком промотора гена *hTERT*, формирующим G4.

Материалы и методы. В работе использовали рекомбинантные белки *MutS*, *MutL* *E. coli* (*ecMutS* и *ecMutL*), а также *MutL* *N. gonorrhoeae* (*ngMutL*). Модельные одноцепочечные ДНК включали нативные и мутантные последовательности *hTERT-G4* (в частности содержащие нуклеотидные замены G228A, G250A и двойную замену G242A/G243A).

Результаты. С помощью химического пробинга подтверждено формирование G4 модельными ДНК, в том числе мутантными. Нуклеотидные замены в некоторой степени дестабилизируют, но не разрушают структуру G4. Показано эффективное связывание вариантов *hTERT-G4* с *ecMutS*, *ecMutL* и *ngMutL*. Взаимодействие модельных *hTERT-G4* с *MutS* характеризуется в несколько раз большим сродством (с константами диссоциации в диапазоне 15–30 нМ), чем *MutL* (110–170 нМ для *MutL E. coli* и 80–105 нМ для *MutL N. gonorrhoeae*). В случае *ecMutS* наблюдается увеличение сродства к tandemным *hTERT-G4* по сравнению с одноцепочечной ДНК (95 н. о.), содержащей единичный G4. Мы продемонстрировали значительно сниженную способность

ngMutL, обладающего в отличие от *ecMutS* эндонуклеазной функцией, гидролизовать *hTERT-G4*, а также изменение паттерна расщепления по сравнению с гидролизом ДНК, не содержащих G4. Длина продуктов гидролиза *hTERT-G4* соответствует расщеплению в промежутках между G4, но не внутри структур.

Выводы. Мутации в *hTERT-G4* существенным образом не влияют на сродство ключевых белков MMR к ДНК. В то же время образование G4 в промоторе *hTERT* может влиять на стадию инициации репарации белками *MutL*, обладающими эндонуклеазной функцией.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 21-14-00161).

Ядерные структуры при изменениях экспрессии цитоплазматических изоформ актина

С.Д. Панина¹, В.Б. Дугина^{1,2}, М.В. Новикова³,
П.Б. Копнин³

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва;

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;

³Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», Москва.

Цель работы — изучение морфологических изменений в ядре при изменении соотношения цитоплазматических изоформ β- и γ-актина.

Материалы и методы. Для изменения экспрессии β или γ цитоплазматических изоформ актина в клетках человека линий карциномы легкого A549 (ATCC® CCL-185TM) и РМЖ MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26TM) использовали метод РНК-интерференции с помощью лентивирусных генно-инженерных конструкций. Был выполнен иммунофлуоресцентный анализ (IF и N-SIM), использованы методы проточной цитометрии, RT-PCR, вестерн-блоттинг, функциональные тесты *in vitro* и морфометрия.

Результаты. Повышение экспрессии β-актина или подавление экспрессии γ-актина снижают инвазивность и пролиферативный потенциал опухолевых клеток. Проведен поиск ядерных мишеней, на которые влияют изменения экспрессии изоформ актина. Выявлены иммуноцитохимические и морфологические различия ядер и ядерных структур: изменения морфологии ядра и хроматина, накопление ламина В в ядерной оболочке. Были исследованы морфология и распределение ядерных телец, а также уровень экспрессии и накопления ядрышковых белков. Выявлены возможные функции β-актина: контроль размера ядра, плоидности и упаковки хроматина, поддержание стабильности ядерной оболочки. Напротив, возможные функции γ-актина заключаются в декомпактизации

хроматина и снижении стабильности ядерной оболочки.

Выводы. Изменение экспрессии β - или γ -актина влияет на структуру ядра. В частности, относительное подавление экспрессии β -актина влечет за собой изменения, связанные с опухолевой прогрессией: изменение плоидности, структуры хроматина и оболочки ядра. Подавление экспрессии γ -актина, напротив, приводит к нормализации плоидности, компактизации хроматина и увеличению стабильности ядерной ламина.

*Исследование выполнено при поддержке РНФ
грант № 20-15-00321*

Биоинформатический анализ соматических мутаций в контексте образования G-квадруплексов в промоторе гена *TERT* и в других онкогенах

В.В. Панова, Е.Р. Тулаева¹, К.А. Новоселов¹, Е.А. Кубарева²,
М.Э. Зверева¹, А.В. Алексеевский²

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова»;

²Научно-исследовательский институт физико-химической
биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский госу-
дарственный университет им. М.В. Ломоносова»

Введение. Мутации в промоторной области гена обратной транскриптазы теломеразы (*TERT*) наблюдаются при различных видах рака. В ней детектируются G-квадруплексы. Полагают, что G-квадруплексы регулируют транскрипцию генов, что подтверждается полногеномными биоинформатическими исследованиями: участки связывания факторов транскрипции мРНК обогащены G4-мотивами. Ранее в нашей группе было экспериментально показано, что белки MutS и MutL из системы MMR (mismatch repair system) образуют прочные комплексы с G4, которые могут снизить эффективность репарации ДНК. Мы предполагаем, что G4 могут быть «горячими точками» мутаций.

Цель — определение положения последовательностей G4 в промоторах онкогенов и анализ мутаций в этих последовательностях.

Материалы и методы. Рассматривались последовательности промоторов 8 онкогенов (в том числе *TERT*) и 5 генов «домашнего хозяйства». Данные последовательности были получены из базы данных NCBI. Нахождение G4-последовательностей осуществлялось поиском классических G4-мотивов с помощью программы G4Hunter. Обогащение мутациями оценивалось по данным базы dbSNP.

Результаты. Установлено, что во всех исследуемых промоторах есть хотя бы одна последовательность G4, при этом в 5 она находится менее чем за 100 пар нуклеотидов от начала гена. G4-мотивы статистически

значимо ($p < 10^{-6}$) обогащены SNP, что подтверждает гипотезу о возможном нарушении репликации и/или репарации вторичной структурой G4. В промоторе *hTERT* выявлено 9 онкоассоциированных мутаций. Из них 7 находятся в области G4. Соматические мутации *hTERT*, известные в контексте рака мочевого пузыря, также находятся в области G4.

Выводы. Показано, что в промоторах *TERT* различных млекопитающих находятся 3 консервативных последовательности, способные к образованию G4. Для верификации полученных данных проведен расширенный поиск 157 генов *TERT* млекопитающих с длиной промоторных областей не менее 1000 пар нуклеотидов. Старты транскрипции определены в соответствии с аннотацией мРНК. Проверка положения стартов трансляции проводилась путем сравнения аминокислотных последовательностей крупнейших изоформ белка *TERT* различных видов млекопитающих. Анализ последовательностей генов *TERT* с нетипичным N-концом проводился отдельно, что позволило исправить возможные ошибки аннотации.

*Работа поддержана Российским научным фондом
(проект № 21-14-00161).*

Динамика уровня метилирования ретротранспозонов в крови больных раком кишечника в ответ на терапию

А.А. Пономарева¹, Е.Ю. Рыкова^{2,3}, К.Р. Салиева⁴,
А.А. Тарасова¹, Д.Н. Костромицкий¹, А.Ю. Добродеев¹,
С.А. Афанасьев¹, Н.В. Чердынцева^{1,4}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный
исследовательский медицинский центр РАН»;

²ФГБУН «Федеральный исследовательский центр институт
цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск;

³Новосибирский государственный технический
университет;

⁴Национальный исследовательский Томский
государственный университет

Введение. Одним из признаков злокачественной трансформации является общее снижение уровня метилирования (гипометилирование ретроэлементов — LINE, Alu и др.). Известно, что при онкопатологиях в составе внеклеточной циркулирующей ДНК (цирДНК) плазмы крови и цирДНК, связанной с поверхностью клеток крови (скп-цирДНК), накапливаются фрагменты опухолеспецифичных метилированных ДНК, которые являются потенциальными онкомаркерами. Показано, что уровень метилирования LINE-1 элементов значимо увеличивается в цирДНК плазмы крови у больных раком кишечника по сравнению со здоровыми донорами. Однако нет данных относительно динамики изменения уровня метилирования LINE-1 в ответ на проведенное противоопухолевое лечение при раке толстого кишечника.

Цель исследования — сравнительный анализ уровня метилирования LINE-1 повторов в цирДНК крови больных раком кишечника до и после проведенного противоопухолевого лечения.

Материалы и методы. Получены образцы крови от больных раком кишечника ($n = 10$) до лечения, после химиотерапии и на 10–15-е сутки после операции. Определяли концентрацию метилированных фрагментов LINE-1 (LINE-1 met) и фрагментов LINE-1 (LINE-1 Ind), не содержащих CpG-нуклеотиды, методом количественной метил-специфичной ПЦР. Индекс метилирования вычисляли по формуле ИМ (%) = $100 \times (\text{LINE-1 met} / \text{LINE-1 Ind})$.

Результаты. Ранее показано, что фракция скп-цирДНК является более информативным источником материала для оценки статуса метилирования, по сравнению с цирДНК плазмы, в связи с этим в настоящей работе проведено исследование уровня метилирования LINE-1 повторов в составе скп-цирДНК. Индекс метилирования LINE-1 в скп-цирДНК были значимо выше (в 2,5 раза) у больных РЛ после резекции опухоли (критерий Манна–Уитни, $p = 0,012$). При этом уже после проведенной неoadъювантной химиотерапии наблюдалось увеличение (в 1,5 раза) индекса метилирования LINE-1 в скп-цирДНК крови ($p = 0,05$).

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности исследования расширенной группы пациентов с раком кишечника до лечения и в процессе их динамического наблюдения с целью оценки эффективности противоопухолевой терапии.

Анализ уровней экспрессии двадцати микроРНК в опухолях молочной железы

И.В. Пронина¹, А.М. Бурденный¹, Т.П. Казубская²,
В.И. Логинов¹

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва;

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

Введение. МикроРНК известны как «тонкие» регуляторы различных сигнальных путей в клетке. Они действуют на посттранскрипционном уровне, приводя к деградации мРНК-мишени или остановке трансляции. В последнем случае, не смотря на детектируемый высокий уровень транскрипции гена, конечный белковый продукт в клетке отсутствует или его содержание значительно снижается.

Цель работы — исследование экспрессии ряда микроРНК при раке молочной железы (РМЖ) для определения их роли в патогенезе заболевания и выявления потенциальных мишеней для таргетной терапии.

Материалы и методы. Нами была исследована экспрессия 20 микроРНК в 35 «парных» образцах РМЖ с использованием наборов TaqMan™ MicroRNA Reverse

Transcription Kit и TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix, а также MicroRNA Assays фирмы Applied Biosystems.

Результаты. Наиболее частые и значимые изменения экспрессии в опухоли по сравнению с парной гистологически неизменной тканью показаны для *miR-124a* и *miR-125b* — экспрессия снижена в 5 и более раз в 22 (62,8 %) случаях из 35 для обеих микроРНК ($p < 0,01$). Кроме того, экспрессия *miR-193a-5p* также снижалась в 17 (48,6 %) случаях из 35, а экспрессия *miR-375* была повышена в 5 и более раз в 16 (45,7 %) случаях из 35 ($p < 0,01$). Для *miR-203* и *miR-9* было показано как снижение экспрессии в 11 (31,0 %) и 9 (25,7 %) из 35 случаев соответственно, так и повышение — в 5 (14,3 %) и 7 (20,0 %) случаях соответственно.

Выводы. При РМЖ в патогенезе заболевания могут играть роль изменения уровней экспрессии следующих микроРНК: *miR-124a*, *miR-125b*, *miR-193a-5p* и *miR-375*.

Снижение экспрессии длинных некодирующих РНК *CCAT1* и *UCA1* в опухолях молочной железы

И.В. Пронина¹, А.М. Бурденный¹, Т.П. Казубская²,
В.И. Логинов¹

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва;

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

Введение. Для длинных некодирующих РНК (днРНК) показано конкурентное взаимодействие с микроРНК, что ингибирует их связывание с «мишенью». Это делает днРНК новыми активно изучаемыми факторами регуляции различных процессов в клетках, которые потенциально можно использовать для диагностики, прогнозирования течения и выбора тактики лечения злокачественных новообразований.

Цель работы — проведение пилотного исследования изменения в опухолях молочной железы уровня экспрессии ряда днРНК для определения их роли в патогенезе РМЖ и выявления потенциальных мишеней для таргетной терапии.

Материалы и методы. Нами был проведен анализ уровней экспрессии днРНК *CCAT1*, *DSCAM-AS1*, *OIP5-AS1*, *TUG1* и *UCA1* в парных образцах опухолей и условно нормальной ткани 22 пациентов с РМЖ. Для проведения обратной транскрипции использовали вырожденные гептамеры в качестве праймеров и набор компании «Евроген» MMLV RT kit. ПЦР проводили на приборе CFX96 Touch Bio-Rad с праймерами, подобранными таким образом, чтобы получить для анализа максимальное количество транскриптов днРНК, и готовой реакционной смесью qPCRmix-HS SYBR («Евроген»).

Результаты. В проанализированных образцах опухолей молочной железы случаев повышения экспрессии исследуемых днРНК по сравнению с парным образцом гистологически неизменной ткани выявлено не было. Снижение экспрессии наблюдали для *CCAT1* в 14 случаях (62 %, $p < 0,05$), для *UCA1* — в 17 (77 %, $p < 0,05$). Экспрессия *DSCAM-AS1* снижалась в 8 случаях (38 %), *OIP5-AS1* — в 9 (41 %), *TUG1* — в 5 (23 %). Хотя данные результаты не являются статистически значимыми, нами отмечена тенденция к более частому снижению экспрессии *DSCAM-AS1*, *OIP5-AS1* и *TUG1* на III и IV стадиях РМЖ.

Выводы. В патогенезе развития РМЖ могут играть роль изменения уровней экспрессии следующих длинных некодирующих РНК: *CCAT1* и *UCA1*.

Скрининг фитонутриентов на способность реактивировать эпигенетически репрессированные гены в тест-системе HeLa TI

А.Ю. Прус¹, В.П. Максимова¹, О.А. Власова¹,
К.И. Кирсанов^{1,2}, М.Г. Якубовская¹

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

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Введение. Патогенез таких злокачественных новообразований, как РМЖ, лейкозы, колоректальный рак, включает нарушения механизмов эпигенетической регуляции транскрипции, приводящие к соответствующим изменениям в основных клеточных процессах. В результате аберрантной активности эпигенетических ферментов происходят инактивация генов-онкосупрессоров и активация онкогенов. В настоящее время ведется активный поиск препаратов, способных за счет влияния на гистоновые деацетилазы, метилтрансферазы и ДНК-метилтрансферазы реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированных генов. Многообещающим объектом исследований последних лет в онкофармакологии являются фитонутриенты — биологически активные соединения природного происхождения, обладающие противовоспалительными, антиоксидантными и антиканцерогенными свойствами.

Цель исследования — анализ реактивации эпигенетически репрессированного гена *GFP* в клетках HeLa TI при действии 8 фитонутриентов.

Материалы и методы. Объектами исследования были выбраны апигенин, гинсенозид Rb1, сангвинарин, кемпферол, нарингенин, эпигаллокатехина галлат, генистеин и кверцетин. В качестве тест-системы для исследования использовали клетки HeLa TI — клетки карциномы шейки матки (HeLa) с интегрированным вектором на основе вируса саркомы птиц, несущим эпигенетически репрессированный ген *GFP*. Исследуемое соединение считалось эпигенетически

активным при двукратном увеличении количества *GFP*-положительных клеток (в сравнении с отрицательным контролем).

Результаты. Полученные данные показали, что в максимальных нетоксических концентрациях апигенин увеличивает количество *GFP*-положительных клеток относительно отрицательного контроля в 5,8 раза, сангвинарин — в 6,8 раза, EGCG — в 11,3 раза, генистеин — в 2,5 раза. Гинсенозид Rb1, кемпферол, кверцетин и ресвератрол не вызвали статистически значимого изменения в количестве клеток с *GFP*-положительным фенотипом.

Выводы. По результатам эксперимента можно заключить, что такие препараты, как апигенин, эпигаллокатехина галлат, сангвинарин и генистеин, способны к реактивации экспрессии эпигенетически репрессированных генов. Эти сведения позволяют рассматривать данные фитонутриенты в качестве перспективных кандидатов для использования в терапии опухолей с аберрантным эпигенетическим профилем.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-15-01526).

Валидация результатов полногеномных исследований методом секвенирования по Сэнгеру: актуальность и особенности

М.А. Ревкова, В.С. Михайлов, Н.Р. Соколова, С.А. Сафина,
Д.А. Родионова, М.В. Макарова, О.В. Сагайдак,
Е.Е. Баранова, А.А. Криницына, М.С. Беленикин

Медико-генетическая лаборатория ООО «Эвоген», Москва

Введение. Применение метода высокопроизводительного секвенирования (NGS) для обследования пациентов с диагностированными злокачественными новообразованиями значительно повышает выявляемость потенциально значимых генетических вариантов, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами. Актуальность валидации выявленных NGS генетических вариантов альтернативным методом (секвенированием по Сэнгеру) по данным научной литературы нередко вызывает дискуссию.

Материалы и методы. ДНК выделяли из лейкоцитов венозной крови (QIAamp DNA Blood Mini Kit). WGS по протоколу PCR-free проводилось на базе DNBSeq-G400 («MGI»). При пробоподготовке для секвенирования по Сэнгеру для ПЦП использовали ДНК-полимеразы SNPdetect и Tersus (ЗАО «Евроген»), Q5 MMix («NEB»), условия подбирали согласно рекомендациям производителя. Секвенирование по стандартному протоколу проводили на ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific), обработку результатов — с помощью Variant Reporter Software v3.0.

Результаты. За период с 01.02.2021 по 14.10.2021 проведена валидация методом секвенирования по Сэнгеру 243 потенциально значимых герминальных генетических вариантов, выявленных с помощью NGS у пациентов со злокачественными образованиями и подозрением на наследственный опухолевый синдром. В 7 (2,9 %) случаях из 243 наблюдались расхождения аннотированных результатов NGS с результатами валидации по Сэнгеру. В 6 образцах по результатам NGS аннотирован вариант гена *BRCA2* chr13:32398609insT (с. 10095_10096insT) (hg38), а по результатам секвенирования по Сэнгеру выявлен вариант chr13:32398608delinsGAATTATATCT. В 1 образце по результатам NGS аннотированы 2 варианта гена *DACH1* — chr13:71866535delinsCGCCGCCG и chr13:71866544_71866545insTT, которые не подтверждены секвенированием по Сэнгеру, однако выявлен вариант chr13:71866542_71866543delinsTT. Следует также отметить, что в 1 % валидационных исследований наблюдалось влияние ДНК-полимеразы и условий ПЦР на этапе амплификации фрагмента геномной ДНК на результаты интерпретации.

Выводы. Приведенные результаты иллюстрируют актуальность секвенирования по Сэнгеру в качестве метода валидации результатов NGS.

Выявление компаундных гетерозигот по генам, потенциально ассоциированным с предрасположенностью к развитию рака молочной железы

Д.А. Родионова, М.А. Ревкова, В.С. Михайлов, Н.Р. Соколова, С.А. Сафина, М.В. Макарова, О.В. Сагайдак, Е.Е. Баранова, А.А. Криницына, М.С. Беленикин

Медико-генетическая лаборатория ООО «Эвоген», Москва

Введение. Выявление патогенных вариантов генов, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами, играет ключевую роль в определении генетически обусловленного риска развития рака молочной железы и/или яичника. По данным научной литературы в разных популяциях было отмечено наличие двойных гетерозигот по генам, связанным с предрасположенностью к развитию злокачественных новообразований. Исследования, основанные на методе высокопроизводительного секвенирования, позволяют выявлять новые варианты генов и их сочетания, потенциально ассоциированные с повышенным риском злокачественных новообразований, у пациентов с РМЖ и/или яичника.

Материалы и методы. Подготовку проб и полногеномное секвенирование ДНК образцов крови пациентов с РМЖ и/или яичника проводили с использованием протокола пробоподготовки без ПЦР и секвенатора

DNBSeq-400 (MGI, Китай). Выявленные генетические варианты валидировали методом секвенирования по Сэнгеру с использованием капиллярного секвенатора ABI3500 (Thermo Fisher Scientific) по стандартному протоколу с использованием уникальных праймеров.

Результаты. В рамках научно-исследовательской работы за период с 01.02.2021 по 14.10.2021 были проведены полногеномное секвенирование и аннотирование 446 образцов ДНК пациентов с диагностированным РМЖ и/или яичника. По результатам исследования в 2 образцах было выявлено одновременное наличие двух гетерозиготных вариантов в генах, потенциально ассоциированных с развитием РМЖ: в 1-м образце — гена *BRCA2* с. 171del и гена *CHEK2* с. 599T>C, во 2-м — гена *BRCA2* с. 7617+1G>T и гена *CHEK2* с. 599T>C. Еще в одном образце было выявлено 3 гетерозиготных варианта: гена *BRCA1* с. 5266dup, гена *CHEK2* с. 599T>C и гена *ATM* с. 6860G>C. Еще в одном образце была обнаружена двойная мутация в гене *CHEK2* в 5-м и 10-м экзонах — с. 599T>C и 972C>G соответственно.

Выводы. В результате проведенного анализа в отдельных случаях наблюдалась гетерозигота по двум и более герминальным мутациям, наличие которых потенциально может быть связано с особенностями патогенеза заболевания.

Влияние полиморфизма T444G гена *APEX1* на чувствительность клеток к цисплатину при раке яичников

А.Р. Сагдеева¹, Я.Ф. Шамсутдинова², Р.Р. Галимова², Ю.В. Филина¹, Р.Н. Мингалеева¹, М.А. Золотых¹, А.Р. Рахматуллина¹, А.Г. Сабиров², А.А. Ризванов¹, Р.Р. Мифтахова¹

¹ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»;

²ГАОУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ», Казань

Введение. Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 (*APEX1*) играет ключевую роль в системе эксцизионной репарации оснований (англ. base excision repair — BER) и участвует в окислительно-восстановительной регуляции транскрипционных факторов. Согласно проекту 1000 Genomes однонуклеотидный полиморфизм гена *APEX1* rs1130409 (с. T444G, р. D148E) встречается почти у 38 % населения мира. Полиморфизм *APEX1* T444G может быть генетическим фактором риска развития различных типов рака и влиять на эффективность химиотерапевтического лечения.

Цель исследования — оценить влияние полиморфизма T444G на чувствительность к цисплатину при раке яичников.

Материалы и методы. Мы использовали технологию редактирования генов *CRISPR/Cas9* для получения нокаута гена *APEX1* в клетках аденокарциномы яичников

OVCAR4. Нокаут подтвердили секвенированием по Сэнгеру и количественным анализом экспрессии белка с помощью вестерн-блоттинга. Затем с помощью лентивирусной трансдукции получили OVCAR4 с геном *APEX1* дикого типа (генотип *TT*), клетки с генотипом *GG* и *TG*. Пролиферацию клеток и токсичность цисплатина измеряли с помощью МТТ-теста. Для оценки вклада *APEX1-T444G* в фенотип раковых клеток оценили морфологию клеток с помощью конфокальной микроскопии, провели анализ клеточной адгезии, миграции и распределения фаз клеточного цикла с использованием проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Обнаружено, что пролиферация, морфология и распределение фаз клеточного цикла клеток OVCAR4 с гомо- и гетерозиготным полиморфизмом гена *APEX1 rs1130409* не отличаются от характеристик контрольных клеток. Наблюдалось достоверное различие в значении IC50 клеток с генотипом *GG*, *TT* и нокаутных клеток по сравнению с клетками, несущими дикий тип гена *APEX1* ($p < 0,0001$, $p = 0.004$ и $p < 0,0001$ соответственно). Определено, что для клеток с генотипом *TT* IC50 цисплатина составляет 5,2 мкМ (ДИ = 4,8–5,6), для *GG* – 8,9 мкМ (ДИ = 7,7–10,2), для клеток с генотипом *TG* – 6,9 мкМ (ДИ = 6,2–7,6) и достигает 7,9 мкМ (ДИ = 7–8,9) для клеток с нокаутом *APEX1*. Гомозиготный полиморфизм *APEX1-T444G* приводил к увеличению миграции и адгезии клеток OVCAR4 как при воздействии цисплатина, так и в необработанной культуре. Обработка цисплатином вызывает более высокую экспрессию *APEX1* в клетках с генотипом *GG* ($45,0 \pm 2,3$ %).

Выводы. Гомозиготная замена *T444G* в гене *APEX1* снижает чувствительность клеток аденокарциномы яичников к цисплатину.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-00-00263) и в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

Профиль метилирования генов некодирующих РНК при раке молочной железы

А.Д. Селезнева¹, Е.А. Филиппова², А.Д. Селезнева¹, С.С. Лукина², Т.П. Казубская³, И.В. Пронина², Э.А. Брага², А.М. Бурденный², В.И. Логинов²

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва;

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

Введение. Рак молочной железы является лидирующим онкозаболеванием у женщин в мире. В настоящее время не существует достоверной и полной информации о точных механизмах его возникновения, по этой причине все результаты лечения остаются относительно удовлетворительными. Все это показывает важность поиска новых молекулярных маркеров, позволяющих оценить прогрессию РМЖ.

Более 20 лет назад микроРНК (миРНК) начали рассматривать и изучать как новый класс РНК. Оказалось, что функция миРНК как «мастера-регулятора» может контролироваться другими некодирующими РНК, в частности длинными некодирующими РНК (днРНК). Регуляторные функции днРНК были выявлены в опухолях разных локализаций, в том числе и при РМЖ.

Цель работы — изучение уровня метилирования CpG-островков генов миРНК и днРНК как потенциальных маркеров РМЖ.

Материалы и методы. В исследовании использовали выборку 20 парных (опухоль/норма) образцов РМЖ. Анализ метилирования проводился с использованием метода количественной метилспецифичной ПЦР. Статистический анализ значимости изменений уровней метилирования выполнен с применением непараметрического U-теста Манна–Уитни. Использованы программы IBM SPSS Statistics 22. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. Исследован статус метилирования 6 генов миРНК и 6 генов днРНК, установлены значимые различия между уровнями метилирования в образцах опухолей и гистологически нормальной ткани пациентов с РМЖ для генов: *miR125B-1*, *127*, *137*, *1258*, *MEG3*, *ZNF667-AS1*, *SEMA3B-AS1* ($p < 0,001$). Выявлены значимые корреляции частоты метилирования ряда генов миРНК и днРНК с прогрессией РМЖ: *miR125b-1*, *137*, *SEMA3B-AS1*, *MEG3* — со стадией рака ($p < 0,01$), *miR127* и *miR1258* — с размером опухоли ($p \leq 0,05$), *miR125b-1* и *ZNF667-AS1* — с метастазированием ($p < 0,01$).

Выводы. Таким образом, статус метилирования CpG-островков ряда миРНК и днРНК в опухоли может найти применение при разработке новых диагностических и прогностических тестов при РМЖ.

Оценка субпопуляций В-лимфоцитов в микроокружении рака молочной железы в зависимости от статуса PD-L1

Л.А. Таширева, С.Ю. Золотарева, А.Ю. Калинин,
Н.О. Попова, В.М. Перельмутер

ФГБНУ «Томский научно-исследовательский
медицинский центр РАН»

Введение. Общепринято считать, что экспрессия PD-L1 в опухоли является следствием предсуществующего иммунного ответа *Th1*-подобного типа. Однако экспрессию PD-L1 в опухоли могут потенцировать не только IFN γ , но также цитокины, характерные для *Th2*-иммунного ответа, например IL-27. Поэтому в случае применения ингибиторов PD-L1 в таких ситуациях возможно отсутствие эффекта от терапии и даже гиперпрогрессия заболевания.

Цель исследования — сравнить профили В-лимфоцитов в опухолевом микроокружении у больных РМЖ с различным статусом PD-L1.

Материал и методы. В исследование вошло 8 больных люминальными формами инвазивной карциномы молочной железы (T1-2N0-2M0). Тестирование PD-L1 было выполнено с помощью иммуногистохимического исследования (клон SP142, Ventana, США). С помощью лазерной микродиссекции (PALM, Zeiss, Германия) были изолированы участки опухолевой стромы с инфильтрирующими ее клетками. Далее с помощью SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2 — Pico Input Mammalian (Takara, США) получены библиотеки и проведено секвенирование (NextSeq500, Illumina, США). Алгоритм xCell был использован для оценки 64 типов иммунных и стромальных клеток с использованием профилей сигнатур генов, уникальных для каждого типа клеток.

Результаты. Алгоритм xCell выявил в микроокружении опухоли больных 5 типов В-лимфоцитов. В PD-L1-позитивных опухолях преобладали сигнатуры плазматических клеток ($p = 0,0009$), в то время как в PD-L1-негативных — В-клетки памяти ($p = 0,0120$).

Выводы. Признаки реализованного *Th2*-иммунного ответа преобладают в микроокружении PD-L1-позитивных опухолей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (№ 20-75-10033).

Анализ жизнеспособности и опухолевого потенциала опухолевых клеток рака молочной железы

М.С. Третьякова, М.А. Буддаков, В.В. Алифанов,
Е.В. Денисов, В.М. Перельмутер, Н.В. Чердынцева

ФГБНУ «Томский научно-исследовательский
медицинский центр РАН»

Введение. Рак молочной железы является одной из наиболее часто встречающихся злокачественных опухолей у женщин. Одна из основных злокачественных характеристик опухоли — неоднородность ее клеточного состава или внутриопухолевая гетерогенность. Поэтому вопрос о жизнеспособности различных субпопуляций остается открытым.

Цель исследования — изучение жизнеспособности и опухолевого потенциала опухолевых клеток РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включен послеоперационный материал пациенток с раком молочной железы в возрасте 18–65 лет до лечения ($n = 15$). Клетки выделяли из опухоли путем механической диссоциации. Далее клетки культивировали в стандартных условиях в среде EpiCult (2D культивирование) и MammoCult (3D культивирование). Анализ пролиферативной активности и опухолеобразующей способности (туморогенности) клеток оценивался несколькими методами: по количеству клеточных колоний в монослойной культуре, а также по росту опухолей. Было проведено фенотипирование клеток, а также анализ апоптотической клеточной гибели и жизнеспособности.

Результаты. Процентное соотношение популяций клеток на основании определения экспрессии EpCam, CK7 и N-cadherin оценивалось до и после культивации клеток. Высокая жизнеспособность (65 %) наблюдалась в популяциях CD45-EpCam-CK7/8+CD44-CD24-Ncadh- (преобладающая популяция) и CD45-EpCam-CK7/8+CD44-CD24-Ncadh+ при культивировании в монослой. Опухолевые клетки, культивированные в 3D, образовывали сфероиды в 93 % случаях ($n = 14$), средний размер сфероида составлял 125 мкм. Клетки имели позитивную окраску с кальцеином, что показывало более высокую клеточную жизнеспособность по сравнению с 2D-культивированием. Сфероиды подвергались клеточному распаду при более длительном культивировании (10–14 дней), что говорит о высоком опухолевом потенциале клеток РМЖ *in vitro* независимо от популяционного состава.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ 19-75-30016 «Новая технология прогнозирования и профилактики отдаленного метастазирования на основе детекции циркулирующих метастаз-индуцирующих и нишеобразующих клеток и их специфических мишеней»

Влияние субъединицы хроматин-ремоделирующего комплекса PBAF – BAF200 на экспрессию NF-κB зависимых генов

А.В. Феоктистов¹, С.Г. Георгиева¹, Н.В. Сошникова²

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

²ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва

Введение. Семейство факторов транскрипции ядерного фактора-κB (NF-κB) вовлечено в воспалительные заболевания, вирусные инфекции и рак. NF-κB индуцирует экспрессию различных провоспалительных генов. Такая индуцируемая экспрессия отличается от базальной экспрессии многократным увеличением уровня мРНК соответствующих генов в считанные минуты после получения клеткой сигнала. Молекулярные механизмы, отвечающие за индуцируемую и базальную транскрипцию, различны. Комплекс MEDIATOR является коактиватором NF-κB-индуцируемой транскрипции. Он способствует пространственному сближению энхансеров и промоторов, участвует в привлечении ремоделирующих и модифицирующих гистоны дополнительных коактивационных комплексов, которые меняют структуру хроматина при индукции транскрипции. Киназный модуль комплекса MEDIATOR состоит из 4 белков (MED12, MED13, CDK8/19, CYCC) и особенно важен в регуляции экспрессии провоспалительных генов.

Цель работы – изучение взаимодействия субъединиц ремоделирующего хроматин комплекса PBAF и комплекса MEDIATOR, а также их влияние на индуцируемую транскрипцию провоспалительных генов.

Результаты. Мы показали, что при осаждении специфическими антителами из клеточного лизата субъединица специфического модуля комплекса PBAF, отвечающего за связывание с хроматином – BAF200, осаждала субъединицы киназного модуля: CDK8, MED12 и коровую субъединицу MED1. Также антитела против коровой субъединицы PBAF – BAF155 осаждали MED1 и MED12. В реципроктных преципитациях антитела против MED12 осаждали BAF155 и другую субъединицу специфического модуля PBAF – BRD7. Эти взаимодействия специфичны для комплекса семейства PBAF, но не BAF и позволяют предположить функциональную вовлеченность комплекса PBAF в регуляцию индуцируемой транскрипции. В процессе активации NF-κB-зависимой транскрипции с помощью TNF-α при нокдауне BAF200 среди генов, стимулируемых CDK8 киназой, мы выявили 3 группы генов: увеличивающих, уменьшающих и не меняющих свою транскрипцию.

Вывод. В дальнейшем планируем изучить рекрутирование и распределение субъединиц комплексов MEDIATOR и PBAF на промоторы в процессе

индукции провоспалительных генов и выяснить роль субъединиц киназного модуля MEDIATOR в этих процессах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 21-14-00258).

Гиперметилированные гены длинных некодирующих РНК в опухолях рака молочной железы; связь с клинико-морфологическими параметрами опухоли

Е.А. Филиппова¹, С.С. Лукина¹, А.М. Бурденный¹, И.В. Пронина¹, Н.А. Иванова¹, Т.П. Казубская², В.И. Логинов¹, Э.А. Брага¹, Н.Е. Кушлинский²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва;

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

Введение. Эпигенетические механизмы, такие как метилирование промоторных CpG-островков, играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов, включая гены длинных некодирующих РНК (днРНК), которые участвуют в патогенезе РМЖ.

Цель работы – оценить вовлеченность ДНК-метилирования генов днРНК в развитие и прогрессию РМЖ.

Материалы и методы. Анализ метилирования проводили с использованием количественной ПЦР, специфичной для метилирования, в 30 парных (опухолевых/нормальных) образцах РМЖ. Достоверность результатов оценивали по статистике R (U-критерий Манна–Уитни, критерий Колмогорова–Смирнова, SPSS 20; $p < 0,05$).

Результаты. Анализ уровня метилирования 15 днРНК (*MEG3*, *GAS5*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *TINCR*, *MALAT*, *HOTAIR*, *MAGI2-AS3*, *PLUT*, *SSTR5-AS1*, *SNHG1*, *SNHG6*, *ZEB1-AS1*) выявил статистически значимое ($p < 0,001$) многократное повышение уровня метилирования 9 генов днРНК (*MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3*, *PLUT*, *SSTR5-AS1*, *SNHG6*), из которых для 6 генов днРНК (*SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *PLUT*, *SSTR5-AS1*, *SNHG6*) гиперметилирование в опухолях больных РМЖ обнаружено впервые. Выявлено статистически значимое ($p < 0,001$) повышение уровня метилирования *MEG3*, *SEMA3B-AS1*, *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *ZNF667-AS1*, *MAGI2-AS3*, *PLUT*, *SSTR5-AS1*, *SNHG6* на более поздних стадиях (III–IV против I–II). Высокий уровень метилирования днРНК *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *PLUT*, *SSTR5-AS1*, *SNHG6* значимо ($p < 0,05$) связан с увеличением размера опухоли (T1/T2 против T3/T4), а *HAND2-AS1*, *KCNK15-AS1*, *MAGI2-AS3*, *PLUT*,

SSTR5-AS1 ($p < 0,05$) — с наличием метастазов в лимфатические узлы (N0M0 против NxMx). Показано значимое ($p = 0,01$) увеличение уровня метилирования *HAND2-AS1* при снижении уровня дифференцировки (G1/G2 против G3/G4) опухолевых клеток.

Выводы. Идентифицированы 9 генов днРНК, гиперметилированных с высоким уровнем в опухолях РМЖ, которые можно использовать как новые биомаркеры для диагностики заболевания. Показана связь гиперметилирования данных генов с прогрессией РМЖ, что можно использовать в новых подходах к тактике его прогноза и лечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-75-00126).

Анализ ассоциации VNTR – полиморфизма гена антагониста рецептора интерлейкина–1 (*IL1RN*) с риском развития рака яичников

О.К. Харина, А.В. Коростелева¹, Э.Т. Мингажева¹,
Д.С. Прокофьева¹, Я.В. Валова^{1,2}, Э.К. Хуснутдинова^{1,3}

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа;

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

³Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр РАН»

Введение. Рак яичников является третьей по частоте встречаемости онкопатологией женских репродуктивных органов. Отсутствие характерных симптомов и плохо разработанные методы профилактики и скрининга рака яичников обуславливают высокий уровень смертности на протяжении последних 10 лет. Рак яичников относят к гетерогенным патологиям, но не вызывает сомнения, что пусковым механизмом злокачественной трансформации выступают генетические изменения в клеточном геноме. При исследовании молекулярных механизмов патогенеза рака яичников большую роль отводят компонентам иммунной системы, нарушения которых могут приводить к неполноценности иммунного контроля или неспособности иммунной системы сопротивляться росту опухоли.

Цель работы — исследование роли полиморфного локуса rs2234663 гена *IL1RN* в канцерогенезе яичников у женщин из Республики Башкортостан.

Материалы и методы. В работе проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов данного полиморфного локуса у больных раком яичников ($n = 262$) и индивидов контрольной группы ($n = 278$). Генотипирование осуществлялось методом ПЦР-анализа.

Результаты. В результате проведенного исследования установлено, что аллель *IL1RN*1* достоверно чаще (73,38 %) встречается среди здоровых женщин, чем среди пациенток (65,68 %) ($OR = 0,69$, 95 % CI:

(0,5–0,92), $p = 0,01$). Также показано, что носительство аллеля *IL1RN*3* является фактором риска для женщин с отягощенным семейным анамнезом, находящихся в постменопаузальном периоде ($OR = 9,95$, $p = 0,02$). Установлено, что аллель *IL1RN*1* достоверно чаще встречается среди здоровых женщин (73,38 %) по сравнению с больными sporadическим раком яичников с III–IV стадией заболевания (63,01 %) ($OR = 0,62$, 95 % CI: (0,42–0,91), $p = 0,018$). Также выявлено, что гомозиготный генотип *IL1RN*1/1* является протективным для женщин с поздними стадиями рака ($OR = 0,44$, 95 % CI: (0,26–0,75), $p = 0,002$), а носительство гетерозиготного генотипа *IL1RN*1/2*, напротив, служит маркером повышенного риска в группе больных с III–IV стадиями рака яичников ($OR = 2,08$, 95 % CI: (1,23–3,50), $p = 0,005$).

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о существенном вкладе полиморфного локуса rs2234663 гена *IL1RN* в патогенез рака яичников у женщин из Республики Башкортостан.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 20-34-90003, № 18-29-09129, государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (FZWU2020-0027).

Исследование соматических мутаций гена *PIK3CA* у больных раком молочной железы

И.А. Цыденова^{1,2}, М.М. Цыганов¹, М.К. Ибрагимова^{1,2},
Н.В. Литвяков¹

¹Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Цель работы — исследование основных соматических мутаций гена *PIK3CA* в опухоли пациентов с РМЖ и поиск связи с основными клинико-патологическими характеристиками и эффектом неoadъювантной химиотерапии (НХТ).

Материалы и методы. В исследование было включено 29 больных с люминальным В раком молочной железы IIА–IIВ стадии. Всем пациентам назначали 4–6 курсов НХТ, после чего проводили операцию, затем 2 курса адъювантной химиотерапии, а лучевую терапию и/или гормональное лечение назначали по показаниям. Материалом для исследования служили биопсийные опухолевые образцы до лечения и операционные образцы после НХТ. ДНК выделяли набором QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany). Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы Affymetrix

(USA) CytoScanTM HD Array. Образцы эквимольно смешивали и секвенировали на платформе MiSeq (Illumina).

Результаты. В 8 (28 %) образцах был детектирован аллельный дисбаланс с последующей идентификацией делеции гена *PIK3CA* у 2 пациентов и амплификации у 6. В результате скрининга образцов на наличие наиболее распространенных мутаций в гене *PIK3CA* было установлено, что у 21 пациента отсутствовали изменения, у остальных (28 % всех случаев) идентифицировано 5 различных соматических изменений: с. 3140A>G (p. His1047Arg), с. 3140A>T (p. His1047Leu), с. 1624G>A (p. Glu542Lys), с. 1633G>A (p. Glu545Lys), с. 3145G>C (p. Gly1049Arg). В группе пациентов с наличием мутаций у 50 % пациентов наблюдалась амплификация гена *PIK3CA* (4/8 пациентов), у 37,5 % — нормальная копия гена (3/8 пациентов) и у 1 пациента — делеция исследуемого гена. Мутация с. 3140A>G была обнаружена у 4 пациентов с хорошим ответом на проводимую терапию. Мутация гена с. 3140A>T обнаружена у 1 пациента с рецидивом заболевания. У остальных пациентов ответ на проводимую химиотерапию был более 80 %.

Выводы. В результате исследования установлено, что наиболее распространенная мутация среди пациентов (однонуклеотидная замена с. 3140A>G (p. His1047Arg) связана с хорошим ответом на лечение, а мутация с. 3140A>T (p. His1047Leu) ассоциирована с низкими показателями безрецидивной выживаемости.

Оценка взаимодействия ряда природных полифенолов с дуплексной ДНК с помощью метода микроскопического термофореза

И.А. Чернова¹, О.А. Власова, А.М. Варижук²,
М.Г. Якубовская¹

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

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины ФМБА» России, Москва

Введение. Одним из механизмов антиканцерогенной активности ряда растительных полифенолов считается непосредственное взаимодействие с двухцепочечной ДНК, влияющее на ДНК-опосредованное функционирование целого ряда белков. В последнее время для изучения межмолекулярных взаимодействий

начали использовать метод микроскопического термофореза (MST), который основывается на измерении подвижности в растворе флуоресцентно меченых макромолекул при их связывании с лигандами в зависимости от температурного градиента. Преимущество данного метода заключается в малом объеме образца, высокой процессивности и небольшой трудоемкости.

Цель исследования — определение с помощью MST констант связывания с ДНК следующих соединений: кемпферол, апигенин, сангвинарин, кверцетин, ресвератрол, физетин, кумарин, берберин, EGCG, нарингенин, куркумин, генистеин, тимохинон, дельфинидин, гинзенозид gbl.

Материалы и методы. Измерения MST проводили с постоянной концентрацией флуоресцентно меченой Су5226-звенного олигонуклеотида, формирующего в буферном растворе дуплексную (шпильчатую) структуру. Концентрацию полифенолов в растворе с ДНК варьировали от 500 до 30 нМ путем 2-кратного разведения. В качестве контроля использовали раствор с ДНК без добавления лиганда. Раствор с флуоресцентно мечеными молекулами ДНК и исследуемыми соединениями-лигандами помещают в капилляры, которые подвергали воздействию инфракрасного лазера для достижения градиента температур. В зоне нагрева регистрировали изменение флуоресценции растворов ДНК с разным содержанием полифенолов и на основе этих данных рассчитывали константу диссоциации дуплекс ДНК-полифенол. Все измерения MST проводили с помощью системы анализа аффинностей NanoTemper Monolith NT. 115 (NanoTemper Technologies GmbH, Германия).

Результаты. Из 15 проанализированных соединений константу связывания с ДНК удалось определить для кемпферола — $(3,17 \pm 5,07) \times 10^3$, апигенина — $(1,28 \pm 3,31) \times 10^3$, сангвинарина — $(6,71 \pm 0,46) \times 10^4$, берберина — $(1,60 \pm 3,67) \times 10^3$ и кверцетина — $(9,01 \pm 0,04) \times 10^3$. Константы связывания остальных полифенолов определить с помощью данного метода не удалось из-за отсутствия значимого влияния лиганда на подвижность дуплексов. Таким образом, в единой экспериментальной системе с помощью MST получены данные о связывании кемпферола, апигенина, сангвинарина, берберина и кверцетина с дуплексной ДНК.

Выводы. Полученные данные позволяют рассматривать одним из механизмов действия вышеперечисленных растительных полифенолов непосредственное взаимодействие с ДНК и влияние на структуру хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-15-01526).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОГРЕССИИ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕЙ

Функционирование орфановых рецепторов в клетках аденокарциномы ободочной кишки человека при моделировании окислительного стресса *in vitro*

Ю.В. Абаленихина, А.А. Сеидкулиева, А.В. Щулькин,
Е.Н. Якушева

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

Введение. Ядерные рецепторы — суперсемейство факторов транскрипции клеток, которые ответственны за регуляцию экспрессии генов посредством взаимодействия с соответствующими лигандами, коактиваторами и корепрессорами. К ядерным рецепторам относят класс орфановых рецепторов, а именно конститутивный андростановый рецептор (CAR) и рецептор прегнана Х (PXR). До недавнего времени данные рецепторы рассматривались только в качестве ксено-сенсоров, однако позже стала известна их роль в регуляции метаболических процессов организма, а также в качестве терапевтической мишени, что свидетельствует не только о фундаментальной, но и прикладной роли данных рецепторов.

Материалы и методы. Исследование выполнено на клетках линии Сасо-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека). Окислительный стресс моделировали добавлением в питательную среду H_2O_2 в концентрации 0,1–100 мкМ и инкубировали в течение 24 и 72 ч. Степень выраженности окислительного стресса оценивали по уровню карбонильных производных белков. Относительное количество CAR и PXR определяли методом вестерн-блоттинга. Статистическую обработку результатов проводили дисперсионным анализом.

Результаты. Концентрация карбонильных производных белков не изменялась при инкубации с H_2O_2 в концентрациях 0,1–1 мкМ в течение 24 ч и 0,1–10 мкМ — 72 ч. Окислительный стресс развивался при воздействии H_2O_2 : при концентрации 5–100 мкМ — 24 ч, при 50–100 мкМ — 72 ч ($p < 0,05$). Воздействие H_2O_2 в течение 24 ч в концентрациях 0,1–100 мкМ достоверно не влияло

на относительное количество CAR. Увеличение экспозиции с прооксидантом до 72 ч приводило к статистически значимому повышению (в %) количества CAR относительно контрольных значений при концентрациях H_2O_2 5 мкМ (на 21,4), 10 мкМ (на 47,8) и 50 мкМ (на 35,3), а при 100 мкМ — к снижению на 22,6 %.

Экспозиции с H_2O_2 до 24 ч приводила к повышению (в %) количества PXR при концентрации H_2O_2 10 мкМ (на 67,1), 50 мкМ (на 25,9) и 100 мкМ (на 35,9). Увеличение длительности воздействия до 72 ч сопровождалось нормализацией уровня PXR при концентрации H_2O_2 0,1–10 мкМ и его снижением (в %) при 50 мкМ (на 18,6) и 100 мкМ (на 26,9) по сравнению с контролем, что свидетельствует об окислительном повреждении белка.

Заключение. В клетках линии Сасо-2 активность орфановых рецепторов CAR и PXR зависит от степени выраженности окислительного стресса, таким образом, воздействие прооксидантов может рассматриваться как способ регуляции экспрессии CAR и PXR.

Система регуляции клеток иммунной системы с учетом действия микроРНК при опухолевом процессе

А.А. Абдувалиев, М.С. Гильдиева, М. Сайдалиева,
М.Б. Хидирова

НИИ развития цифровых технологий и искусственного интеллекта, Ташкент, Республика Узбекистан

Цель исследования — математическое моделирование регуляторных механизмов функционирования иммунной системы с учетом временных взаимоотношений для анализа активирующих либо супрессирующих влияний различных факторов на количество CD4- и CD8-лимфоцитов с учетом действия на их активности циркулирующей микроРНК.

Материалы и методы. Применялись методы математического моделирования на основе системы функционально-дифференциальных уравнений с запаздывающими аргументами, бифуркационного и фрактального анализа, технология построения фазовых и параметрических портретов.

Результаты. Приводятся результаты математического моделирования функционирования иммунной системы в норме и при опухолевых процессах. Показано наличие в модели регуляторных механизмов иммунной системы режимов устойчивого стационарного состояния (норма), угасания (апоптоз), стабильного автоколебательного поведения (норма), нерегулярного функционирования (ЗНО) и эффекта резких деструктивных изменений — эффекта «черная дыра» (метастаза), в зависимости от различных концентраций CD4-, CD8-лимфоцитов и микроРНК. Результаты работы позволяют определять состояние нормы, критический уровень содержания CD4-, CD8-лимфоцитов и микроРНК, разработать эффективные меры по улучшению состояния иммунной системы в целом.

Заключение. Результаты качественных и количественных исследований показывают, что модели регуляторных механизмов функционирования иммунной системы с учетом временных взаимоотношений и действия циркулирующей микроРНК позволяют эффективно изучать основные закономерности возникновения опухолевых процессов, частоты хромосомных aberrаций с полиморфными вариантами генов, которые происходят на основе нарушения колебательных процессов. С позиции генетической нестабильности опухолевых клеток оценивается и качественно новое развитие опухоли, в частности активация или инактивация апоптоза и пролиферация, в результате которых возникает биологическая прогрессия опухоли и приобретение ею новых клинических свойств, таких как агрессивность и высокая злокачественность. Область нерегулярных колебаний характеризуется нарушением системы регуляции организма с последовательным ухудшением функциональной активности, возникновением спонтанных хромосомных aberrаций и патологических аллелей. МикроРНК регулируют экспрессию генов, задействованных в формировании опухолевого процесса, поэтому их можно считать не только перспективными маркерами ранней диагностики и прогноза заболевания, но и мишенями для терапевтического воздействия.

Участие виментиновых промежуточных филаментов в регуляции миграционной пластичности опухолевых клеток

А.Ю. Александрова¹, А.С. Чикина^{1,2}, М.Е. Ломакина¹, Н. Потапов^{1,3}, Т.М. Свиткина⁴

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

²UMR144/U932 Институт Кюри, Париж, Франция;

³ГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

⁴Пенсильванский университет, Филадельфия, США

Развитие злокачественной опухоли сопровождается приобретением опухолевыми клетками способности к миграции и усилению этих способностей в процессе опухолевой прогрессии. Именно это свойство лежит в основе инвазии и метастазирования опухолей. Усиление миграционных способностей опухолевых клеток связано не с прямым увеличением скорости их миграции, а с приобретением нового свойства — использование разных механизмов движения в зависимости от структуры и свойств ВКМ, а также изменения свойств самой опухолевой клетки. Опухолевые клетки могут диссеминировать группами (если мигрирующие клетки сохраняют межклеточные контакты друг с другом) или поодиночке (если такие контакты утрачиваются в результате трансформации). При этом индивидуальные клетки могут мигрировать как фибробласты по мезенхимальному механизму, для которого иницирующей и определяющей стадией служит Arp2/3-зависимая полимеризация актина на ведущем краю клетки, основанному на повышенной Rho-зависимой сократимости клетки и на движении за счет образования специфических мембранных пузырей — бляшек.

Эффективность мезенхимального движения зависит от взаимодействия клетки с ВКМ и от активности металлопротеаз. Амебоидное движение не зависит ни от образования контактных структур с субстратом (фокальных адгезий), ни от активности металлопротеаз, и поэтому часто описывается как более быстрое и независимое от окружения движение. Клетки на ранних стадиях эмбрионального развития и агрессивные опухолевые клетки обладают миграционной пластичностью — способностью переключаться с одного способа движения на другой. Наиболее изучен переход от неподвижного эпителиального к высокоподвижному мезенхимальному фенотипу — ЭМП. Переключение с мезенхимального на амебоидное движение — мезенхимально-амебоидный переход. В основе всех типов клеточного движения лежит реорганизация актинового цитоскелета. Оказалось, что для приобретения клетками миграционной пластичности чрезвычайно важны и другие системы цитоскелета. Так, наличие специфических промежуточных филаментов и их белка виментина характерно для мезенхимальных клеток, появление данных филаментов в мигрирующих клетках считается

одним из признаков ЭМП. В последнее время показано, что усиление экспрессии виментина не просто последствие ЭМП, а важный регуляторный фактор, стимулирующий данный процесс.

При исследовании другого проявления миграционной пластичности (МАП) мы показали, что важнейший параметр, определяющий способность клетки к переходу на амебоидное движение, — состояние и распределение виментиновых промежуточных филаментов (ВПФ). Клетки, в которых ВПФ сконцентрированы в околоядерном пространстве, вдали от клеточной мембраны, могут при определенных условиях переходить на амебоидное движение, а распространение ВПФ до клеточной мембраны препятствует образованию бляшек. Таким образом, внутриклеточное распределение ВПФ может быть фактором, регулирующим возможность и направленность амебоидного движения.

Важно отметить, что некоторые лекарственные средства, широко используемые для лечения опухолей, например винкристин, вызывают коллапс ВПФ в опухолевых клетках. Недавно показано, что в некоторых опухолях винкристин стимулирует диссеминацию опухолевых клеток, что, вероятно, может быть обусловлено мезенхимально-амебоидным переходом. Таким образом, даже хорошо известные лекарства могут нести побочные эффекты из-за миграционной пластичности опухолевых клеток, что ведет к усилению метастазирования.

В докладе рассматриваются возможные механизмы регуляции миграционной пластичности, основанные на распределении ВПФ, степени и характере их посттрансляционных модификаций.

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

Характеристика коллективной миграции опухолевых клеток при раке молочной железы в модели морфологической гетерогенности

В.В. Алифанов, Л.А. Таширева, В.М. Перельмутер
НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. Инвазия опухолевых клеток — один из начальных этапов прогрессирования опухоли. Actinin 4 регулирует полимеризацию актина и участвует в формировании ламеллоподий, по литературным данным, это необходимый этап для коллективной миграции. Удобной моделью для изучения инвазии (индивидуальной и коллективной) опухолевых клеток служит морфологическая гетерогенность РМЖ.

Цель исследования — оценка экспрессии белка actinin 4 в опухолевых клетках различных морфологических структур РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включено 30 больных ($50,2 \pm 18,4$ года) инвазивной карциномой

неспецифического типа молочной железы (T1-4N0-3M0). Анализ экспрессии белка actinin 4 в опухолевых клетках проводился с помощью TSA-модифицированного ИГХ-исследования с использованием антитела anti-actinin 4 (1: 200, ab108198; Abcam, UK). Для статистической обработки использован пакет программ Statistica 10.0.

Результаты. В нашем исследовании 65,2 (40,4–85,0) % опухолевых клеток экспрессировали белок actinin 4. При сравнении экспрессии actinin 4 в опухолевых клетках различных морфологических структур обнаружено, что в солидных структурах (68,9 (49,9–80,0) %) и среди одиночных опухолевых клеток (83,2 (71,3–100,0) %) значительно большее число клеток имеет экспрессию actinin 4 по сравнению с альвеолярными структурами (56 (44,4–71,4) %), $p = 0,0480$ и $p = 0,0061$ соответственно, а также по сравнению с трабекулярными структурами (56,7 (45,4–69,7) %), $p = 0,0296$ и $p = 0,0277$ соответственно.

Заключение. Экспрессия белка actinin 4 более характерна для опухолевых клеток солидных структур и одиночных опухолевых клеток. Вероятно, actinin 4 вовлечен в коллективный и индивидуальный типы миграции. Дальнейшее изучение механизмов регуляции актинового цитоскелета данных структур позволит приблизиться к пониманию начальных этапов метастазирования опухолевых клеток.

Сходство и различие экспрессии генов при метастазировании и дифференцировке светлоклеточного почечно-клеточного рака

А.В. Матвеев¹, Н.В. Апанович², П.В. Апанович²,
А.А. Коротаева², О.А. Халмурзаев¹, В.Б. Матвеев¹, А.В. Карпухин²

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

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

Цель исследования — изучение связи метастазирования и степени дифференцировки опухолей светлоклеточного почечно-клеточного рака (скПКР) по экспрессии генов.

Материалы и методы. Исследовались уровни экспрессии 10 генов — CA9, NDUFA4L2, VWF, IGFBP3, BHLHE41, EGLN3, ANGPTL4, CSF1R, C1QA, и FN1, отобранных ранее на основе уровней экспрессии как участвующие в развитии скПКР в 65 парных образцах (опухолевая ткань скПКР и морфологически нормальная ткань той же почки). Уровни экспрессии определяли в опухолевой ткани относительно нормальной методом ОТ-ПЦР.

Результаты. Показано, что экспрессия генов CA9, NDUFA4L2, VWF, IGFBP3, BHLHE41, ANGPTL4 и EGLN3

ассоциирована как со степенью дифференцировки скПР, так и с метастазированием данной опухоли. Экспрессия *CIQA* связана только с метастазированием, но не участвует в процессах дифференцировки клеток опухоли. Неоднозначная ситуация с генами *FNI* и *CSFIR*, экспрессия которых не существенна для процессов метастазирования скПР, но может иметь некоторое значение для дифференцировки клеток этой опухоли. Найдена высоко значимая ассоциация ($p = 0,007$) степени дифференцировки и синхронного метастазирования скПР. Низкодифференцированные опухоли имеют примерно в 5 раз повышенную вероятность метастазирования в течение года (ОШ = 4,94). Выявлена низкая корреляция экспрессии генов в опухолях с низкой степенью дифференцировки в противовес их высокой ко-экспрессии при прогрессии опухоли по TNM-классификации.

Закключение. Значительная часть исследованных генов *CA9*, *NDUFA4L2*, *VWF*, *IGFBP3*, *BHLHE41*, *ANGPTL4* и *EGLN3* связана как с метастазированием, так и со степенью дифференцировки скПР, что обусловлено сходством функциональных изменений, стимулирующих оба этих процесса. В низкодифференцированных опухолях выявлена дезорганизация экспрессии генов, выражающаяся в слабой ее корреляции.

Роль TGF-β-сигнального каскада в механизмах резистентности к тамоксифену

Н.Н. Бабышкина¹, Т.А. Дронова¹, Е.М. Слонимская²,
Н.В. Чердынцева¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Введение. В настоящее время для лечения эстроген-позитивного рака молочной железы (РМЖ) наиболее часто назначаемым антиэстрогеном служит тамоксифен, который функционально вовлечен в регуляцию активности трансформирующего фактора роста бета (TGF-β). Поиск новых мишеней на основе изучения TGF-β-сигнального пути может обеспечить разработку эффективных подходов терапии пациентов, невосприимчивых к тамоксифену.

Цель исследования — генетический и экспрессионный анализы компонентов TGF-β-сигнального пути, связанных с исходом терапии тамоксифеном у 140 пациентов РМЖ.

Материалы и методы. Уровень экспрессии мРНК TGF-β, TβRI, TβRII и CCND1 оценивали с помощью количественного RT-PCR-анализа. Уровень экспрессии соответствующих белков, а также анализ их коэкспрессии определяли методом проточной цитофлуориметрии. Характер распределения ERα в опухоли показала ИГХ-оценка. Устойчивость или отсутствие

эффекта тамоксифена определяли как клиническое прогрессирование или рецидив заболевания во время проводимой терапии.

Результаты. Терапевтический эффект тамоксифена связан как с высоким уровнем транскрипционной активности TβRI ($p = 0,046$), так и с высокой продукцией его белка в опухоли ($p = 0,030$). Выявлена корреляционная зависимость между уровнем экспрессии TβRI и TGF-β ($r = 0,295$, $p = 0,040$). В опухолях с высокой экспрессией TβRI чаще наблюдался гомогенный характер распределения ERα, тогда как опухоли с низкой экспрессией TβRI демонстрировали гетерогенную экспрессию ERα ($p = 0,007$). Характер экспрессии ERα коррелировал с экспрессией TβRI ($r = 0,30$, $p = 0,007$), а также с экспрессией циклин D1 ($r = 0,46$, $p = 0,026$). Кроме того, у пациентов с успешной терапией тамоксифеном отмечено преобладание экспрессии циклин D1-/TβRII⁺ популяций опухолевых клеток ($p = 0,009$).

Закключение. Развитие устойчивости к тамоксифену может быть результатом сложной взаимосвязи сети различных сигнальных путей, включая TGF-β. Целесообразно продолжить изучение компонентов TGF-β сигнального пути в качестве маркеров для прогнозирования эффективности тамоксифена.

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

Влияние статуса гена EGFR на митохондриальный аппарат клеток немелкоклеточного рака легкого и их чувствительность к митоканам

Е.В. Байдюк, В.А. Голотин, Е.Д. Колосова, О.Ю. Шувалов,
О.А. Федорова, А.А. Дакс, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Одна из терапевтических стратегий преодоления резистентности опухолевых клеток к применяемой терапии — использование препаратов «митоканы», дестабилизирующих митохондрии.

Цель исследования — изучение влияния часто встречающихся при НМРЛ мутаций в гене *EGFR* на митохондриальный аппарат клеток и их чувствительность к митоканам.

Материалы и методы. Работа проведена на клеточной линии НМРЛ (H1299), в которую, с помощью системы геномного редактирования введены мутации в ген *EGFR* (L858R и T790M), а также линии H1975 с естественным генотипом (*EGFR* L858R/T790M). Оценку энергетического статуса митохондрий и митохондриальную массу проводили методом проточной цитометрии. Изменения морфологии митохондрий оценивали с помощью конфокальной и электронной микроскопии. В качестве препарата, повреждающего

митохондрии, использовали Benzethonium Chloride (Bnz). Выживаемость клеток оценивали с помощью МТТ-теста.

Результаты. Показано, что мембранный потенциал митохондрий клеток H1299 с диким типом *EGFR* в 3 раза ниже, чем в клетках с мутацией в 21-м экзоне *EGFR* (L858R) и в 3,5 раза ниже, чем в клетках с двойной мутацией *EGFR* (L858R/T790M). При этом митохондриальная масса клеток с различным статусом *EGFR* одинакова. Мембранный потенциал митохондрий клеток H1975 в 4 раза выше, чем в клетках H1299 с *EGFR* дикого типа. Обе клеточные линии с двойной мутацией *EGFR* (H1299 L858R/T790M и H1975) оказались более чувствительны к воздействию препарата Bnz, повреждающему митохондрии, что проявлялось в снижении мембранного потенциала митохондрий, продукции АФК и гибели клеток на меньших концентрациях препарата.

Заключение. Точечные мутации в гене *EGFR* (L858R), а также двойные мутации (L858R/T790M) приводят к значительному повышению митохондриальной активности клеток НМРЛ, а значит, сенсибилизируют клетки к препаратам, повреждающим митохондрии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-45-0211).

Ассоциации полиморфных вариантов генов ферментов репарации ДНК с развитием аденокарциномы легкого

М.Л. Баканова^{1,2}, В.И. Минина^{1,3}, Я.А. Савченко^{1,3}

¹ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии», СО РАН», Кемерово;

²ФГБОУ ВО «Кемеровский Государственный медицинский университет» Минздрава России;

³ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»

Введение. Ведущее место в структуре онкологической заболеваемости занимает РЛ. Один из распространенных видов РЛ — аденокарцинома легкого (АКЛ). Система репарации ДНК служит 1-м барьером на пути возникновения геномной нестабильности и канцерогенеза под действием мутагенов.

Цель исследования — изучить связь полиморфных вариантов генов ферментов репарации ДНК с риском формирования АКЛ с учетом стадии и метастазирования заболевания.

Материалы и методы. Обследованы 304 больных АКЛ (213 мужчин, из них 186 курящих, 166 со стажем работы на вредном производстве, средний возраст — 59 лет). У 51,6 % больных выявлены III, IV стадии заболевания, 58,2 % — имели метастазы. Полиморфные варианты генов *APEX1* (rs1130409), *ADPRT* (rs1136410), *XPB* (rs13181) изучали аллель-специфической ПЦР

(НПФ «Литех», Москва). Статистическая обработка материала проводилась с помощью программ: SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>), Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., USA). Использовали поправку на множественность сравнений (Bonferroni).

Результаты. Частоты генотипов и аллелей исследованных полиморфных локусов показали соответствие равновесию Харди–Вайнберга, как в группе больных АКЛ, так и в группе сравнения. Выявлена взаимосвязь полиморфизма гена *XPB* (rs13181) с риском развития АКЛ. Наиболее значимо ассоциация проявлялась в доминантной модели наследования (ORadj = 1,82; 95 % CI = 1,27–2,59; padj = 0,00009; AIC 786,0; pcor = 0,001). Оценка распределения генотипов генов ферментов репарации у пациентов, дифференцированных по стадиям заболевания и метастазированию, показали отличия от здоровых для лог-аддитивной модели полиморфного варианта гена *XPB* (rs13181 T > G) больных АКЛ на III–IV стадиях заболевания (ORadj = 1,69; 95 % CI = 1,26–2,26; padj = 0,00004; AIC 552,4; pcor = 0,0004) и больных с метастазами (ORadj = 1,53; 95 % CI = 1,16–2,01; padj = 0,003; AIC 600,5; pcor = 0,03). Кроме того получена ассоциация АКЛ для лог-аддитивной модели гена *XPB* (rs13181 T > G) у больных мужчин на III–IV стадиях (ORadj = 1,67; 95 % CI = 1,19–2,33; padj = 0,003; AIC 414,1; pcor = 0,01), имеющих контакт с генотоксикантами на производстве (ORadj = 2,13; 95 % CI = 1,29–3,51; padj = 0,003; AIC 222,6; pcor = 0,01), и у пациентов с метастазами, имеющих контакт с генотоксикантами на производстве (ORadj = 1,98; 95 % CI = 1,27–3,09; padj = 0,002; AIC 264,9; pcor = 0,01).

Заключение. Полученные данные указывают на возможную роль гена *XPB* (rs13181) в формировании наследственной предрасположенности к развитию АКЛ.

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

Продукция гистидин-богатого гликопротеина клетками крови и образцами ткани молочной железы в зависимости от экспрессии его мРНК при заболеваниях молочной железы

А.В. Бернадо¹, А.А. Студеникина²

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России;

²НИИ молекулярной биологии и биофизики, ФГБНУ «ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины» Минздрава России, Новосибирск

Введение. Гистидин-богатый гликопротеин HRG модулирует важные биологические процессы, участвующие

в прогрессировании опухоли, мРНК HRG обнаружена как при злокачественных, так и при доброкачественных заболеваниях молочной железы.

Цель исследования — сравнение продукции HRG клетками крови и образцами ткани молочной железы, в зависимости от экспрессии HRG у пациентов с заболеваниями молочной железы.

Материалы и методы. Использовали кровь и образцы ткани молочной железы 52 пациентов. Из них у 37 диагноз инвазивная карцинома неспецифического типа (ИКНТ), а у 15 — доброкачественные заболевания молочной железы. Экспрессию HRG в образцах ткани молочной железы оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. Для определения спонтанной продукции HRG клетки крови и 1 часть образцов ткани инкубировали в питательной среде DMEM-F12, другую часть образцов — в среде DMEM-F12 с поликлональными активаторами (Вектор-Бест) для выявления индуцированной продукции, ИФА-методом определяли супернатант и концентрацию HRG. Индекс влияния поликлональных активаторов на продукцию определяется по формуле: $HRG = A/B$, где A — концентрация при индуцированной продукции; B — концентрация при спонтанной продукции. Статистическую обработку данных выполняли с помощью Statistica V 6.0.

Результаты. По результатам ПЦР в реальном времени, мРНК HRG обнаружена в 63,5 % всех случаев и не отличалась при ИКНТ и доброкачественных заболеваниях молочной железы. Концентрация HRG оказалась статистически значимо выше, как в супернатанте клеток крови ($p = 0,008$), так и в супернатанте образцов ткани при спонтанной продукции ($p = 0,031$) и при индуцированной ($p = 0,021$) при отсутствии мРНК HRG. В группе доброкачественных концентрация HRG при спонтанной продукции образцами ткани выше у пациентов, у которых мРНК HRG не обнаружена ($p = 0,047$). У больных ИКНТ концентрация HRG была выше при индуцированной продукции образцами ткани молочной железы ($p = 0,021$), а также был выше индекс влияния поликлональных активаторов на его продукцию при отсутствии экспрессии HRG ($p = 0,044$).

Заключение. Таким образом, присутствие HRG в строме большинства опухолей указывает на то, что его эффекты зависят от концентрации в опухоли и ее типа, а анализ мРНК HRG не обязательно отражает экспрессию и концентрацию белка HRG в крови и тканях. Хотя клетки молочной железы экспрессируют мРНК HRG, из-за альтернативного сплайсинга/посттрансляционной модификации белков не происходит образования функционального гликопротеина. Кроме того, HRG продуцируется в печени, распределяется в кровотоке, связывается с рецепторами на макрофагах в тканях, в которых находятся участки воспаления, что приводит к регуляции оборота HRG.

Отдаленные результаты оценки генетических факторов при повторном хирургическом лечении папиллярного рака щитовидной железы

А.А. Богатиков¹, А.С. Кузьмичев¹, А.Б. Чухловин²

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;

²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России

Цель исследования — оценка прогностической значимости генных вариантов MMP и ACE1 при хирургическом лечении папиллярного РЩЖ.

Материалы и методы. В нашем первичном исследовании проведено типирование ряда генных вариантов, контролирующих коллагенолиз у 90 больных с папиллярной карциномой ЩЖ, оперированных до 2009 г. Средний возраст $56,0 \pm 1,2$ года. Все пациенты по возрасту выявления заболевания разделены на 3 группы: до 50, 51–75, более 75 лет. Мы оценивали генотипы промоторных аллелей генов *MMP-1* (1G/2G) и *MMP-3* (5A/6A), *PAI-1* (4G/5G) а также *ACE-1* I/D (инсерционный и делеционный варианты), которые определяли с помощью аллель-специфической ПЦР. В 2019 г. мы провели ретроспективный анализ наблюдений в этой группе пациентов за 10 лет.

Результаты. Ранее мы показали, что в группе больных в возрасте до 50 лет аллель 5A гена *MMP-3* и вариант D гена *ACE-1* ассоциированы с ранним дебютом заболевания и большим размером опухоли. В 1-й возрастной группе повторно оперированы в связи с прогрессированием опухоли 3 из 21 пациента: 2 мужчин (36 и 39 лет) и 1 женщина 40 лет. Во 2-й возрастной группе повторно оперированы 2 из 31 пациента: 1 женщина и 1 мужчина (50 и 52 года соответственно). Данные по генным маркерам показали наличие аллеля D гена *ACE* у всех перечисленных 5 пациентов, оперированных повторно. Гетерозиготный генотип *MMP-3* 5A/6A выявлен у 4 из 5 пациентов, оперированных повторно (80 %), что достоверно выше, чем в остальной группе пациентов (34 %, $p = 0,04$).

Заключение. Ассоциации между аллелями D гена *ACE* в сочетании с генотипом *MMP3* 5A-6A служат неблагоприятным прогностическим фактором в развитии папиллярного РЩЖ.

Частота встречаемости циркулирующих опухолевых клеток с разными эпителиальными маркерами у больных ранними стадиями рака молочной железы

М.А. Болдышевская, В.В. Алифанов, Л.А. Таширева,
Е.С. Григорьева, В.М. Перельмутер

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) имеют прогностическую ценность для больных РМЖ. Один из основных эпителиальных маркеров, экспрессирующихся в ЦОК, — молекулы EpCAM и CK7/8. Опухолевые клетки гетерогенны по наличию разных маркеров эпителиальной дифференцировки. В связи с этим ЦОК могут утрачивать один или несколько маркеров, что может затруднять их выявление.

Цель исследования — определить частоты встречаемости и соотношений разных по экспрессии эпителиальных маркеров популяций ЦОК у пациентов с ранними стадиями РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включены 39 пациентов с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы (T1-2N0-2M0, стадия I–IIb), проходивших лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ. Для оценки экспрессии маркеров на поверхности ЦОК были использованы МА: BV570-анти-CD45 (клон HI30, мышиный IgG1, Sony Biotechnology, США), BV650-анти-EpCAM (клон 9C4, мышиный IgG2b, Sony Biotechnology, США), AF647-анти-Цитокератин 7/8 (клон CAM5.2, мышиный IgG2a, BD Pharmingen, США). Фенотипы ЦОК определяли с помощью проточной цитометрии на Novocyte 3000 (ACEA Biosciences, США). Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы STATISTICA 13 (StatSoft, США).

Результаты. Определяли экспрессию 2 эпителиальных маркеров — EpCAM и CK7/8. Частота встречаемости ЦОК у пациентов составила 71,8 % (28/39). Всегда, если ЦОК обнаруживались, среди них присутствовали EpCAM–CK7/8⁺ клетки, эта популяция была наиболее многочисленной (5,8 кл/мл; $p = 0,0029$). Циркулирующие опухолевые клетки с другими комбинациями эпителиальных маркеров (EpCAM⁺CK7/8⁺ и EpCAM⁺CK7/8⁻) встречались у 51,3 и 58,9 % больных, соответственно ($p = 0,1728$). Чаще всего (71,4 %) в крови пациентов присутствовали все 3 изучаемых фенотипа опухолевых клеток ($p < 0,0001$). У 10,3 % пациентов в крови обнаруживались только EpCAM–CK7/8⁺ клетки.

Заключение. На ранних стадиях заболевания РМЖ его ЦОК характеризуются фенотипической гетерогенностью по экспрессии EpCAM и CK7. Определение только экспрессии EpCAM не позволяет выявлять ЦОК у 10,3 % пациентов.

CD437 отменяет цитопротекторный эффект аутофагии в клетках карциномы легкого

А.А. Вартанян, В.С. Косоруков

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

Введение. Синтетический ретиноид CD437, агонист γ -рецептора ретиноевой кислоты (RAR γ), избирательно связывается с RAR γ и трансактивирует рецептор, запуская дифференцировку клеток. Этот ретиноид также индуцирует апоптоз в различных типах опухолевых клеток с помощью механизма, независимого от пути, опосредованного RAR γ .

Цель исследования — изучение взаимосвязи между апоптозом и аутофагией в CD437-индуцированной гибели клеток.

Материалы и методы. В работе использованы: 2D-культивирование клеток карциномы легкого A549, иммуноцитохимия, проточная цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия.

Результаты. CD437 в диапазоне концентраций от 0,2 до 5,0 мкМ увеличивал количество PI-положительных клеток в культуре карциномы легкого A549. При концентрациях близких к IC₅₀ ретиноид снижал популяцию клеток в G2/M-фазе клеточного цикла и останавливал клеточный цикл в S-фазе. CD437 дозозависимо увеличивал количество апоптотических клеток в присутствии не цитотоксических концентраций вортманнина, необратимого и LY 294002, обратимого ингибитора антистрессовой киназы PI-3K. Известно, что ингибиторы PI-3K блокируют аутофагию на стадии инициации. Однако накопления LC-3B с возрастанием концентрации CD437 (0,1–5,0 мкМ) в клетках не наблюдалось, что позволяет предположить ингибирование CD437 слияния аутофагических вакуолей и лизосом. Для подтверждения участия CD437 в аутофагии мы ингибировали апоптоз в клетках A549, ожидая активации аутофагии. В условиях ингибирования апоптоза 50 мкМ zVAD-fmk 3,0 мкМ CD437 не влияло на накопление аутофагосом, это указывало на то, что аутофагическая вакуолизация происходит раньше и не зависит от апоптотического процесса. При инкубировании клеток с не цитотоксическими концентрациями хлорокина, ингибитора терминальной стадии аутофагии, при концентрациях CD437 близких к IC₅₀ практически не оставалось живых клеток. Аддитивный эффект ретиноида и хлорокина в индукции гибели клеток A549 предполагает блокирование CD437 слияния аутофагосом и лизосом, необходимое для завершения катаболизма аутофагического материала.

Заключение. Полученные результаты указывают на отмену CD437 цитопротекторной функции аутофагии, что позволяет поднять вопрос о возможности комбинированной терапии CD437 с цитотоксическими препаратами в лечении карциномы легкого.

Убиквитинлигаза Pirh2 влияет на стабильность метилтрансферазы SET7/9 в клетках человека

Ю.Д. Васильева, С.Е. Парфеньев, А.В. Петухов,
О.А. Федорова, О.Ю. Шувалов, Н.А. Барлев, А.А. Дакс
ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Метилтрансфераза SET7/9 осуществляет метилирование гистонов H3 и H1 по остаткам лизина, а также метилирует ряд негистоновых белков, таких как p53 или TAF10, регулируя таким способом основные процессы в клетке. Показано, что Set7/9 играет амбивалентную роль в канцерогенезе и может проявлять как онкосупрессорные, так и онкогенные свойства при различных типах новообразований. Несмотря на широкий спектр мишеней Set7/9, регулирующих ключевые клеточные процессы, и его роль в развитии рака, механизмы регуляции экспрессии и стабильности данного фермента на сегодняшний день практически не изучены.

Цели исследования: изучить влияние убиквитинлигазы Pirh2 на метилтрансферазу Set7/9 и показать, что стабильность данной метилтрансферазы регулируется белком Pirh2.

Результаты. На 1-м этапе проанализирована аминокислотная последовательность Set7/9, обнаружено, что данный фермент имеет 4 потенциальных сайта для убиквитинирования и может служить мишенью для Pirh2. Показали, что метилтрансфераза Set7/9 способна взаимодействовать с убиквитинлигазой Pirh2. Кроме того, с помощью убиквитинирования *in cellulo* продемонстрировано, что E3 лигаза Pirh2 осуществляет полиубиквитинирование метилтрансферазы Set7/9. Известно, что в большинстве случаев полиубиквитинирование служит сигналом для направленной деградации белков в протеасомах, поэтому мы предположили, что Pirh2 в качестве полиубиквитинлигазы для Set7/9 может влиять на уровень данного белка в клетках. В ходе исследований обнаружено, что нокдаун Pirh2 в клетках РМЖ (MCF7, SKBR-3 и MDA-MB-231) и РЛ человека (H1299, H460 и A549) способствует стабилизации Set7/9, в то время как гиперэкспрессия данной убиквитинлигазы приводит к снижению уровня Set7/9. Также исследовали зависимость Set7/9 от уровня экспрессии Pirh2 в клетках эмбриональной почки человека HEK293T с гиперэкспрессией Pirh2 и подтверждена способность Pirh2 негативно регулировать уровень Set7/9 в клетках человека не опухолевого происхождения.

Заключение. Выявлен новый и, возможно, универсальный механизм регуляции стабильности метилтрансферазы Set7/9, обеспечиваемый убиквитинированием E3 лигазой Pirh2.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 19-75-10059).

Динамика изменений активирующих мутаций в гене KRAS при терапии онкологических заболеваний

Д.И. Водолажский, Е.С. Агеева, И.М. Самохвалов,
А.К. Гуртовая, Р.Н. Аблаева
ФГАОУ ВО «Крымский Федеральный университет имени
В.И. Вернадского», Симферополь

Введение. Мониторинг динамики статуса опухолевых клеток при лечении пациентов с онкозаболеваниями лучевой, таргетной и химиотерапией необходим для выявления устойчивых опухолевых клонов. Метод digital droplet PCR — ddPCR, позволяет повысить надежность и увеличить чувствительность обнаружения соматических мутаций, а также осуществить прямую многократную детекцию регистрируемых событий. Циркулирующая в периферической крови внеклеточная опухолевая ДНК используется как клинический маркер прогрессии и эффективности терапии онкологических заболеваний. Активирующие мутации в гене KRAS служат предиктором устойчивости к таргетным препаратам.

Цель исследования — проанализировать наличие активирующих мутаций в гене KRAS у пациентов с опухолями головы и шеи после прохождения курса плановой поли-ХТ.

Материалы и методы. Из образцов периферической крови 10 пациентов с опухолями головы и шеи получены образцы внеклеточной ДНК с использованием наборов Cobas® cfDNA Sample Preparation Kit (Roche, USA). Образцы периферической крови забирались до начала лечения и через 10 дней после окончания курса поли-ХТ. Для детекции соматических мутаций в гене KRAS использовали набор реагентов ddPCR KRAS Screening Multiplex Kit (Bio-Rad, USA) и платформа QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, USA). У пациентов в подавляющем большинстве случаев диагностирован плоскоклеточный рак с ороговением (G1–G2).

Результаты. Установлено, что в образцах плазмы периферической крови, полученных перед прохождением пациентами поли-ХТ-курса, не обнаружено ни одного события активирующих мутаций в гене KRAS. После окончания поли-ХТ-курса в 4 образцах плазмы периферической крови тех же пациентов зарегистрированы активирующие мутации в гене KRAS (90–400 событий, т. е. 20–129 %). Это свидетельствует о том, что после поли-ХТ-курса у пациентов происходит селекция клонов опухолевых клеток с активирующими мутациями в гене KRAS. Можно предположить, что такая селекция дает опухолевым клеткам дополнительные преимущества регуляции клеточной пролиферации аутокринного типа.

Заключение. Для пациентов с опухолями головы и шеи противопоказано использование таргетных

препаратов, направленных на ингибирование *EGFR*-рецепторов, без дополнительного тестирования мутантного статуса гена *KRAS*.

Мутационный профиль агрессивной лимфомы с рецидивом в ЦНС: анализ данных CBioPortal for Cancer Genomics database и результаты исследования

Е.Н. Ворopaева¹, Т.И. Пospелова², В.С. Карпова³,
Ю.В. Вяткин^{4,5}, Д.Н. Штокало^{5,6}, В.Н. Максимов¹,
М.И. Воевода¹, В.В. Ступак⁷, Д.А. Рзаев⁸, Т.А. Агеева²

¹НИИ терапии и профилактической медицины,
ФГБНУ «ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»,
Новосибирск;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский
университет» Минздрава России;

³ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина»,
Новосибирск;

⁴ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследователь-
ский государственный университет»;

⁵ООО «Новые программные системы», Новосибирск;

⁶ФГБУН «Институт систем информатики им. А.П. Ершова
СО РАН», Новосибирск;

⁷ФГБУ «Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии
им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, Новосибирск;

⁸ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии»
Минздрава России, Новосибирск

Цель исследования — выявить мутации, ассоциированные с высоким риском рецидива диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВККЛ) в центральной нервной системе (ЦНС).

Материалы и методы. Проанализированы данные CBioPortal for Cancer Genomics database более 1 тыс. 200 пациентов с ДВККЛ. Отобраны случаи с поражением ЦНС в рецидиве ($n = 48$) и без вовлечения ЦНС ($n = 355$). На аппарате HiSeq1500 выполнено полноэкзомное секвенирование 10-ти образцов ДНК опухолевой ткани больных лимфомой с поражением ЦНС в рецидиве. Биоинформатический анализ необработанных данных выполнен на платформе Genomenal.

Результаты. По данным CBioPortal for Cancer Genomics database, в группе ДВККЛ с рецидивом в ЦНС гены с наибольшей частотой мутаций можно разделить на следующие группы: сигнального пути BCR/NF-κB (*MYD88*, *PIM1*, *CARD11* и *CD79B*), эпигенетической регуляции (*MLL2*, *CREBBP*, *ARID1A* и *SMARCA4*) и опухолевый супрессор *TP53*. Мутации в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B* часто носили сочетанный характер и в подгруппе больных ДВККЛ с поражением ЦНС в рецидиве встречались в 39,6 % случаев против 25,1 % ($p = 0,0331$) в подгруппе без поражения ЦНС. Относительный риск рецидива с вовлечением ЦНС в случае рекуррентной мутации *MYD88* p. L265P составил OR = 3,365 (95 % ДИ = 1,59 и 7,11). Мутации

в генах *ARID1A* и *SMARCA4* редко сочетались друг с другом и мутациями в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B*. Суммарно они выявлены в 29,2 % случаев ДВККЛ с поражением ЦНС в рецидиве заболевания (в подгруппе ДВККЛ без вовлечения ЦНС 14,4 %, $p = 0,0089$). Результаты собственного исследования подтверждают данные анализа CBioPortal for Cancer Genomics database. В проанализированных образцах мутации в гене *MYD88* обнаружены в 4 случаях, 3 из которых — замена p. L265P. В 3 образцах обнаружено сочетание мутаций в генах сигнального пути BCR/NF-κB. Мутации в генах *ARID1A* и *SMARCA4* представлены делециями и обнаружены в единичных образцах.

Заключение. Высокую частоту мутаций в генах *MYD88*, *PIM1* и *CD79B* можно объяснить преобладанием среди ДВККЛ с поражением ЦНС молекулярного подтипа опухоли из активированных В-лимфоцитов, в основе которого лежит активация сигнального пути BCR/NF-κB. Различие в частоте выявления в 2 подгруппах мутаций в генах *ARID1A* и *SMARCA4* требует дополнительного изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке
бюджетного государственного задания
(ГЗ № AAAA A17117112850280—2).

Нестволовые опухолевые клетки, экспрессирующие MYC и OCT4, — новый маркер прогрессии опухоли молочной железы

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

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. Гены *MYC* и *OCT4* — известные факторы поддержания плюрипотентности, вместе с *KLF4* и *SOX2* способны индуцировать плюрипотентное состояние у дифференцированных клеток. Практически во всех статьях, посвященных *MYC* и *OCT4* показана связь их высокой экспрессии с более агрессивным течением заболевания, его прогрессией и резистентностью к терапии.

Цели исследования: изучить, в каких субпопуляциях опухолевых клеток молочной железы экспрессируются *MYC* и *OCT4*, и связь с метастазированием и ответом на НХТ.

Материалы и методы. В исследование включены 27 больных РМЖ (IIb — IIIa стадии) люминального В подтипа от 35 до 62 лет. Все пациенты прошли НХТ. После операции назначалась адъювантная ХТ или гормональная терапия. Для идентификации субпопуляций опухолевых клеток использовалось иммунофлюоресцентное окрашивание (набор Opal™ 7-Color Automation IHC Kit 50 slides). Программа inForm 2.4 подсчитывала абсолютное число клеток, имеющих разные фенотипы в опухолевой паренхиме. Далее подсчитан процент клеток каждого фенотипа по отношению к общему

числу клеток у каждого пациента. При помощи кривая Манна — Уитни сравнивали частоту разных субпопуляций у пациентов в зависимости от эффекта НХТ и гематогенного метастазирования.

Результаты. В опухоли наблюдалась наименьшая частота опухолевых клеток с экспрессией белков Мус, Oct4 и Snai2. Также изучена связь частоты субпопуляций опухолевых клеток с метастазированием: из 27 пациентов гематогенные метастазы развились у 10 больных. У больных с метастазами наблюдается статистически значимо повышенная частота дифференцированных опухолевых клеток (по сравнению с пациентами без метастазов): с экспрессией Мус (СК7⁺EpCAM⁺CD44⁻MYC⁺) — в 2,5 раза, с экспрессией Oct4 (СК7⁺EpCAM⁺CD44⁻OCT4⁺) — в 2,7 раза. Кроме того, в резидуальной опухоли у больных с метастазами повышена частота опухолевых клеток, экспрессирующих белок Мус, и увеличена частота опухолевых клеток с экспрессией CD44⁺Snai2⁻. Это свидетельствует о том, что именно дифференцированные опухолевые клетки (СК7⁺EpCAM⁺CD44⁻SNAI2⁺) резидуальной опухоли после НХТ у больных с развившимися впоследствии метастазами в большей степени способны к инвазии, в то время как опухолевые клетки CD44⁺ не экспрессируют Snai2 и находятся в покоем состоянии (на уровне тенденции).

Генетические варианты риска прогрессирования немелкоклеточного рака легкого

Т.С. Геращенко¹, А.А. Хозяинова¹, Р.С. Воробьев¹,
А.А. Щеголева¹, Е.О. Родионов¹, А.М. Киселев²,
Н.Н. Артемов³, О.В. Панкова¹, Е.В. Денисов¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИИЦ РАН»;

²ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;

³Институт Броуд, Кембридж, Массачусетс, США

Введение. Наличие базально-клеточной гиперплазии (БКГ) в эпителии бронхов, расположенных на отдалении от опухоли, ассоциировано с высокой частотой гематогенного метастазирования НМРЛ. Причины такой взаимосвязи остаются не изученными, вполне вероятно, весомую роль играют конститутивные генотипические особенности пациентов, предопределяющие характер развития воспалительного процесса в ткани легкого.

Цель исследования — идентификация вариаций числа копий ДНК (CNVs) и однонуклеотидных полиморфных вариантов (SNVs) у больных НМРЛ с высоким риском гематогенного метастазирования.

Материалы и методы. Исследуемая группа включала 71 больного (58,7 ± 8,9 лет) НМРЛ (T1–4N0–3M0) с наличием БКГ ($n = 46$) и отсутствием морфологических изменений ($n = 25$) мелких бронхов на отдалении (3–5 см) от опухоли. Из образцов периферической крови больных выделена ДНК (фенол-хлороформный метод) и подготовлены экзомные библиотеки (SureSelect

XT Human All Exon v. 7, Agilent, США). Секвенирование проводилось на платформе NextSeq 500 (Illumina, США), биоинформатический анализ данных — с помощью пайплайна GATK и инструментов ClinCNV и Nail.

Результаты. У больных с высоким риском гематогенного метастазирования обнаружены специфические CNVs, не представленные у больных без отдаленных метастазов, они расположены на 1, 2, 7, 8, 10, 11, 17, 19, 20 и 21-й хромосомах. В 12 % случаев структурные варианты представлены амплификациями, в 88 % случаев — делециями регионов хромосом. Частота делеций варьировала от 0,04 до 0,39, амплификаций — от 0,01 до 0,08. Средний размер CNVs составил $11,3 \pm 8,9$ тыс. п. о. Функциональный анализ генов, затронутых CNVs, показал их вовлеченность в регуляцию транскрипции, белкового сплайсинга и иммунных реакций. Кроме того, у больных с низким риском гематогенного метастазирования обнаружен специфический SNV в гене белка формина, участвующем в регуляции динамики актинового цитоскелета.

Заключение. Для больных НМРЛ с высоким риском гематогенного метастазирования характерны специфические CNVs и SNVs в генах, вовлеченных в регуляцию транскрипции, иммунного ответа и динамику актинового цитоскелета.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-75-10060).

Действие эметина на регуляцию межклеточных контактов клеток рака молочной железы

Д.Д. Григорьева¹, Е.М. Жидкова¹, Е.С. Лылова¹,
О.И. Жукова², Е.А. Лесовая^{1,3}

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

²ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва;

³ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России

Введение. Метастазирование сопровождается 30 % случаев РМЖ. При этом общая выживаемость больных с метастатическим РМЖ не превышает 20 %. Семейство кадгеринов играет ключевую роль в обеспечении межклеточной адгезии. В клетках РМЖ низкая экспрессия Е-кадгерина служит одним из маркеров метастатического потенциала. Эметин, противорвотное средство, обладает выраженной противоопухолевой активностью в отношении различных солидных новообразований. В том числе, эметин индуцирует апоптоз и подавляет жизнеспособность, миграцию, инвазию и образование сфер клеток РМЖ.

Цель исследования — оценка влияния эметина на гены, способствующие развитию процесса метастазирования РМЖ.

Материалы и методы. Использованы клетки линий

РМЖ различного гистогенеза (MCF-7, MDA-MB-231 и HCC-1954), эметин (в субтоксичной концентрации 0,1 мкМ). Экспрессию генов *SK1*, *MMP1*, *MMP9*, *RHOV*, *CDH1* (Е-кадгерин) определяли методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Показано, что эметин в 2 раза снижает экспрессию гена *CDH1* в линии HER2⁺ РМЖ HCC-1954, при этом в линиях базального и люминального РМЖ экспрессия *CDH1* возрастает в 1,5 раза. Экспрессия генов *SK1*, *MMP1*, *MMP9*, *RHOV* изменялась незначительно.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что эметин повышает экспрессию гена *CDH1* в клетках люминального и базального РМЖ. Это открывает перспективы для дальнейшего исследования способности данного агента подавлять прогрессию и метастазирование за счет усиления межклеточных контактов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-75-20124).

Роль глюкокортикоидов в прогрессии глиобластомы

Э.В. Григорьева¹, А.Ю. Цидулко¹, А.В. Суховских¹,
М.О. Политко¹, Д.К. Соколов¹, А.М. Чекренев¹,
М.А. Колпакова¹, Г.М. Казанская¹, А.М. Волков²,
Е.Э. Кливер², А.В. Айдагулова³

¹ФГБНУ «ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины» Минздрава России, Новосибирск;

²ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск;

³ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Введение. Глюкокортикоидные препараты активно применяют при лечении злокачественных опухолей, в том числе глиобластом. Известно, что данные препараты обладают широким системным воздействием, однако наряду со снижением отека могут ухудшать ответ пациента на проводимую терапию и вызывать целый ряд побочных эффектов, но молекулярные механизмы таких эффектов остаются не до конца изученными.

Цели исследования: изучение молекулярных механизмов негативного воздействия дексаметазона на гликозилированные компоненты ткани головного мозга, а также вклада возникающих изменений в прогрессирование глиобластомы.

Материалы и методы. Работа выполнена на клиническом материале глиобластом человека и в экспериментальной модели рецидива глиобластомы *ex vivo* и *in vivo*. Уровень экспрессии глюкокортикоидного рецептора (Nr3C1) и основных ПГ определяли методами ОТ-ПЦР в реальном времени и ИГХ-окрашивания, углеводных молекул гликозаминогликанов — методом дот-блот.

Результаты. Дексаметазон оказывает значительное

воздействие на состав и структуру ВКМ нормальной ткани головного мозга через изменение паттерна и уровня экспрессии ПГ и содержания гликозаминогликанов. Возникающие изменения ассоциированы с ускоренной пролиферацией опухолевых клеток и их активной инвазией в поврежденную ткань головного мозга в экспериментальных системах *ex vivo* (совместное культивирование клеток глиобластомы с органотипическими срезами мозга мышей) и *in vivo* (ортоотопические опухоли в мышцах SCID). Глиобластомы человека, как и нормальная ткань головного мозга мышей, обладают различными базовыми уровнями экспрессии Nr3C1, данный уровень взаимосвязан с чувствительностью ткани головного мозга к глюкокортикоидным препаратам.

Заключение. Полученные данные важны для понимания молекулярных механизмов ответа глиобластомы на лечение дексаметазоном и создают основу для разработки диагностического теста на чувствительность к глюкокортикоидным препаратам, что позволит оптимизировать их применение и повысить эффективность лечения, продолжительность и качество жизни пациентов с глиобластомой.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-15-00285).

Регуляция метаболизма раковых клеток метилтрансферазой Set7/9

А.А. Дакс, О.Ю. Шувалов, А.В. Петухов, О.А. Федорова,
Е.В. Байдок, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Известно, что опухолевая трансформация клеток сопровождается изменениями в метаболизме, которые влияют на скорость пролиферации, клеточный цикл и устойчивость к стрессовым условиям. Как следствие, ингибирование различных метаболических путей — одна из стратегий современной противоопухолевой терапии. Метилтрансфераза Set7/9 специфически модифицирует ряд гистонов и негистоновых белков и регулирует таким способом экспрессионный профиль клеток.

Цель исследования — изучить влияние метилтрансферазы Set7/9 на транскриптом.

Материалы и методы. Использовали раковую клеточную линию человека U-2 OS. Показали, что экспрессия ряда ключевых ферментов гликолиза, а также основного регулятора метаболических процессов с-Мус повышается при нокдауне Set7/9. Так как РЛ — один из наиболее часто диагностируемых типов рака и главной причиной онкологической смертности, мы продолжили исследование роли Set7/9 в регуляции метаболических процессов используя панель клеточных линий немелкоклеточной карциномы легкого (НМКЛ).

Результаты. В ходе исследования в клетках НМКЛ

подтвердили Set7/9-зависимую регуляцию с-Мус и ключевых факторов гликолиза GLUT1, HK2, ALDOA и LDHA как на уровне мРНК, так и на белковом. Также показали, что нокдаун Set7/9 повышает митохондриальный мембранный потенциал и скорость пролиферации, что характерно для более агрессивного фенотипа раковых клеток. С помощью системы SeaHorse продемонстрировали, что подавление Set7/9 в клетках НМКЛ приводит к повышению уровня гликолиза и дыхания, вызванного активацией исследованных метаболических ферментов. Проведенный биоинформатический анализ экспрессионных профилей образцов опухолей, полученных от пациентов с НМКЛ, выявил, что высокий уровень экспрессии факторов GLUT1, HK2 и LDHA служит неблагоприятным прогностическим фактором для пациентов с НМКЛ. Продemonстрирован синергический эффект повышенной экспрессии данных ферментов и низкого уровня Set7/9 на выживаемость пациентов.

Заключение. Можно предположить, что уровень экспрессии Set7/9 возможно рассматриваться в качестве нового прогностического биомаркера при НМКЛ. Показано, что статус Set7/9 влияет на восприимчивость клеток к ингибиторам гликолиза, используемым в клинической практике, и это актуально с точки зрения разработки новых эффективных схем терапии НМКЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-75-10059).

Экспрессия RARα в клетках рака молочной железы коррелирует с чувствительностью клеток к ретиноевой кислоте

А.Д. Еникеев, М.Е. Аксельрод, С.А. Галецкий,
А.В. Комельков

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

Введение. Ретиноевая кислота (РК) выполняет функции опухолевого супрессора и регулирует экспрессию ряда ретиноид-респонсивных генов, стимулируя дифференцировку клеток посредством взаимодействия с ядерными рецепторами (факторами транскрипции). Применение РК в терапии опухолей ограничивается быстрым приобретением малигнизировавшими клетками РК-резистентности, механизмы которой до сих пор остаются малопонятными.

Цель исследования — изучение связи экспрессии ядерного рецептора РК RARα с чувствительностью или устойчивостью клеток рака (РМЖ) к РК.

Материалы и методы. Анализ выполнен на широкой панели клеточных линий РМЖ: T47D, SKBR3, MCF7, MDA-MB-453, HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231 и HBL100. Чувствительность к РК определяли методом

анализа динамики пролиферации клеток при инкубации с ATRA (полностью транс-РК) в концентрации от 0,05 до 100 мкМ. Статистический анализ проводили с использованием критерия Стьюдента (t-тест и гнездовой t-тест) и 2-факторного дисперсионного анализа ANOVA с пост-тестом Тьюки. Анализ экспрессии RARα велся методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Результаты. РК-чувствительность клеток РМЖ варьировала в широких диапазонах. При использовании концентрации 1–10 мкМ линии разделились на 2 достоверно различающиеся группы ($p < 0,01$): РК-чувствительные (MCF7, T47D, и SKBR3), характеризующиеся снижением пролиферации ($\geq 50\%$) по сравнению с контролем, и РК-резистентные (MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HCC1937 и HBL100), показавшие значимое снижение пролиферации при концентрации ATRA ≥ 50 мкМ. Сравнение уровня экспрессии RARα выявило достоверные различия между группами РК-чувствительных и РК-устойчивых линий ($p < 0,05$). Наиболее высокая экспрессия мРНК RARα обнаружена в линиях T47D и SKBR3, которые обладают максимальной чувствительностью к РК.

Заключение. Обнаружена корреляция экспрессии RARα с РК-чувствительностью клеток РМЖ. Снижение уровня RARα в клетках РМЖ может быть одним из механизмов РК-резистентности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-015-00027).

Оценка роли Т-клеток CD39⁺ у больных колоректальным раком

Г.А. Жулай¹, А.А. Романов², М.И. Шибяев³, Е.К. Олейник¹,
П.Н. Кравченко¹

¹Институт биологии ФГБУН «ФИЦ Карельский научный центр РАН», Петрозаводск;

²ГБУЗ Республики Карелия «Сортавальская ЦРБ»;

³ГБУЗ Республики Карелия «Республиканская больница им. В.А. Баранова», Петрозаводск

Введение. Внеклеточный аденозин представляет значительный барьер для эффективной иммунотерапии рака и служит важной терапевтической мишенью. Активация аденозиновых рецепторов на опухоль-инфильтрирующих клетках и на клетках опухоли приводит к разнообразным реакциям от ингибирования эффекторных лимфоцитов до стимуляции супрессорных клеток, тем самым аденозин может модулировать иммунный ответ и способствовать уклонению опухоли от иммунологического надзора.

Цель исследования — оценить активацию аденозин-опосредованной иммунной супрессии и прогностическую роль эктонуклеотидазы CD39 у больных КРР.

Материалы и методы. В работе исследовано 42 образца крови больных КРР и 30 образцов крови здоровых доноров, сопоставимых по возрасту. Экспрессию

мРНК генов *CD39*, *CD73*, *A2AR* определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Содержание Т-клеток, экспрессирующих *CD39*, оценивали методом проточной цитометрии. Статистическая обработка данных проводилась с использованием GRAPH Pad Prism 6.0.

Результаты. Больные КРР разделены на 2 группы: ранние стадии заболевания (КРР I–II) и поздние стадии (III–IV). Показано, что у больных содержание мРНК гена *CD39* увеличивается уже на начальных стадиях КРР и достоверно отличается от контроля и от больных с III–IV стадиями, тогда как для *CD73* значительных различий по сравнению со здоровыми донорами не выявлено. У больных с поздними стадиями КРР отмечено повышение экспрессии мРНК *A2AR*, что может свидетельствовать об активации аденозин-*A2AR*-иммуносупрессорного механизма. Кроме того, у больных с более поздними стадиями КРР повышено содержание Т-клеток *CD39*⁺ как среди Т-хелперов, так и среди Трег-клеток. Для клеток, экспрессирующих *CD39*, существовала отрицательная корреляция между ними и числом Т-хелперов *CD3*⁺*CD4*⁺ и В-клеток *CD3*⁺*CD19*⁺, но не с числом Т-клеток *CD3*⁺*CD8*⁺ и NK-клеток *CD3*⁺*CD16*⁺ в крови. В связи со значимой ролью молекулы *CD39* при КРР проанализирована 3-летняя общая выживаемость 32 больных КРР с учетом содержания Т-клеток *CD39*⁺ и с учетом экспрессии мРНК гена *CD39* в лейкоцитах крови. Достоверных корреляций между выживаемостью у больных с высоким и низким уровнями исследуемых показателей не обнаружено.

Закключение. Несмотря на активацию аденозин-опосредованной иммунной супрессии не выявлено значимой связи высокого или низкого уровня Т-клеток *CD39*⁺, а также экспрессии гена *CD39* с выживаемостью больных КРР.

Работа выполнена в рамках государственного задания КарНЦ РАН (№ 0218-2019-0083).

Иммунный ландшафт опухоли у больных раком яичников

Т.Н. Заботина, Е.Н. Захарова, И.В. Паниченко,
А.А. Борунова, Н.А. Козлов

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

Цель исследования — изучение особенностей лимфоидного микроокружения опухоли первично-оперативных больных РЯ.

Материалы и методы. В исследование включены 53 пациентки РЯ, преобладала III стадия болезни — 70 % (37/53), серозный вариант — 83 % (44/53). Оценивали: степень инфильтрации опухоли лимфоцитами (TIL) и их субпопуляции методом проточной цитометрии, пространственное расположение иммунных клеток — на гистологических срезах (гематоксилин-эозин).

Результаты. Медиана содержания TIL в образцах опухолевой ткани составила 1,35 %. В нашем исследовании отсутствовали пациенты со II стадией заболевания среди больных с медианой содержания TIL <1,35 %, в то время как среди больных с медианой TIL >1,35 % не выявлены пациенты I стадии болезни. Доля больных с IV стадией в 3 раза чаще встречалась среди пациентов с низкой медианой TIL. Распределение больных по степени инфильтрации опухолевой ткани лимфоцитами с учетом гистологического типа выявило, что в обеих группах (>/< медианы) преобладали пациенты с серозным РЯ (76,9 и 88,9 %). Результаты оценки количества TIL, полученные двумя разными методами, оказались сопоставимы. При этом проточная цитометрия позволяет получить высокоточный результат автоматического подсчета клеток с учетом иммунологического фенотипа, а морфологический анализ дополняет особенности пространственного расположения TIL в опухолевой ткани. Ключевой аспект анализа TIL — субпопуляционная структура клеток локального иммунитета у пациентов с уровнем TIL ниже (1-я группа) и выше (2-я группа) значений медианы. Выявлено, что среди «линейных» популяций TIL у пациентов с большей инфильтрацией уровень Т-клеток *CD3*⁺*CD19*⁺ статистически значимо выше по сравнению с пациентами 1-й группы. И, напротив, процентное содержание NK-клеток с фенотипами *CD3*⁺*CD16*⁺*CD56*⁺ и *CD3*⁺*CD8*⁺ в группе больных с уровнем TIL ниже медианы превышало показатели пациентов 2-й группы. Корреляционный анализ выявил значимую обратную зависимость количества NK-клеток от степени инфильтрации TIL ($r = -0,5117$).

В структуре Т-клеток обнаружено, что у пациентов с содержанием TIL >1,35 %, выше доля лимфоцитов *CD3*⁺*CD4*⁺. Исследование NKT лимфоцитов в опухолевой ткани 3 популяций Т-клеток, опосредующих регуляторные функции (*CD4*, *CD8*) выявило, что только популяция NKT-клеток с фенотипом *CD3*⁺*CD16*⁺*CD56*⁺ статистически значимо выше в группе больных с медианой TIL <1,35 %. Выявлена заметная прямая корреляция между плотностью TIL в образцах ткани и уровнем Т-регуляторных клеток с фенотипом *CD4*⁺*CD279* (PD1)⁺ ($r = 0,5975$).

Закключение. Лимфоидное микроокружение при РЯ характеризуется следующими параметрами:

- низкая степень инфильтрации опухоли лимфоцитами (TIL);
- пространственное расположение лимфоцитов не зависит от степени инфильтрации TIL;
- для структуры TIL показана прямая значимая корреляция степени инфильтрации лимфоцитами и уровнем Т-регуляторных клеток, а также обратная корреляция с уровнем NK-клеток ($r = -0,5117$).

Регуляция пула стволовых клеток рака молочной железы линии MCF-7 под влиянием высокомолекулярной гиалуроновой кислоты

И.А. Замулаева¹, М.Р. Абрамова¹, Л.С. Мкртчян¹,
А.Л. Жузе², О.Н. Матчук¹

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба, филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Введение. Важную роль в процессах метастазирования и формирования резистентности ЗНО к противоопухолевой терапии играют ОСК. Поэтому значительный интерес представляет выяснение молекулярных механизмов регуляции пула ОСК, в том числе под влиянием ВКМ, один из основных компонентов которого — гиалуроновая кислота (ГК).

Цель исследования — выяснение эффектов и некоторых механизмов действия экзогенной ГК с молекулярным весом $(1-3) \times 10^6$ Да на количество ОСК в стабильной культуре РМЖ линии MCF-7.

Материалы и методы. С помощью МТТ-теста определяли жизнеспособность опухолевых клеток линии MCF-7 после инкубации с ГК в концентрации 0,3–5,0 мг/мл *in vitro*. С помощью проточной цитометрии оценивали влияние ГК на относительное и абсолютное количество ОСК, а также экспрессию виментина, одного из основных маркеров перехода ЭМП, приводящего к дедифференцировке опухолевых клеток. По иммунофенотипу CD44⁺CD24^{-/low}, а также по способности эффективно откачивать из клеток флуоресцентный краситель Хёхст33342 выявляли ОСК.

Результаты. Жизнеспособность опухолевых клеток в общей популяции снижалась с повышением концентрации ГК ($R = -0,94$, $p = 0,006$). При этом инкубация клеток с ГК приводила к повышению как относительного, так и абсолютного количества ОСК по сравнению с контролем примерно в 2 раза ($p < 0,02$ для всех методов исследования). В результате иммунофлуоресцентного окрашивания обнаружено специфическое связывание антител к виментину после инкубации клеток с ГК, которое отсутствовало в интактном контроле ($p = 0,005$), что свидетельствует об индукции процесса ЭМП. Важно, что предварительная обработка клеток с помощью димерного бисбензимидазола DB полностью подавляла экспрессию одного из основных маркеров ЭМП — белка виментина, и отменяла эффект увеличения пула ОСК, индуцированный ГК.

Выводы. ЭМП — один из механизмов увеличения пула ОСК при воздействии высокомолекулярной ГК. При этом жизнеспособность нестволовых опухолевых клеток в тех же условиях снижается. Полученные результаты проясняют некоторые закономерности

и механизмы влияния ГК на пул ОСК — фракцию опухолевых клеток, резистентную к традиционным методам химио- и радиотерапии.

Корреляции клинико-морфологических характеристик опухоли и выраженности экспрессии Snail и HIF-1α в ткани опухоли со степенью лечебного патоморфоза опухоли и метастазов в регионарные лимфатические узлы у пациенток с инвазивным раком молочной железы

Е.Ю. Зубарева¹, М.А. Сеньчукова^{1,2}, Н.В. Зайцев¹,
Д.Н. Филатова¹, М.А. Осипова¹, М.Р. Зубарев¹

¹ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер»;

²ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России

Введение. Поиск прогностических и предиктивных маркеров при РМЖ продолжает оставаться актуальным.

Цель исследования — оценить корреляции клинико-морфологических характеристик опухоли и выраженности экспрессии Snail и HIF-1α в ткани опухоли со степенью лечебного патоморфоза (ЛПМ) опухоли и метастазов в регионарные лимфатические узлы у пациенток с РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включены 97 пациенток с впервые выявленным РМЖ. Выраженность экспрессии HIF-1α и Snail в паренхиме и строме опухоли исследовали ИГХ-методом. Коэффициент экспрессии маркеров вычисляли в 5 полях как отношение: (доля клеток без экспрессии) $\times 1 +$ (доля клеток со слабой экспрессией) $\times 2 +$ (доля клеток с выраженной экспрессией) $\times 3/5$. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы Statistica 12.

Результаты. Установлено, что ЛПМ опухоли коррелировал с возрастом пациенток ($p = 0,003$), наличием лимфоваскулярной инвазии ($p = 0,005$), степенью злокачественности опухоли (G) ($p = 0,009$), молекулярно-биологическим подтипом ($p = 0,002$), выраженностью экспрессии Snail в паренхиме ($p = 0,03$) и HIF-1α в строме опухоли ($p = 0,03$). Так, пациентки с III–IV степенями ЛПМ оказались достоверно моложе ($41,1 \pm 4,6$ и $53 \pm 13,3$ года соответственно при III–IV и I–II степенями, $p = 0,047$). Степени ЛПМ III–IV достоверно чаще наблюдались при отсутствии лимфоваскулярной инвазии, чем при ее наличии (в 50 и в 13,3 %, соответственно, $p = 0,04$); чаще при G3, чем при G2 (в 50 и 7,7 %

соответственно, $p = 0,05$), чаще при HER2⁺ и трижды негативном РМЖ (в 0; 7,14; 100; 50; 60 % соответственно при люминальном А, люминальном В HER2⁻, люминальном В HER2⁺ и HER2⁺, трижды негативном РМЖ, $p = 0,01$). При III–IV степенях ЛПМ коэффициент экспрессии Snail и HIF-1 α были значимо выше, чем при I–II степенях (Snail $2,2 \pm 0,8$ и $1,8 \pm 0,4$ соответственно, $p = 0,07$; HIF-1 α $1,4 \pm 0,2$ и $1,1 \pm 0,4$ соответственно, $p = 0,12$). Степень ЛПМ метастазов в регионарных лимфатических узлах коррелировала с наличием лимфоваскулярной инвазии ($p = 0,009$), молекулярно-биологическим подтипом ($p = 0,05$), выраженностью экспрессии Snail в паренхиме опухоли ($p = 0,04$). ЛПМ при III–IV степенях РМЖ чаще наблюдался при отсутствии лимфоваскулярной инвазии, чем при ее наличии (55,6 и 16, 7 % соответственно, $p = 0,06$), при HER2⁺ РМЖ (в 0; 25,100; 100; 60 % соответственно при люминальном А, люминальном В HER2⁻, люминальном В HER2⁺ и HER2⁺, трижды негативном РМЖ, $p = 0,16$). Коэффициент экспрессии Snail оказался значимо выше при III–IV ЛПМ, чем при I–II ($2,21 \pm 0,38$ и $1,76 \pm 0,38$ соответственно, $p = 0,08$).

Заключение. Необходимы дальнейшие исследования для установления прогностических и предиктивных маркеров, а также роли Snail и HIF-1 α при РМЖ.

Участие SASH1 в поддержании структуры межклеточной адгезии

А.С. Ильницкая, С.Н. Рубцова, И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Адаптерный сигнальный белок SASH1 участвует в межбелковых взаимодействиях. С помощью коиммунопреципитации в нормальных эпителиоцитах IAR-20 и клетках РМЖ MCF-7 мы показали ассоциацию SASH1 с белками комплекса межклеточной адгезии Е-кадгерин, β -катенином и α -катенином. С использованием конфокальной микроскопии исследовали локализацию SASH1 в клетках IAR-20, MCF-7 и MCF-7, экспрессирующих конструкцию SNAIL1 под контролем tet-off промотора (MCF-7-SNAIL1). Белок SASH1 колокализовался со стабильными межклеточными адгезионными контактами, образованными Е-кадгерин. Распределение SASH1 в клетках ограничено краевым актиновым пучком, в ламеллиподиях SASH1 не детектировался. Под воздействием эпидермального фактора роста клетки IAR-20 вступали в ЭМП. В культуре MCF-7-SNAIL1 ЭМП индуцирован активацией SNAIL1 при отмывке от тетрациклина. Клетки IAR-20 и MCF-7-SNAIL1 проходили ЭМП, приобретали способность к миграции, но сохраняли экспрессию Е-кадгерина. В клетках с гибридным эпителиально-мезенхимальным фенотипом SASH1 также выявлялся в адгезионных контактах. Супрессия SASH1

в клетках IAR-20 приводила к разрушению стабильной межклеточной адгезии. С использованием DIC микроскопии изучено поведение клеток на меченых стеклах после трансфекции SASH1 siRNA. Затем клетки зафиксировали и окрасили на Е-кадгерин и SASH1, последние кадры съемки совместили с иммунофлуоресцентными изображениями. Клетки, трансфицированные SASH1 siRNA, могли собирать редкие точечные адгезионные контакты, Е-кадгерин эндоцитировался. При супрессии SASH1 клетки приобретали мезенхимальный фенотип и могли перемещаться друг относительно друга. Такие клетки в отсутствие внешних стимулов в виде ростовых факторов не могли мигрировать на значительные расстояния. Анализ параметров миграции клеток не выявил достоверных различий в пройденном пути, скорости и дистанции между контрольными и трансфицированными SASH1 siRNA клетками.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют об участии SASH1 в поддержании межклеточной адгезии. Изучение SASH1 показало, что разрушение стабильных адгезионных контактов, необходимое для вступления в ЭМП, недостаточно для того, чтобы клетки могли мигрировать направленно. Миграционная активность клеток поддерживается ростовыми факторами микроокружения, хемокинами или онкогенным сигналингом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 185416005).

Особенности транскрипта моноцитов больных раком прямой и ободочной кишки

Е.О. Казакова¹, И.В. Ларионова^{1,2}, А.Д. Казакова¹,
П.С. Ямщиков¹, М.Р. Патышева^{1,2}, Е.С. Григорьева^{1,2},
А.С. Тарасова^{1,2}, С.Г. Афанасьев², Н.В. Чердынцева^{1,2},
Ю.Г. Кжышкова²

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский государственный университет»;

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. В соответствии с клиническими, эпидемиологическими, патогенетическими и молекулярными данными пациенты с КРР подразделяются на группы с РПК и раком ободочной кишки (Paschke S., 2018). Опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) служат важнейшим регулятором опухолевого микроокружения. Основопологающий фактор, влияющий на функциональную активность ОАМ, — состояние моноцитов крови, которые способны инфильтрировать опухоль, становясь главным пластическим ресурсом ОАМ. При КРР роль ОАМ остается противоречивой. Изучение механизмов про- или противоопухолевого программирования моноцитов — актуальная проблема.

Цель исследования — выявить особенности транскрипционного профиля моноцитов у пациентов с КРР.

Материалы и методы. В исследование включены 37 пациентов с диагнозом РПК и 33 пациента с диагнозом рак ободочной кишки. Моноциты из периферической крови пациентов выделялись с помощью FACS. Исследование полнотранскриптомного профиля моноцитов проводилось с помощью NGS. Биоинформатический анализ данных проведен с использованием баз данных Hallmark, Reactome, KEGG и GO, валидация результатов NGS — с помощью RT PCR.

Результаты. При биоинформатической обработке данных NGS рака ободочной кишки и РПК выявлены различия в ряде дифференциально-экспрессирующихся генов, участвующих как в проопухолевой, так и в противоопухолевой активности моноцитов. Показано, что в моноцитах пациентов с РПК, по сравнению с больными раком ободочной кишки, активируются гены, вовлеченные в активацию сигналинга MTORC1, TGF β , IL-4, IL-13 и ангиогенез, что указывает на проопухолевую ориентацию моноцитов пациентов с РПК. В моноцитах больных раком ободочной кишки преимущественно активировались гены, вовлеченные в метаболические и эпигенетические сигнальные пути. При помощи ПЦР в режиме реального времени удалось валидировать результаты NGS на независимой выборке пациентов.

Заключение. Показано, что моноциты пациентов с РПК в большей степени имеют проопухолевый потенциал, моноциты больных раком ободочной кишки используют метаболические и эпигенетические механизмы регуляции. Полученные данные позволяют разъяснить разную направленность дифференцировки ОАМ при раке прямой и ободочной кишки.

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

Особенности встречаемости атипичных (гибридных) форм клеток Epcam⁺CD45⁺ у больных раком эндометрия

Е.В. Кайгородова^{1,2}, И.С. Заваруев², М.Ю. Грищенко^{2,3},
А.Л. Чернышова¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»;

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск;

³ГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер»

Введение. Одна из основных причин неудач в лечении рака эндометрия — его рецидивы и метастазы. Основной причиной рецидивов и метастазов служат ЦОК. Существуют данные о том, что данные клетки могут образовывать атипичные (гибридные) формы с клетками крови, усиливая свою злокачественность. Однако в настоящее время тема гибридных ЦОК только начинает изучаться, поэтому имеется много «темных пятен» в понимании роли данных клеток в развитии опухолевого заболевания.

Цель исследования — оценить особенности частоты встречаемости атипичных (гибридных) форм клеток Epcam⁺CD45⁺ в крови у больных раком эндометрия (до и после операции) в группе с выявленными рецидивами и гематогенными метастазами после лечения и без таковых.

Материалы и методы. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ. В проспективное исследование включено 45 больных с впервые диагностированным раком эндометрия (стадия T1a-2aNxM0, возраст от 27 до 72 лет), которые поступили на лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ или Томский областной онкологический диспансер. Материалом служила венозная стабилизированная кровь, взятая в объеме 5 мл до начала лечения. Наличие атипичных (гибридных) форм клеток Epcam⁺CD45⁺ в крови определяли методом многоцветной проточной цитометрии с помощью меченных различными флюорохромами MA к молекулам CD45, Epcam и ядерного красителя живых клеток NucBlue Live Cell Stain Ready Probes Reagent. Данные обработаны методами вариационной статистики с использованием Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). Достоверность различий оценивалась с помощью точного критерия Фишера.

Результаты. В проспективном исследовании показано, что атипичные (гибридные) формы клеток Epcam⁺CD45⁺ в крови до операции встречались у 76 % больных раком эндометрия. У 12 из 45 больных РЭ были выявлены рецидивы и/или метастазы после лечения. Сравнительная характеристика частот встречаемости Epcam⁺CD45⁺ клеток в группе больных раком эндометрия с выявленными рецидивами и (или) метастазами после лечения и без таковых выявила достоверные различия. Так, в группе больных раком эндометрия с рецидивами и (или) метастазами в крови у больных до операции чаще встречаются клетки Epcam⁺CD45⁺ ($p = 0,020$).

Заключение. Оценка атипичных (гибридных) форм клеток Epcam⁺CD45⁺ в крови может быть полезной для определения стратегии лечения больных раком эндометрия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МД-2017.2020.7).

Актин-связывающие белки: некоторые особенности циркулирующих опухолевых клеток при плоскоклеточном раке головы и шеи

Г.В. Какурина, М.Н. Стахеева, И.А. Бахронов, Е.Е. Середа,
Е.С. Колегова, О.В. Черемисина, И.В. Кондакова,
Е.Л. Чойнзонов

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) характеризуется частым метастазированием, рецидивированием и высокой смертностью. Опухолевая прогрессия обеспечивается рядом молекулярных каскадов с участием различных белков, в том числе актин-связывающих белков (АСБ), последние участвуют в таких клеточных процессах, как пролиферация, мобильность опухолевых клеток и пр. Попадающие в кровоток ЦОК, приобретают высокую миграционную способность и выживаемость. Обнаружение и молекулярная характеристика ЦОК — один из наиболее актуальных вопросов онкологии.

Цель исследования — охарактеризовать состав актин-связывающих белков ЦОК у больных ПРГШ и выявить связь с метастазированием.

Материалы и методы. Обнаружение и характеристику ЦОК (CD326⁺) в периферической крови больных ПРГШ (T2-4N0-2M0, $n = 15$) проводили с помощью проточной цитометрии с использованием меченных флюорохромами маркеров АСБ к кофилину (CFL1), профилину (PFN1), эзрину (EZR), фасцину (FSCN1) и аденилил циклаза ассоциированному протеину 1 (CAP1). В анализ включены лабораторные данные: абсолютное число лейкоцитов (WBC $\times 10^9$), относительное содержание лимфоцитов (LY %) и моноцитов.

Результаты. По сравнению с группой больных T2-3N1M0 ($n = 9$) ($p \leq 0,04$) у больных ПРГШ T2-3N0M0 ($n = 6$) отсутствовала субпопуляция CFL1⁺ и PFN1⁺ ЦОК (CD326⁺). У больных ПРГШ с ороговевающим типом эпителия субпопуляции ЦОК (CD326⁺), содержащие FSCN1 и CAP1, оказались выше, чем в группе без ороговевающего эпителия ($p \leq 0,05$). Достоверной разницы в составе АСБ у ЦОК (CD326⁺) относительно локализации опухоли (гортань, полость рта) не отмечено. Выявлены корреляции: CFL1⁺ ЦОК (CD326⁺) \leftrightarrow N \leftrightarrow LY % ($r = 0,6$), PFN1⁺ ЦОК (CD326⁺) \leftrightarrow N ($r = 0,8$), CFL1⁺ ЦОК (CD326⁺) \leftrightarrow T ($r = 0,6$), CAP1⁺CD45⁺лейкоциты \leftrightarrow CAP1⁺ ЦОК (CD326⁺) ($r = 0,6$).

Заключение. Формирование метастатического потенциала опухоли при ПРГШ, вероятно, связано с экспрессией CFL1⁺ и PFN1⁺ у ЦОК (CD326⁺). Изменение уровня CFL1 и PFN1 в опухолевой ткани отмечено при метастазах различных типов рака. О содержании данных белков в протеоме ЦОК мало известно.

Наличие связи между субпопуляциями ЦОК (CD326⁺) и CD45⁺лейкоцитами, содержащими CAP1, возможно, связано с участием данного белка во внутриклеточных сигнальных путях и при формировании адгезионных контактов. Более точные выводы об особенностях в составе АСБ в ЦОК требуют увеличения выборки пациентов.

Значение miR-34a и miR-146a в регуляции NF-κB при метастазирующем раке желудка

Ф.М. Кипкеева¹, Т.А. Музаффарова¹, М.П. Никулин²,
П.В. Апанович¹, О.А. Малихова², А.В. Карпухин¹

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

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

Цели исследования: изучение особенностей экспрессии ряда микроРНК при метастазировании РЖ, анализ механизмов связи микроРНК с метастазированием РЖ.

Материалы и методы. Образцы слизистой желудка (опухоль и норма) получены от больных, проходивших лечение на базе НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. В исследование включены пациенты с РЖ без метастазов и с метастазами в регионарные лимфатические узлы. Основное число образцов опухоли представлено аденокарциномой. Уровни экспрессии микроРНК определяли в опухолевой ткани относительно нормальной методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Исследование особенностей экспрессии miR-21, miR-34a, miR-141, miR-146a, miR-155, miR-222, miR-335 в образцах РЖ без метастазов и с поражением лимфатических узлов показало следующее. Экспрессия miR-34a и miR-146a в образцах РЖ снижалась по мере вовлечения регионарных лимфатических узлов в метастатический процесс. Обнаружена корреляция между miR-34a и miR-146a в образцах РЖ без отдаленных метастазов (РЖ N0-N3): $R = 0,65$, $p = 0,002$. Наблюдалась отрицательная корреляция уровня экспрессии miR-34a и miR-146a со степенью поражения регионарных лимфатических узлов ($R = -0,53$, $p = 0,01$ и $R = -0,72$, $p = 0,0005$ соответственно). Следовательно, экспрессия miR-34a и miR-146a понижается по мере увеличения числа пораженных лимфатических узлов. Напротив, экспрессия гена NF-κB, оказалась снижена в образцах неметастатического РЖ и повышалась при поражении лимфатических узлов метастазами. Обнаружена обратная корреляция между экспрессией miR-146a и NF-κB ($R = 0,76$; $p = 0,03$), а также miR-34a и NF-κB ($R = -0,756$, $p = 0,029$). Корреляции между уровнями экспрессии miR-34a и SNAIL не обнаружено. Возможно, при РЖ miR-34a не служит непосредственным ингибитором SNAIL, и необходимо более детально исследовать участие miR-34a в регуляции ЭМП при РЖ.

Заключение. Впервые получены результаты о связи экспрессии miR-34a, miR-146a и *NF-κB* с метастазированием РЖ. Отрицательная корреляция между экспрессией данных микроРНК и *NF-κB* может указывать на активацию *NF-κB*-сигнального пути при снижении экспрессии miR-34a и miR-146a в клетках РЖ. Видимо, данный сигнальный путь имеет значение при развитии метастазов РЖ.

Влияние комбинированного действия доксорубина и γ-излучения на экспрессию генов, связанных с пластичностью опухолевых клеток *in vitro*

Д.Ю. Кирюшина, И.А. Замулаева

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба, филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск

Введение. В последние годы появляется все больше данных об эффективности применения лучевой терапии в комбинации с химиопрепаратами при лечении злокачественных опухолей, в том числе РМЖ. Однако, на эффективность противоопухолевых воздействий сильно влияет внутриопухолевая гетерогенность опухолевых клеток по молекулярным признакам и функциональным свойствам, включая радио- и химиочувствительность. В частности, почти во всех ЗНО обнаружена субпопуляция ОСК, которая обладает повышенной резистентностью к широкому спектру цитотоксических воздействий и вследствие этого способна сохраняться после лечения. Показано, что пул данных клеток может увеличиваться после воздействия радиации за счет пролиферации ОСК и дедифференцировки части опухолевых клеток, которые сохранили жизнеспособность и осуществили ЭМП. Механизмы формирования пула ОСК, в том числе вследствие высокой пластичности опухолевых клеток, после комбинированных воздействий изучены недостаточно.

Цель исследования — оценить уровень экспрессии ряда генов, связанных с пластичностью клеток РМЖ линии MCF-7 после действия доксорубина (D), γ-излучения (G) и их комбинации (DG).

Материалы и методы. Клетки в логарифмической стадии роста инкубировали с D в концентрации 0,02 мкМ. Облучение выполняли в дозе 4Гр от источника ⁶⁰Со. Полученные образцы тотальной РНК клеток анализировали количественным методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. В группах D и DG наблюдалась сверхэкспрессия транскрипционного фактора SLUG, участвующего в ЭМП ($p < 0,01$ по сравнению с контролем). Его паралог SNAIL в меньшей степени повышал свою экспрессию в группах G и DG по сравнению с контролем

($p < 0,05$). Наблюдалось аддитивное влияние D и G на повышение экспрессии гена виментина, белка-маркера мезенхимальной ткани. Относительная концентрация мРНК генов *OCT4*, *NANOG*, кодирующих маркерные белки стволовых клеток, возросла приблизительно одинаково во всех опытных группах — примерно в 2 раза ($p < 0,05$ по сравнению с контролем).

Заключение. Таким образом, при комбинированном действии доксорубина и γ-излучения на клетки MCF-7 наблюдается рост экспрессии генов, способствующих ЭМП и поддержанию стволового фенотипа. Выяснение молекулярных механизмов пластичности опухолевых клеток представляет интерес для дальнейшего повышения эффективности комбинированного лечения.

Апробация гибридной модели *in vitro* для исследования взаимодействия раковых клеток и нервной системы

А.Р. Князева, И.И. Суворова

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Долгое время вклад нервной системы в процесс развития рака не рассматривался всерьез. В основном взаимодействие нервной системы и опухоли рассматривалось через феномен перинеуральной инвазии, которая служит важным прогностическим критерием при злокачественной трансформации опухоли. Кроме того, участие нервной системы в онкогенезе рассматривалось только в контексте опухолей головного и спинного мозга. Только в последнее 10-летие было убедительно показано, что нервная система играет ключевую роль в возникновении и прогрессировании других типов рака не нервного происхождения. На основе необходимости серьезных исследований по этой теме существует пробел в данных и адекватных моделях для изучения взаимодействия нервной системы и раковых клеток.

Цель исследования — апробация гибридной модели *in vitro* для исследования взаимодействия раковых клеток и нервной системы.

Материалы и методы. У мышей в возрасте до 2 мес извлекались дорсальные ганглии из позвоночного столба и помещались в каплю полутвердой матрицы Geltrex в чашке Петри. Спустя сутки ганглии образовывали нейриты, и далее кокультивировались в течение 5 дней с клетками различных типов рака человека (стандартная среда для культивирования клеток DMEM/F12 и 10 % сыворотка).

Результаты. Мы проанализировали миграцию в полутвердую матрицу (Geltrex) в направлении ганглиев, образовавших нейриты, разнообразных раковых клеток: линий Саран-2 (аденокарцинома поджелудочной железы), OKP-GS (карцинома почки), A549 (аденокарциномы легкого),

HT-1080 (фибросаркома), PA-1 (тератокарцинома яичника) и AsPC-1 (метастатическая аденокарцинома поджелудочной железы). В качестве контроля взята полутвердая матрица без ганглиев. Показано, что раковые клетки не мигрируют в пустой гель, в то время как привлекаются к матрице, содержащий ганглии с новообразованными нейритами, и с разной степенью инвазируют в гель. При этом, как правило, раковые клетки меняют свою морфологию при взаимодействии с нейритами.

Закключение. Апробированная нами модель показала воспроизводимые результаты для всех выбранных линий раковых клеток и может быть использована для анализа взаимодействия нервной системы и раковых клеток всех типов опухолей. С ее помощью можно наблюдать морфологические изменения раковых клеток и применять как основу для дальнейшего изучения механизмов взаимодействия раковых клеток с нервной системой.

Сокультивация клеток колоректального рака с моноцитами влияет на синтез и функциональную активность фактора белков теплового шока 1

Н.Е. Кокорева, С.А. Владимирова, А.Д. Никитина,
И.В. Гужова, Б.А. Маргулис

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Различные факторы, выделяемые иммунными клетками в микроокружение, запускают в раковых клетках защитные механизмы посредством сигнальных каскадов, благодаря которым может снижаться чувствительность раковых клеток к ХТ-препаратам. Сложность применения терапевтического подхода, нацеленного на иммунное микроокружение, заключается в том, что механизмы влияния такой популяции на опухолевые клетки плохо изучены. К основным защитным механизмам клетки относится система белков-шаперонов. Показано, что многие клетки синтезируют шапероны на высоком уровне, что позволяет им эффективно противостоять апоптотическим стимулам в ходе применения препаратов 1-й линии ХТ. Синтез шаперонов осуществляется благодаря транскрипционному фактору HSF1.

Цель исследования — изучить влияние опухолевого микроокружения на приобретение резистентности раковыми клетками через шаперонный аппарат клетки и главный транскрипционный фактор БТШ — HSF1.

Материалы и методы. В качестве клеточных моделей выбраны линии клеток HCC6, HCC7, HCC9, полученные из ткани опухоли пациентов с диагностированным КРР. В качестве модели иммунного опухолевого микроокружения использовалась суспензионная клеточная линия моноцитов THP1. В ходе эксперимента

клетки HCC сокультивировали с моноцитами в течение 3 или 20 ч. Методы конфокальной микроскопии и вестерн-блоттинга позволили оценить изменение уровня белка HSF1 и его активной посттрансляционной модификации pHSF1 (Ser326). С помощью метода ПЦР в реальном времени исследовали изменение уровня экспрессии гена *HSF1*.

Результаты. Иммуноблоттинг показал, что для всех клеточных линий характерно повышение уровня HSF1, pHSF1 (Ser326), а также к HSP70 после сокультивации с моноцитами линии THP1. С помощью метода конфокальной микроскопии продемонстрировано, что помимо увеличения pHSF1 (Ser326) в клетках происходит изменение ее локализации на ядерную, что свидетельствует об активности HSF1 как транскрипционного фактора. С помощью ПЦР в реальном времени установлено, что после 3-часовой сокультивации с моноцитами THP1 в клетках HCC повышается количество mРНК гена *HSF1*.

Закключение. В результате сокультивации с моноцитами THP1 в клетках КРР повышается синтез и функциональная активность HSF1, что может приводить к активации шаперонной системы и повышению резистентности клеток КРР к противоопухолевым препаратам.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-74-20161).

Мутационный профиль быстрорецидивирующего рака полости рта у молодых пациентов

Е.С. Колегова, Н.М. Новиков, А.А. Щеголева,
Р.С. Воробьев, И.К. Федорова, Д.Е. Кульбакин,
Е.В. Денисов

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. В настоящее время мало изучена актуальная проблема раннего рецидива у молодых больных раком полости рта. Заболеваемость раком полости рта среди пациентов моложе 45 лет растет с каждым годом, а наиболее частая причина смертности больных — возникновение рецидивов в 1 год после операции. При этом этиологические и патогенетические механизмы развития данного заболевания плохо охарактеризованы.

Цель исследования — изучение мутационного профиля быстрорецидивирующего рака полости рта у пациентов молодого возраста.

Материалы и методы. В исследование включена 31-летняя пациентка с плоскоклеточным раком языка: T3N1M0, отрицательный статус ВПЧ и курения, без сопутствующих заболеваний и отягощенной наследственности. Рецидив обнаружен спустя 4 мес после операции с курсом γ -терапии на фоне радиомодификации дисплатином. Из образцов периферической крови и тканей первичной и рецидивирующей опухолей

выделены образцы ДНК колоночным методом с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США). Подготовка экзомных ДНК-библиотек проводилась с помощью технологии SureSelect XT (Agilent, США), секвенирование выполнялось на платформе NextSeq 500 (Illumina, США).

Результаты. В ткани первичной опухоли и рецидива обнаружены 26 и 49 функционально значимых мутаций соответственно. Найдено 16 общих мутаций в следующих генах: *RBM15*, *TARBP1*, *ATP13A5*, *RASGRF2*, *PRPS1L1*, *HECW1*, *HIP1*, *RAB14*, *EML3*, *CIPC*, *TP53*, *MUC16*, *C19orf44*, *TSHZ3*, *GFY*, *TXNRD2*. Согласно литературным данным, мутации в генах *RBM15* и *TP53* служат драйверами для плоскоклеточных карцином головы и шеи. Частота мутаций гена *TP53* в опухолях головы и шеи составляет 66,8 %, при рецидивирующих случаях — 61,9 % (TCGA). Мутации гена *RBM15* выявляются в 1,0 % опухолей головы и шеи, среди которых рецидив возникает в 75 % случаев (TCGA). Анализ изменения aberrаций копий ДНК выявил общую для первичной опухоли и рецидива амплификацию участка хромосомы 2p24.1–25.3. Данный регион содержит ген *MYCN*, чьи мутации драйверные для базалиомы и нейробластомы. По данным TCGA, частота амплификаций данного гена при раке головы и шеи составляет 0,4 %, среди которых в 50 % случаев возникает рецидив.

Закключение. Выявленные генетические нарушения могут стать основой для разработки подходов предсказания риска рецидивирования рака полости рта у пациентов до 45 лет.

Изучение роли α -актина-4 в репарации ДНК в клетках немелкоклеточного рака легкого

Д.В. Кригер, К.С. Новицкая, Г.В. Васильева,
Е.В. Ломерт, Д.Г. Тентлер

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Первоначально К. Honda и соавт. (1998) описали α -актинин-4 (ACTN4) как актин-связывающий белок, ассоциированный с клеточной подвижностью. С тех пор в литературе описано множество различных функций ACTN4 как цитоплазматических, так и ядерных, ассоциированных с клеточными процессами, играющих важную роль в туморогенезе. Среди его функций стоит отметить следующие: влияние на подвижность клетки, клеточный цикл, ЭМП, активация ядерных рецепторов и регуляция NF κ B-зависимой транскрипции генов. Такой широкий спектр клеточных процессов, в который оказывается вовлечен ACTN4, вполне может быть обусловлен белками-партнерами, с которыми он взаимодействует. Он обнаруживается в комплексах ремоделирования хроматина Ino80, который вовлечен в регуляцию транскрипции,

репликации и репарации молекулы ДНК. Изменения затрагивающие системы репарации ДНК могут быть причиной, обеспечивающей резистентность многих опухолей к противораковой терапии. Предполагаем, что ACTN4 может взаимодействовать с системами репарации разрывов ДНК.

Цель исследования — оценить влияние уровня экспрессии ACTN4 на эффективность репарации ДНК в клетках HMP1 в условиях генотоксического стресса.

Материалы и методы. В исследовании использовались клеточные линии NSCLS (H1299 и H460) нокаут (KO) и сверхэкспрессией (OE) гена *ACTN4*. Для анализа эффективности репарации применялся метод CometAssay и иммуноокрашивание фокусов гистона γ H2AX. Анализ клеточного цикла проводился на проточном цитофлуориметре Cytoflex. Выживаемость клеток оценивалась при помощи МТТ теста.

Результаты. Метод CometAssay продемонстрировал, что в клетках ACTN4 KO репарация разрывов ДНК идет быстрее, при этом наблюдается обратный эффект при сверхэкспрессии *ACTN4*. В клетках ACTN4 KO количество фокусов гистона γ H2AX значительно отличается по сравнению с контрольной линией, однако эффект зависит от исследуемой линии клеток. Также клетки ACTN4KO более устойчивы к воздействию этиопозида, а их клеточный цикл смещен в фазу G0/G1 в условиях генотоксического стресса.

Закключение. Можно предположить, что ACTN4 взаимодействует с системами репарации ДНК при ответе клетки на повреждение ДНК, а его экспрессия может определять устойчивость клеток к генотоксическому стрессу.

Сигнальные пути врожденного иммунного ответа на ранних этапах прогрессии инвазивного рака шейки матки

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

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск

Введение. На сегодняшний день накоплены свидетельства молекулярной гетерогенности РШМ в отношении его иммунного фенотипа. В значительной доле случаев он характеризуется обогащением иммунным инфильтратом, воспалительным микроокружением и параллельным развитием локальной иммуносупрессии, в то время как на начальных этапах ВПЧ-инфекции врожденные защитные механизмы существенно подавлены.

Цель исследования — выяснить, какие изменения иммуноассоциированного транскриптома сопровождают переход от предраковых нарушений к инвазивному раку.

Материалы и методы. Изучение дифференциальной экспрессии генов *DEGs*, обогащения сигнальными путями, а также исследование сетей коэкспрессии проведено на основе метода РНК-секвенирования с последующей биоинформатической обработкой с использованием операционных образцов ВПЧ (–)/ВПЧ (+) нормального эпителия, цервикальных интраэпителиальных неоплазий 1, 2, 3-й степеней (ЦИН), преинвазивного РШМ (CIS), микрокарциномы (стадия IA1), инвазивного РШМ стадий IA2–IIB.

Результаты. Среди достоверных *DEGs* с повышенной экспрессией (при раннем инвазивном РШМ относительно ЦИН/CIS) выявлено обогащение генов путями, ассоциированными с врожденным иммунным ответом и противовирусным ответом (включая тип I ИФН-зависимый и IFN-γ-зависимый). В том числе, обнаружена up-регуляция группы ИФН-стимулируемых генов (*OAS1-3*, *MX1*, *IRF9*, *ISG15*, *IFI44*), компонентов системы цитоплазматических ДНК/РНК-сенсоров (TLRs, NLRs, AIM2, IFI16, RLRs/MAVS). Одновременно наблюдаемая индукция экспрессии провоспалительных хемокинов (*CXCL9*, *CXCL10*, *CX3CL1*) в образцах микрокарциномы и раннего инвазивного РШМ (по сравнению с преинвазивными стадиями) свидетельствовала о повышенной способности рекрутировать в состав своего микроокружения активированных Т-, В-лимфоцитов, тем не менее, параллельное увеличение уровня таких факторов, как *IDO1*, *LGALS9*, *IL4R*, указывало на формирование локальной иммуносупрессии. Анализ сетей геной коэкспрессии подтвердил взаимосвязь наблюдаемых изменений в системе врожденных иммунных механизмов с процессами инвазии и опухолевой диссеминации.

Закключение. Механизмы врожденного иммунного ответа (в том числе вирусного распознавания и защиты) тесно вовлечены в процессы формирования инвазивного фенотипа РШМ, что имеет потенциальное значение для развития методов иммунотерапии вирус-ассоциированного рака.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-665).

Транскриптом моноцитов больных колоректальным раком в динамике химиотерапевтического лечения

И.В. Ларионова^{1,2}, П.С. Ямщиков¹, А.Д. Казакова¹,
М.Р. Патышева^{1,2}, Е.О. Казакова¹, Е.С. Григорьева²,
А.С. Тарасова², С.Г. Афанасьев², Н.В. Чердынцева^{1,2},
Ю.Г. Кжышкова^{1,2}

¹ФГАУ ВО «Национальный исследовательский
Томский государственный университет»;

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Основной пластический ресурс макрофагов в опухоли составляют циркулирующие моноциты.

Цель исследования — изучение роли программирования моноцитов в формировании про- и противоопухолевых фенотипов макрофагов и эффективности ХТ при раке кишечника.

Материалы и методы. В исследование включены больные РПК, получавшие НХТ. Моноциты периферической крови пациентов получены с помощью клеточной сортировки. Кровь забиралась до курса НХТ и после него перед оперативным вмешательством. Полнотранскриптомный профиль моноцитов определяли с помощью РНК секвенирования с последующим биоинформатическим анализом. Для представления результатов NGS использовали Hallmark, Reactome, KEGG и GO. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено местным комитетом по медицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Результаты. С помощью биоинформатической обработки данных проведен сравнительный анализ транскриптома моноцитов больных РПК до и после НХТ. Выявлены дифференциально-экспрессирующиеся гены и транскрипционные сигнатуры, ассоциированные с эффектом ХТ. Функциональное аннотирование ДЭГ проведено с целью идентификации сигнальных путей, характерных для моноцитов в динамике НХТ. Используя параметр NES >1,5, мы обнаружили, что в моноцитах после ХТ подавляются следующие процессы: программы транскрипции IL-4, IL-13 и IL-10-зависимые пути, TLR- и MTORC-сигналинг, гипоксия, представление и процессинг антигена, ROS-зависимый сигналинг, метаболизм жирных кислот. Программы транскрипции, отвечающие за иммунодефицит, Wnt-бета-катенин сигналинг и скавенджинг активировались в моноцитах после НХТ. На основе результатов биоинформатического анализа выбраны гены интереса, для которых провели валидацию на независимой выборке пациентов с РПК методом ПЦР в режиме реального времени.

Закключение. Выявлены уникальные дифференциальные паттерны программирования моноцитов у больных РПК в динамике противоопухолевого ХТ-лечения. На выбранных генах подтверждены результаты РНК-секвенирования для независимой выборки. Полученные данные позволят выявить малоинвазивные маркеры предсказания ответа опухоли на НХТ. Следующий этап исследования — определение эпигенетических особенностей программирования моноцитов под влиянием ХТ.

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

Роль сигналинга ростовых факторов и цитокинов в прогрессии нейробластом

Т.Д. Лебедев¹, Э.Р. Вагапова¹, П.В. Спирин¹,
Д.М. Коновалов², А.Г. Румянцев², А.А. Буздин³,
В.С. Прасолов¹

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

²ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дм. Рогачева» Минздрава России, Москва;

³Институт персонализированной медицины,
ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России

Введение. Нейробластома — педиатрическое злокачественное заболевание, на которое приходится порядка 15 % всех детских смертей, связанных с онкологией. Значительная часть нейробластом относится к группе высокого риска (около 40 % всех случаев), а 5-летняя выживаемость для данной группы составляет менее 50 %. Таким образом, стоит острая проблема разработки новых методов предсказания развития резистентности и рецидивов, а также подбора новых подходов к лечению нейробластомы.

Цель исследования — разработать модель предсказания ответа опухолей на терапию на основе экспрессии генов, вовлеченных в сигналинг ростовых факторов, которая может послужить основой для создания тест-панели с перспективой ее тестирования и применения в клинических исследованиях.

Материалы и методы. Использованы опубликованные ранее данные по экспрессии генов 1 тыс. 189 образцов нейробластомы. Для классификации опухолей и создания предсказательных моделей применялись методы машинного обучения. Анализ активности сигнальных путей проведен для 60 образцов нейробластомы из НМИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева. Для измерения влияния ростовых факторов на выживание клеток использованы клетки 6 линий нейробластомы человека. Активность ERK-киназы измеряли с помощью флуоресцентного репортера ERK-KTR.

Результаты. Показано, что экспрессия генов, вовлеченных в сигналинг ростовых факторов, делит нейробластомы на 3 группы, каждая из которых относится к определенной группе риска. Создана модель для предсказания исхода течения заболевания на основе экспрессии 48 генов, которая позволяет выявить опухоли, плохо поддающиеся стандартной терапии. Анализ сигнальных путей в образцах нейробластомы позволил выявить ростовые факторы, ассоциированные с плохим ответом опухоли на терапию. Протестировано 36 сочетаний ростовых факторов и противораковых препаратов на выживание клеток нейробластом, показано, что эритропоэтин (ЕРО) и фактор роста нервов (NGF) существенно снижают эффективность противораковых препаратов. С помощью репортерной

системы ERK-KTR мы показали, что активация ERK фактором роста нервов и эритропоэтином служит ключевым событием, способствующим повышенной выживаемости клеток, обработанных противораковыми препаратами. Ингибирование ERK синергически усиливает действие противораковых препаратов, преимущественно ингибиторов рецепторных тирозинкиназ.

Заключение. Разработанная модель предсказания ответа опухолей на терапию на основе экспрессии 48 генов может послужить основой для создания тест-панели и ее тестирования в клинических исследованиях. Показано, что эритропоэтин и фактор роста нервов снижают эффективность противораковых препаратов в отношении клеток нейробластомы. Использование ингибиторов ERK — перспективное направление для повышения эффективности терапии нейробластомы.

Механизмы индукции дедифференцировки опухолевых клеток, определяющей переход микрометастазов в макрометастазы

Н.В. Литвяков, М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов,
А.А. Нуштаева, Д.С. Долгашева, К.А. Гаптулбарова,
И.А. Цыденова

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. В настоящее время появились исследования, которые показывают, что именно дифференцированные опухолевые клетки, попадая во внутренние органы, дедифференцируются и дают макрометастазы. Напрямую показано, что большинство метастазов КРР образовано клетками Lgr5⁻. Данные клетки восстанавливали популяцию стволовых клеток Lgr5⁺, что дает начало макрометастазу. Таким образом, способность к дедифференцировке опухолевой клетки, которая выходит из спящего состояния во внутренних органах, определяет — произойдет ли образование ОСК в микрометастазе и сможет ли она дать начало макрометастазу. Дедифференцировка — новоприобретенное свойство опухоли, в нормальной ткани дедифференцировка не происходит.

Цель исследования — осветить генетические механизмы дедифференцировки опухолевых клеток, которая дает начало переходу микрометастазов в макрометастазы.

Материалы и методы. Анализ литературы и результатов собственных исследований.

Результаты. Многие исследования показывают индукцию стволовых свойств у опухолевых клеток под действием принудительной (или эктопической) экспрессии генов стволовости и потерю таких свойств при их ингибировании. В наших работах установлено, что амплификации генов стволовости приводят

к дедифференцировке опухолевых клеток, в то время как их отсутствие ведет к тому, что дифференцированные опухолевые клетки не способны дедифференцироваться, а опухоли без амплификаций не метастазируют. Это показано в наших исследованиях на культурах опухолевых клеток MCF7, SCBR3, BT549, на первичных опухолевых культурах больных РМЖ, исследованиях *in situ*, а также в наблюдениях N. Litviakov и соавт (2020, 2020, 2021) за пациентами. При большинстве локализаций частота соматических мутаций генов стволовости составляет менее 2 %, при этом частота амплификаций доходит до 90 % и коррелирует с частотой метастазирования.

Закключение. Амплификации локусов генов стволовости в опухолевых клетках служат основным механизмом приобретения способности к дедифференцировке для солидных С-опухолей: опухолевые клетки без данной амплификаций не способны к дедифференцировке и образованию метастазов. Для предотвращения развития метастазов необходима разработка лекарственных средств, направленных на ингибирование эктопической экспрессии генов стволовости.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 21-15-00243).

Фенотипическая пластичность клеток MCF-7-SNAI1

Н.И. Литовка, И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова

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

Цель исследования — изучение морфологических фенотипов линии MCF-7-SNAI1, появляющихся в результате ЭМП, вызванного активацией экспрессии *SNAI1*.

Материалы и методы. В работе использована клеточная культура линии РМЖ MCF-7-SNAI1, стабильно экспрессирующая tet-off регулируемую конструкцию. Клетки исследовали с помощью DIC-видеомикроскопии на меченых стеклах с самым высоким иммунофлуоресцентным окрашиванием и Image-анализом.

Результаты. При активации *SNAI1* клетки вступали в ЭМП и начинали мигрировать по подложке. Культура MCF-7-SNAI1 с активированной экспрессией *SNAI1* отличалась клеточной гетерогенностью: выделено 7 вариантов фенотипов. Активно мигрирующие фенотипы составили 46 % всех клеток, среди них мы выделили направленно мигрирующие клетки; около 42 % клеток имели неподвижный или малоподвижный мезенхимальный фенотип; 12 % клеток — мезенхимально-амебоидный фенотип. Для клеток, вступивших в ЭМП в результате активации *SNAI1*, оказалась характерна фенотипическая пластичность: клетки в течение нескольких минут могли менять свой фенотип, направление и скорость миграции.

В контрольной культуре клетки образовывали плотные высокие островки, в апикальной части клеток располагались узкие кольцевые актиновые пучки, ассоциированные со стабильными межклеточными адгезионными контактами. В клетках, вступивших в ЭМП, наблюдалась дезорганизация тангенциальных адгезионных контактов, ассоциированная с фрагментацией кольцевого актинового пучка или полным его разрушением, на межклеточных границах образовывались ламеллиподии. Клетки приобретали переднезаднюю полярность, на ведущем крае аккумулировался комплекс *Arp2/3*, нуклеирующий полимеризацию актина, что определяло формирование ламеллиподий. Ламеллиподии прикреплялись к подложке посредством многочисленных мелких фокальных адгезий. В направленно мигрирующих клетках центр организации микротрубочек часто располагался за ядром. Клетки с активированным *SNAI1* отличались от контрольных внутриклеточным распределением α -катенина и α -актина. В контрольных клетках MCF-7-SNAI1 α -катенин входил в состав тангенциальных адгезионных контактов. В мигрирующих клетках α -катенин и α -актин концентрировались на ведущем крае клетки в узкой зоне на краю ламеллиподий.

Закключение. Таким образом, показано, что направленная клеточная миграция связана с активацией полимеризации актиновой сети, перераспределением белков актин-катенинового комплекса, перестройкой фокальных контактов.

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

Особенности экспрессии генов иммунных контрольных точек в связи с развитием рака желудка

Д.Ж. Мансорунов¹, Н.В. Апанович¹, Ф.М. Кипкеева¹,
Т.А. Музаффарова¹, М.П. Никулин², О.А. Малихова²,
А.В. Карпунин¹

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

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

Введение. Рак желудка — одно из самых распространенных ЗНО. В последнее время наиболее перспективным нововведением в терапии РЖ стали иммунные контрольные точки (ИКТ) — ингибиторы *PD-1*, показавшие эффективность лечения. Однако доля отвечающих на лечение больных не велика. Помимо *PD-L1/PD-1* существуют и другие ИКТ, экспрессия которых в опухоли может служить одной из причин недостаточной эффективности блокирования *PD-L1/PD-1*.

Цель исследования — изучение профилей экспрессии генов ИКТ *PD-L1*, *IDO1*, *CEACAM1*, *PVR*, *TDO2*, *CD276*, *GAL9*, *ADAM17* в связи с развитием и метастазированием РЖ.

Материалы и методы. Исследовано 49 парных образцов ткани слизистой оболочки желудка (опухолевая ткань и морфологически нормальная ткань). Выделены 2 группы: РЖ без метастазов (30) и РЖ с метастазами (19 пациентов). Средний возраст больных — 61 год. Образцы опухоли преимущественно представлены аденокарциномой. Измерение уровня экспрессии мРНК генов проводили методом ПЦР в реальном времени. Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты. Изучены профили экспрессии генов *PD-L1*, *IDO1*, *CEACAM1*, *PVR*, *TDO2*, *CD276*, *GAL9*, *ADAM17*. Совместно с геном *PD-L1*, с высокой частотой экспрессируются также гены *IDO1*, *TDO2*, *GAL9*, *CEACAM1*, *PVR*. При статистической обработке данных с использованием ROC-анализа выявили, что гены *PVR* и *TDO2* имеют статистически значимые отличия между двумя группами по уровню их экспрессии ($p \leq 0,001–0,032$). Ассоциация уровня экспрессии данных генов с метастазированием проверена с помощью точного критерия Фишера ($p \leq 0,001–0,026$). При метастатическом РЖ чаще наблюдается повышенная (относительно неметастатического РЖ) экспрессия гена *TDO2*, а экспрессия гена *PVR*, наоборот, снижается.

Закключение. Найдена связь экспрессии генов *TDO2* и *PVR* с метастазированием РЖ: при метастазировании РЖ экспрессия гена *PVR* понижается, а *TDO2* — повышается. Можно с уверенностью сказать, что ген *TDO2* — перспективная мишень иммунотерапии при метастатическом РЖ. Полученные данные имеют также значение для развития прогностических маркеров и способов терапии РЖ в дальнейшем.

Генетический и транскрипционный ландшафт циркулирующих опухолевых клеток у больных раком молочной железы

М. Е. Меняйло, В. Р. Зайнуллина, Л. А. Таширева,
С. Ю. Золотарёва, Т. С. Геращенко, В. В. Алифанов,
О. Е. Савельева, Е. С. Григорьева, Н. В. Чердынцева,
В. М. Перельмутер, Е. В. Денисов

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. Наиболее распространенное ЗНО среди женщин во всем мире — РМЖ. Большинство смертей таких больных связано с метастазами. Наличие ЦОК, как правило, связано с высокой вероятностью гематогенного метастазирования и, соответственно, неблагоприятным прогнозом РМЖ. Известно, что ЦОК чрезвычайно гетерогенны, из них только малая часть способна выжить в кровотоке и сформировать метастазы. РНК-секвенирование единичных клеток служит эффективным инструментом для изучения клеточной гетерогенности, идентификации новых популяций клеток и анализа их фенотипа.

Цель исследования — анализ популяционного состава, генетических и транскрипционных характеристик ЦОК у больных РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включены 20 пациентов с РМЖ. Методом проточной цитофлуориметрии у них выявлены ЦОК, которые обогащали с помощью набора RosetteSep Human CD45 Depletion Cocktail (STEMCELL Technologies Inc.) и секвенировали с использованием реагентов Chromium Single Cell 3', v3.1 (10x Genomics) на приборе NextSeq 2000 (Illumina). Данные проанализированы с помощью Seurat. Идентификация aberrаций числа копий генов (CNA) и анеуплоидии на основании данных РНК-секвенирования проводилась с помощью inferCNV и CopyKAT.

Результаты. Всего идентифицировано 923 клетки с фенотипом $CD45^- EpCAM^+/KRT5/7/8/17-19^+/E-кадгерин^+$, описываемые в литературе как ЦОК. Данные клетки представлены 3 кластерами, однако только в 2 из них выражены сигнальные пути, ассоциированные с онкогенезом (HIF-1, PD-L1/PD1, MAPK, ErbB и др.). Для клеток данных кластеров характерна гиперэкспрессия *CLDN5*, *CD47*, *CCL5* и других генов, связанных, по данным литературы, с низкими показателями выживаемости больных РМЖ. Во всех 3 кластерах обнаружены CNAs. Однако только клетки из кластеров 1 и 3 оказались преимущественно анеуплоидными. Кроме того, обнаружена 751 клетка с фенотипом $CD45^+ EpCAM^+/KRT5/7/8/17-19^+/E-кадгерин^+$, что описывается в литературе как гибридные опухолевые клетки. Данные клетки также представлены 3 кластерами, для каждого из которых характерны опухоль-ассоциированные сигнальные пути и гиперэкспрессия генов, ассоциированных с плохим прогнозом — *PGK1*, *VIM*, *ZEB2* и др. Однако только 1 кластер содержал анеуплоидные клетки (16 %).

Закключение. Показано, что ЦОК гетерогенны и представлены популяциями с различными молекулярно-генетическими характеристиками, часть из которых демонстрирует геномную нестабильность и сигнальные пути, ассоциированные с онкогенезом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-75-300160).

Диагностическая и прогностическая значимость ингибитора ангиогенеза эндостатина у пациентов с саркомами костей

О. Н. Меркурьева, А. А. Алферов, Ю. Б. Кузьмин,
И. В. Бабкина, И. В. Булычева, Н. Е. Кушлинский

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

Введение. Ангиогенез имеет решающее значение для опухолевого роста и метастазирования, а его

ингибиторы считаются перспективными мишенями для неинвазивной диагностики и таргетной терапии. Эндостатин (С-терминальный фрагмент коллагена XVIII типа) подавляет рост и миграцию опухолевых клеток и может рассматриваться как потенциальный ингибитор ангиогенеза.

Цель исследования — анализ диагностической и прогностической значимости сывороточного уровня эндостатина у пациентов с первичными злокачественными опухолями костей различных гистологических типов.

Материалы и методы. Проводили сравнительный анализ уровней эндостатина в сыворотке крови 29 здоровых доноров и 110 больных первичными саркомами костей (остеосаркома — 34, хондросаркома — 33, саркома Юинга — 27, плеоморфная недифференцированная саркома — 10, паростальная остеосаркома — 6) и ретроспективный анализ общей выживаемости.

Сывороточный уровень эндостатина определяли до начала лечения методом ИФА на анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия) с использованием реактивов Human Endostatin Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, США).

Результаты. В группе пациентов с саркомами костей медиана концентрации эндостатина составила 152,6 нг/мл, что статистически значимо выше по сравнению с контролем (110,7 нг/мл; $p < 0,01$). Общая выживаемость пациентов с уровнем эндостатина ≥ 200 нг/мл до начала лечения была статистически значимо ниже выживаемости больных, у которых уровень эндостатина составлял < 200 нг/мл ($p < 0,05$). Статистически значимых различий уровней эндостатина и общей выживаемости в группах больных с различными гистологическими типами опухолей не выявлено.

Заключение. Сравнительный анализ выявил статистически значимые различия уровней эндостатина между больными с саркомами костей и контрольной группой. Анализ выживаемости пациентов показал, что сывороточный уровень эндостатина может применяться также для оценки прогноза заболевания у больных первичными саркомами костей независимо от их гистологического строения.

Различия и сходства в механизмах приобретения устойчивости к протеасомным ингибиторам клетками множественной миеломы

Н.И. Моисеева, Е.М. Барышева, С.С. Шушанов,
Л.А. Лалетина

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

Введение. Бортезомиб (btz) — препарат 1-й линии ХТ множественной миеломы, также за последние 5 лет в терапию 2 и 3-й линий вошли другие протеасомные

ингибиторы — иксазомиб (ixz) и карфилзомиб (cfz), последний отличается по химической структуре от btz и ixz. В процессе лечения развивается ЛУ ко всем протеасомным ингибиторам, способы возникновения данной устойчивости продолжают изучаться. Изменения в клетках могут касаться активации ответственных за выброс ксенобиотиков ABC-транспортеров (Р-гликопротеин Pgp, BCRP), увеличения количества иммунопротеасом (заменяющих ингибированные протеасомы), дисфункции в различных сигнальных путях. При этом разные протеасомные ингибиторы могут приводить к активации несхожих защитных механизмов в клетках множественной миеломы, подвергнутых длительному воздействию протеасомных ингибиторов.

Цель исследования — исследование механизмов формирования лекарственной устойчивости к ингибиторам протеасом, применяемым при терапии множественной миеломы.

Материалы и методы. Клеточные линии множественной миеломы RPMI8226 и АМО-1 и их устойчивые к протеасомным ингибиторам сублинии. Применялись МТТ-тест для оценки цитотоксичности, проточная цитометрия (определение экспрессии белков и функциональные тесты), иммуноцитохимия, ПЦР в реальном времени.

Результаты. После культивирования клеток линий RPMI8226 и АМО-1 с btz и cfz в течение 5 мес получены более устойчивые (в 4–5 раз) сублинии. Мы обнаружили, что клетки сублинии АМО-1/CFZ получили 3-кратную устойчивость к доксорубину, но не к другим протеасомным ингибиторам. Сублинии, устойчивые к btz, приобрели такую же либо даже большую устойчивость к cfz и ixz. В линиях RPMI8226/BTZ и АМО-1/BTZ подавлялась экспрессия Pgp, тогда как в АМО-1/CFZ она значительно возрастала. Функциональные тесты по выбросу родамина 123 показали, что cfz служит субстратом Pgp. Отличия обнаружены в экспрессии других ABC-транспортерах, Notch, генах протеасом, IGF-R системы, а также в локализации белка YB-1 в клетках — одного из факторов транскрипции Pgp.

Заключение. Выявлено, что бортезомиб и карфилзомиб по-разному влияют на экспрессию ABC-транспортеров и по-разному взаимодействуют с Pgp. Бортезомиб приводит к формированию перекрестной устойчивости к другим протеасомным ингибиторам, тогда как карфилзомиб этим свойством не обладает, однако причины этого до конца не ясны.

Морфологическая характеристика изменений плоского эпителия верхнего отдела пищеварительного тракта, возникающих в модельных организмах в условиях провоцированного канцерогенеза

В.Г. Шестакова, Л.И. Нигматуллина, И.С. Долгополов, М.Ю. Рыков

ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России

Введение. Распространенность ЗНО слизистой оболочки верхнего отдела пищеварительного тракта, снижение качества жизни этих пациентов при несвоевременной диагностике объясняют необходимость разработки протоколов раннего выявления предопухолевых изменений.

Цель исследования — изучение морфологических характеристик изменений плоского эпителия верхнего отдела пищеварительной трубки, возникающих в модельных организмах в условиях провоцированного канцерогенеза.

Материалы и методы. Применен метод хронического эксперимента на животных: 40 самок нелинейных белых крыс, которые распределены на 4 равные группы ($n = 10$). Двум контрольным группам крыс осуществляли механическую травматизацию слизистой оболочки полости рта, а затем аппликационно наносили 0,9 % раствор NaCl и 1 % водный раствор диметилсульфоксида (DMSO) с частотой 2 раза в неделю. Крысам 3-й группы после травматизации аппликационно наносили 1 % водный раствор DMSO, содержащий 0,1 мг/мл 4-нитрохинолин-N-оксида с той же частотой. Четвертая группа крыс — интактная. На 1, 7, 10, 14-е сутки от начала эксперимента, а затем каждые 14 сут брали цитологический материал со слизистой полости рта и окрашивали по Папаниколау. Для сопоставления возникающих изменений изучали гистологическую картину органов верхнего отдела пищеварительной трубки.

Результаты. Животные из основной группы (4-NQO) демонстрировали отставание в наборе массы тела более стандартной дисперсии, чем в контрольных и интактной группе. Атипичные клетки неопределенной значимости появлялись в мазках начиная с 42-х суток эксперимента. Начиная с 56-х суток в мазках, полученных от животных группы 4-NQO, обнаружены атипичные клетки, описываемые в терминах Bethesda как «внутриэпителиальные поражения низкой степени». Диагностически значимыми признавались парабазальные клетки плоского эпителия с атипичными крупными ядрами (более чем в 3 раза по сравнению с эталонными), анизоуклеозом, с изменчивыми контурами ядерной мембраны в пределах одной клетки, грубодисперсным хроматином.

Заключение. Выраженность морфологических изменений в плоском эпителии верхнего отдела пищеварительного тракта в направлении предракового состояния достоверно выше в основной группе при длительном воздействии канцерогенного фактора, по сравнению с контрольными и интактной группами ($p < 0,05$). Таким образом, подобное цитологическое исследование может быть предложено для изучения в клинике в качестве скрининга предраковых состояний ротоглотки и верхнего отдела пищевода.

Устойчивость клеток глиобластомы к темозоломиду ассоциирована с экспрессией протеогликанов

С.А. Никитина¹, А.Ю. Цидулко¹, Э.В. Григорьева¹

ФГБНУ «ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины» Минздрава России, Новосибирск

Введение. Глиобластома — злокачественная опухоль головного мозга, отличающаяся агрессивностью и плохим прогнозом, который во многом связан с формированием у опухоли устойчивости к ХТ темозоломидом. Эта устойчивость основана на высокой гетерогенности опухолевых клеток глиобластомы, которые по-разному реагируют на ХТ. Мы предполагаем, что в развитие устойчивости могут быть вовлечены сложные белково-углеводные молекулы ПГ, основные компоненты ВКМ ткани головного мозга.

Цель исследования — изучение вовлеченности ПГ в развитие устойчивости клеток глиобластомы к темозоломиду.

Материалы и методы. Чтобы смоделировать реакцию опухоли на ХТ, использовали 7 клеточных линий глиобластомы человека (U-87MG, U-343, LN-18, HS683, LN-215, LN-405, LN-71), которые обрабатывали темозоломидом в разных концентрациях. Количество живых и мертвых клеток и IC50 темозоломида определяли через 24–72 ч с помощью системы высокопроизводительного скрининга InCellAnalyzer 2200. Экспрессию ПГ в клетках оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Результаты. Показано, что исследованные клеточные линии обладают разной устойчивостью к темозоломиду: наиболее устойчивы клетки LN-18 (IC50 386 мкМ), а наименее устойчивы — U-343 (IC50 7,9 мкМ). Суммарная экспрессия всех ПГ в клетках линии LN-18 в 2,5 раза больше, чем в клетках U-343. Паттерн экспрессии ПГ в данных линиях также неодинаков: U-343 отличается более высокой экспрессией синдекана-3 и глипикана, а LN-18 — CD44 и бигликана. Показана позитивная корреляция экспрессии ПГ CD44 и CSPG4/NG2 и IC50 темозоломида для разных клеточных линий (коэф. Пирсона 0,73 для CSPG4/NG2 и 0,92 для CD44).

Заключение. Клеточные линии глиобластомы характеризуются различной устойчивостью к темозоломиду. Высокая экспрессия CD44 и CSPG4/NG2 ассоциирована с устойчивостью клеток глиобластомы к темозоломиду, что подтверждает вовлеченность этих ПГ в развитие устойчивости глиобластомы к ХТ.

Применение ингибитора синтеза белков теплового шока CL-43 предотвращает эпителиально-мезенхимальный переход, стимулированный гипергликемией в клетках колоректального рака

А.Д. Никитина, С.А. Владимирова, Б.А. Маргулис,
И.В. Гужова

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Колоректальный рак высоко метастазирующая опухоль, и у четверти пациентов на момент диагноза выявляются метастазы в печени. Следует учитывать, что риск развития и агрессивность КРР существенно увеличивается при диабете. Известно, что молекулярная основа метастазирования — ЭМП. Показано, что раковые клетки характеризуются повышенным количеством белков теплового шока (БТШ). Белки данного семейства выполняют множественные функции, в том числе подавляют апоптоз, препятствуют старению, усиливают пролиферацию. Помимо этого, сразу несколько семейств БТШ участвуют в развитии метастазирования раковой опухоли.

Цель исследования — исследовать в клеточных моделях КРР человека влияние ингибитора синтеза HSP70 на способность подавлять ЭМП, индуцированный гипергликемией.

Материалы и методы. В качестве ингибитора выбрано соединение CL-43 из группы карденолидов, ранее открытое в нашей лаборатории. Для моделирования процесса ЭМП в течение 1 нед поддерживали рост клеток КРР линии DLD1 в среде с высоким содержанием глюкозы (80 mM) в присутствии или отсутствии ингибитора. В первую очередь мы исследовали миграционные характеристики клеток. Анализ подвижности клеток, выполненный с помощью xCELLigence, и анализ заживления ран продемонстрировали увеличение миграции в условиях высокого уровня глюкозы, а также ингибирование подвижности из-за введения CL-43. С помощью конфокальной микроскопии обнаружено, что экспрессия эпителиального маркера E-кадгерина в клетках DLD1 в условиях гипергликемии почти полностью подавлена, в то время как CL-43 предотвращал этот процесс. Экспрессия маркеров ЭМП Snail, Slug и Twist, оцененная с помощью qPCR, также снизилась до контрольного уровня, когда CL-43

использовался в присутствии высокой концентрации глюкозы. Аналогичные результаты получены и на 2 других линиях клеток КРР SW837 и HCC-9, выделенных из опухоли толстой кишки пациента.

Заключение. Выявлено, что использование CL-43 предотвращает развитие ЭМП при гипергликемии. Данный ингибитор может стать дополнительным компонентом в лечении особенно агрессивных форм КРР.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-74-20161).

Актин-зависимый механизм опухолевой прогрессии клеток рака молочной железы, ассоциированный с развитием резистентности к действию таксола

М.В. Новикова¹, В.Б. Дугина², С.В. Бойчук³, Б.П. Копнин¹,
П.Б. Копнин¹

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

²НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
ГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России

Введение. Один из самых распространенных и агрессивных типов ЗНО, ассоциированных с неблагоприятным прогнозом — РМЖ. Стратегии ХТ-лечения его в настоящее время основаны на применении цитостатических препаратов, в том числе паклитаксела, что зачастую приводит к приобретению резистентности опухолевыми клетками и в дальнейшем служит причиной рецидивирования и метастазирования.

Цель исследования — изучение потенциального молекулярного механизма опухолевой прогрессии таксол-резистентных клеток РМЖ.

Материалы и методы. Создана и охарактеризована таксол-резистентная сублиния клеток карциномы молочной железы HCC1806 (ATCC CRL-2335). Резистентность клеток данной сублинии (HCC1806-TaxR) достигнута путем их культивирования в присутствии 1 мкМ паклитаксела. Для данного исследования использованы различные методики анализа *in vitro* (определение скорости пролиферации, миграции, колониеобразования, иммуофлюоресценция, ПЦР, вестерн-блоттинг и пр.) и *in vivo* (на иммунодефицитных бестимусных мышках линии BALB/c).

Результаты. Клетки HCC1806-TaxR проявляли сниженную скорость деления, но обладали более мезенхимальным локомоторным фенотипом и более высоким инвазивным потенциалом. Согласно литературным данным, длительное культивирование клеток в присутствии паклитаксела приводит к реорганизации структуры микротрубочек, что может быть связано

со сдвигом баланса немышечных цитоплазматических изоформ актина (β -, γ -), который, как мы ранее выявили, ассоциирован с повышением туморогенного потенциала при превалировании γ -актина, что и было детектировано в клетках HCC1806-TaxR. Скорость роста ксенографтов, сформированных HCC1806-TaxR, *in vivo* согласовывалась с таковой *in vitro*, однако минимальная прививочная доза оказалась значительно ниже, кроме того, у них детектировалась повышенная способность к метастазированию. Экзогенная экспрессия γ -актина/нокаун β -актина приводили к увеличению клеточной подвижности и минимальной прививочной дозы в исходных клетках.

Закключение. Выявлен один из потенциальных механизмов прогрессии опухолевых клеток, имеющих лекарственную устойчивость, осуществляемый за счет сдвига баланса изоформ актина в сторону превалирования γ -актина. Результаты исследования данных механизмов могут быть использованы при разработке новых таргетных противоопухолевых препаратов и терапевтических стратегий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 20-15-00321).

Механизмы участия ACTN4 в эпителиально-мезенхимальном переходе в раковых клетках

К.С. Новицкая¹, Г.В. Васильева^{1,2}, Д.В. Кригер¹,
Е.В. Ломерт¹, Д.Г. Тентлер¹

¹ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Введение. Проект направлен на изучение роли альфа-актина 4 (ACTN4) в подвижности раковых клеток. Экспрессия ACTN4 повышена в инвазивных участках некоторых солидных опухолей, тогда как подавление ACTN4 замедляет инвазию и миграцию клеток различных раковых линий. Возможной причиной усиления миграции клеток служит запуск программы ЭМП.

Цель исследования — изучение влияния ACTN4 на подвижность и процессы ЭМП в клетках НМРЛ, имеющих эпителиальное происхождение, но различающихся по эпителиально-мезенхимному статусу.

Материалы и методы. Основной подход — получение линий с CRISPR/Cas9 нокаутом (КО) и с оверэкспрессией (ОЕ) ACTN4. В качестве объекта выбраны линии клеток с эпителиальным (H460) и более мезенхимным (H1299) фенотипом. Оценка подвижности клеток в результате нокаута и сверхэкспрессии ACTN4 велась с помощью тестов «на застание раны», а также с помощью системы анализа клеток в реальном времени xCELLigence. Анализ экспрессии маркеров и транскрипционных факторов ЭМП на полученных линиях проведен методом qPCR.

Результаты. Наши предварительные данные указывают, что нокаут ACTN4 в клетках H1299 приводит к замедлению темпов миграции, сопровождающемуся снижением уровня экспрессии транскрипционного фактора ЭМП TWIST1. В тоже время анализ темпов миграции и уровня экспрессии известных маркеров ЭМП клеточной линии H460 со сверхэкспрессией ACTN4 не выявил отличий от контрольных клеток.

Закключение. Изменение экспрессии ACTN4 может ингибировать скорость миграции клеток НМРЛ, возможно, через регуляцию баланса транскрипционных факторов ЭМП. Однако, сверхэкспрессии ACTN4 недостаточно для индукции ЭМП. Планируется исследовать эффект изменения экспрессии ACTN4 на действие различных индукторов ЭМП, например, TNF-alpha и ZEB1.

Механизм воздействия транскрипционного фактора эпителиально-мезенхимального перехода Zeb1 на активность главного онкосупрессора p53

С.Е. Парфеньев, А.А. Дакс, О.А. Федорова,
Е.М. Тульчинский, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Основным механизмом, посредством которого раковые клетки приобретают способность образовывать метастазы, — ЭМП. Инициация данного процесса находится под управлением ключевых регуляторов ЭМП, среди которых можно выделить транскрипционный фактор Zeb1, задействованный в метастазировании различных типов рака. На сегодняшний день показано, что онкосупрессорный белок p53 способен подавлять транскрипционную активность Zeb1 за счет регуляции экспрессии ряда микроРНК и таким образом подавлять метастатический процесс.

Цель исследования — изучить способность транскрипционного фактора Zeb1 регулировать активность p53.

Материалы и методы. В качестве модели использовалась генетически-модифицированная линия РМЖ человека MCF7 с доксициклин-зависимой индукцией экспрессии Zeb1 — MCF7-Zeb1-tet-ON.

Результаты. С помощью данной клеточной модели показано, что индуцированная доксициклином экспрессия Zeb1 запускает ЭМП в эпителиальных клетках MCF7. Так, продемонстрировано Zeb1-зависимое усиление миграции, снижение скорости пролиферации клеток, приобретение мезенхимальной морфологии. Данные фенотипические изменения сопровождались изменениями в экспрессии генов: снижением уровня экспрессии эпителиальных маркеров: Е-кадгерина (CDH1) и эстрогенового рецептора- α (ER α), а также

повышением уровня мезенхимальных маркеров, таких как N-кадгерин, виментин и металлопротеаза-2. На основании этих данных очевидно, что данная клеточная модельная система адекватно отражает процессы, происходящие в клетках при Zeb1-индуцированном ЭМП. Далее, с использованием ПЦР в реальном времени и вестерн-блот анализа показано, что Zeb1 подавляет p53 на уровне транскрипции, но не на уровне трансляции. С помощью анализа данных, полученных методом хроматиновой иммунопреципитации с последующим секвенированием (ChIP-seq) мы показали, что Zeb1 связывается с регуляторной областью гена TP53, кодирующего белок p53, причем наиболее вероятное место посадки Zeb1 — участок, содержащий E-box сайт, располагающийся на расстоянии в 1485 п. н. от точки начала транскрипции гена TP53. Показано, что транскрипционный фактор Zeb1 — регулятор экспрессии p53 и подавляет его транскрипцию, связываясь с промоторной областью гена TP53.

Заключение. Обнаружен важный молекулярный механизм, за счет которого фактор Zeb1 регулирует процесс опухолевой трансформации клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-45-0211).

Роль снижения продукции тестостерона у мужчин старше 35 лет в развитии рака предстательной железы

А.В. Печерский

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Нарушение обновления (регенерации) гонад у людей старше 35 лет приводит к нарастающему с интенсивностью 1 % в год снижению количества клеток Лейдига и суммарной продукции ими тестостерона. Снижение продукции тестостерона у мужчин после 35 лет приводит к нарушению трансформации андроген-независимых эпителиальных клеток предстательной железы в андроген-зависимые клетки и к нарушению дифференцировки последних (нуждающихся в тестостероне, образующемся в физиологическом импульсном режиме). В ответ на снижение продукции тестостерона развиваются компенсаторно-приспособительные реакции, направленные на повышение митогенной стимуляции: повышаются уровни дигидротестостерона и эстрадиола, клеточных ростовых факторов (основного фактора роста фибробластов — bFGF и др.), инсулина, соматотропного гормона и других факторов. При проведении андрогенной блокады (при РПЖ) данные компенсаторные реакции проявляются в большей степени. Низкодифференцированные андроген-независимые

базальные клетки-предшественники эпителия предстательной железы (нормальные и опухолевые) лишаются возможности трансформироваться в дифференцированные андроген-зависимые главные клетки. Как следствие при андрогенной блокаде, несмотря на гибель клеток первичной высокодифференцированной андроген-зависимой злокачественной опухоли предстательной железы, образуется новая низкодифференцированная андроген-независимая злокачественная опухоль, состоящая из низкодифференцированных раковых клеток первичной опухоли (составляли до этого меньшинство) и из низкодифференцированных базальных клеток (были до этого нормальными). При проведении адекватной тестостерон-заместительной терапии с индивидуальным подбором дозы препарата тестостерона, соответствующей снижению тестостерона с возрастом, наблюдается снижение факторов, стимулирующих пролиферацию (в том числе эпителия предстательной железы). При этом уровни лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов нормализуются, обеспечивая образование тестостерона собственными клетками Лейдига в физиологическом импульсном режиме и сохранение сперматогенеза.

Заключение. Снижение продукции тестостерона у мужчин с возрастом существенно повышает риск развития РПЖ. Назначение тестостерон-заместительной терапии в дозе, соответствующей возрастному снижению тестостерона, может существенно снизить риск развития РПЖ. Назначение данной терапии между курсами андрогенной блокады и при активном наблюдении может улучшить результаты лечения и прогноз больных РПЖ, уменьшить риск развития гормон-резистентной формы РПЖ.

Изучение механизмов формирования толерантности макрофагов в условиях микроокружения опухоли

П.А. Подлесная, О.В. Ковалева, А.Н. Грачев

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

Введение. В большинстве солидных опухолей макрофаги, ассоциированные с опухолью, как известно, не способны проявлять свою цитотоксическую и противоопухолевую активность. Однако продолжают предприниматься попытки изменить фенотип макрофагов с M2, характерного для ассоциированных с опухолью макрофагов, на M1, обладающий противоопухолевой активностью. Данные попытки в большинстве своем остаются неудачными, что указывает на возможное присутствие в опухоли макрофагов, потерявших способность отвечать на провоспалительные стимулы. Известно, что «слабая» стимуляция макрофагов патогенами приводит к развитию толерантности,

т.е. неспособности макрофагов реагировать на провоспалительный стимул. Присутствие в опухолях бактерий одновременно с отсутствием цитотоксической активности макрофагов позволяет предположить, что незначительные количества резидентных бактерий в опухолевой строме приводят к формированию толерантности макрофагов, ассоциированных с опухолью.

Цель исследования — изучение механизмов формирования толерантности макрофагов в условиях опухолевого микроокружения.

Материалы и методы. Цитотоксические макрофаги получали путем дифференцировки клеточной линии THP-1 при помощи стимуляции PMA и IFN γ в среде, кондиционированной опухолевыми клетками линии H1975. Индукцию толерантности проводили путем стимуляции THP-1 LPS в концентрациях 10 и 100 нг/мл. Степень провоспалительной активности клеток оценивали методом ИФА после повторной стимуляции макрофагов LPS в концентрации 100 нг/мл. Статистический анализ полученных данных сделан при помощи t-критерия.

Результаты. Результаты исследования показали, что для индукции толерантности необходима стимуляция макрофагов IFN γ . Максимальные уровни толерантности достигались при первичной стимуляции макрофагов LPS в концентрации 100 нг/мл. Приобретенная толерантность выражалась в активации продукции IL-10 и в потере или снижении способности макрофагов продуцировать такие провоспалительные цитокины, как TNF- α , IL-1 β , MCP-1, IL-6, IL-8. Установлено, что в микроокружении опухоли в результате взаимодействия иммунологической и микробной составляющих стромы развивается толерантность макрофагов.

Закключение. В условиях опухолевого микроокружения нельзя игнорировать влияние факторов, производимых стромой (как клетками воспалительного инфильтрата, так и бактериями), на развитие фенотипа и функции макрофагов. Дальнейшее изучение взаимодействия микробиома опухолевого микроокружения с его иммунологической составляющей может дать основу новому направлению в разработке более эффективных иммунотерапевтических подходов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-015-00479).

Экспрессия галектина-1 при раке толстого кишечника с разной степенью распространения опухоли

В.С. Полетика¹, Г.В. Рейнгардт^{1,2}, А.В. Курносенко^{1,2},
О.А. Васильева¹, Ю.В. Колобовникова¹, О.И. Уразова¹

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск;

²ГАОУЗ «Томский областной онкологический диспансер»

Цель исследования — выявить особенности экспрессии галектина-1 в опухолевой ткани в связи

со степенью распространения опухоли у больных раком толстого кишечника.

Материалы и методы. В исследование вошли 55 пациентов с диагнозом рака толстого кишечника. Группу сравнения составили 49 пациентов с аденомой толстого кишечника. Материалом исследования служили образцы опухолевой ткани толстого кишечника, полученные при операционном вмешательстве. Оценку экспрессии галектина-1 в опухолевой ткани проводили на парафиновых срезах методом иммуногистохимии с применением антител фирмы GeneTex к галектину-1 (поликлональные, рабочее разведение 1: 500, кроличьи). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 12.0. Результаты статистического анализа считали значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты. У больных раком толстого кишечника относительное содержание опухолевых клеток, экспрессирующих галектин-1, составило 23 (11–41) %, что в среднем в 2,1 раза ($p = 0,001$) превышало соответствующий параметр у пациентов с аденомами толстого кишечника (относительное количество галектин-1-позитивных опухолевых клеток 11 (8–19) %). У больных раком толстого кишечника с высокой степенью инвазии ЗНО (T3 – T4) уровень внутриопухолевой экспрессии галектина-1 достоверно превышал таковой у пациентов с менее инвазивными опухолями (T1, T2) — относительное содержание галектин-1-позитивных опухолевых клеток равнялось 27,0 (15,0 – 5,0) и 13,0 (9,0–19,0) % соответственно ($p = 0,032$).

Закключение. У больных раком толстого кишечника установлена повышенная экспрессия галектина-1 в опухолевой ткани в ассоциации с выраженным инфильтрирующим ростом первичного опухолевого узла. Полученные результаты свидетельствуют о негативной роли галектина-1 в патогенезе опухолевой прогрессии рака толстого кишечника.

Современные 3D-2-клеточные модели рака молочной железы на основе комбинации опухолевых и стромальных клеток

М.М. Савинкова^{1,2}, М.С. Ермаков¹, В.А. Рихтер¹,
О.А. Коваль^{1,2}, А.А. Нуштаева¹

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

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Введение. 2D-культуры клеток не отражают наличие градиента кислорода и питательных веществ и клеточный метаболизм, присутствующий в естественной среде. Следовательно, важно разработать клеточную модель *in vitro*, моделирующую тканевое микроокружение,

для получения надежных и биологически значимых результатов.

Цели исследования: получение 3D-2-клеточных моделей РМЖ на основе комбинации опухолевых и стромальных клеток; анализ их ответа на стимуляцию гормонами и цитокинами.

Материалы и методы. В качестве опухолевых клеток РМЖ использовали иммортализованные линии: MCF-7, MDA-MB-231 и SK-BR-3. В качестве стромальных клеток — персональные культуры фибробластов BrC4f и BrC120f, полученные из опухолевых образцов пациентов с РМЖ, и фибробласты здоровой ткани BN120f.

Результаты. Пролиферацию клеток MDA-MB-231 в 3D-модели стимулировал 17 β -эстрадиол (E2), что может быть связано с экспрессией в клетках сплайс-варианта ER α 36, обеспечивающего быстрое связывание гормона с рецептором. Для сфероидов культуры MCF-7 оказалось характерно увеличение их плотности, что сопровождалось самоорганизацией в микроткань. Пролиферация клеток гормон-независимых культур SK-BR-3 и MDA-MB-231 в 3D-2-сфероидах стимулировалась TGF β , что, возможно, связано с реализацией в них TGF β /HER2/EGFR сигналинга. Сокультивирование клеток MCF-7 и MDA-MB-231 с BrC4f в 3D-2-модели стимулировало миграцию, а добавление E2 или TGF β , наоборот, снижало миграцию. При этом E2 повышал миграционный потенциал клеток для 3D-2 из SK-BR-3 при сокультивировании с BrC4f. Опухолевые фибробласты могут влиять на миграцию клеток за счет прямого контакта через сигнальный путь hedgehog, что объясняет полученные результаты. Инвазивный потенциал клеток MDA-MB-231 при сокультивировании со стромальными клетками повышался за счет E2, а TGF β снижал выход большего числа клеток из 3D-2-культур.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о репрезентативности 3D-2-модели опухоли *in vitro* для исследования функциональных свойств клеток при воздействии экзогенных стимулов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-74-10039).

Особенности развития лекарственной устойчивости к противоопухолевым препаратам различных классов

А.В. Сагайдак, Т.А. Григорьева

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)»

Введение. Терапия пролиферативных заболеваний сопряжена с развитием резистентности опухолевых клеток к препаратам различных классов. Одна из причин развития МЛУ — гиперактивность трансмембранных белков-транспортёров семейства ABC, которые

обеспечивают выброс лекарственных препаратов из опухолевых клеток, — Pgp (Р-гликопротеин) и BCRP.

Цель исследования — сравнительное изучение механизмов резистентности клеток НСТ116 к таксолу (цитостатик) и нутлину-3а — таргетному препарату, ингибитору MDM2, чье влияние на развитие ABC-опосредованной резистентности до сих пор не изучено.

Получено 8 поколений НСТ116, устойчивых к таксолу в концентрациях от 0,01 мкМ (G150) до 1,92 мкМ (200*G150). В случае нутлина-3а тотальная гибель клеток происходила уже при 45 мкМ нутлина-3а (10*G150). Транспортную активность штаммов оценивали по накоплению в клетках флуоресцентных субстратов — родами-на 123 и хекста 33342 — с помощью ридера CLARIOstar и системы Operetta CLS. Экспрессию генов определяли методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Соизмеримая транспортная активность обнаружена в клетках, устойчивых к 0,06 мкМ таксола и 30 мкМ нутлина-3а, экспрессия генов Pgp (MDR1) и BCRP (ABCG2) в первом случае в 20 раз выше. Штаммы, резистентные к более высоким концентрациям таксола, показали дальнейший рост активности транспортёров и экспрессии их генов. При этом для нутлина-3а 30 мкМ — максимальная концентрация, при которой клетки устойчиво жизнеспособны. Показано, что в них подавлена экспрессия генов-мишеней белка p53 — *CDKN1A*, *Puma*, *Bax*.

Заключение. Таким образом, устойчивость клеток к нутлину-3а связана с нарушением p53-опосредованной программы клеточной гибели, и в меньшей степени с ABC-опосредованным механизмом, характерным для резистентности к таксолу. Таргетный агент менее опасен для развития МЛУ, поскольку опухолевые клетки сохраняют чувствительность к другим препаратам, в то время как в случае таксола активируется неселективный эффлюкс, обеспечивающий такую устойчивость.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-33-70250).

Взаимовлияние транскрипционных факторов Zeb1 и p53 на экспрессию цитокинов CCL2 и CSF-1 в клеточной модели рака молочной железы человека

О.М. Семёнов, А.А. Дакс, С.Е. Парфеньев, Н.А. Барлев
ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Транскрипционный фактор Zeb1 служит одним из ключевых индукторов ЭМП, отвечающего за метастазирование раковых клеток и их устойчивость к генотоксическим препаратам. Белок p53 — главный онкосупрессор человека, который отвечает за стабильность генома и поддержание эпителиального фенотипа, регулируя большое количество сигнальных путей.

Важную роль в развитии опухоли играет ее микроокружение. Например, опухоль-ассоциированные макрофаги способствуют выживанию, инвазии и миграции раковых клеток, которые, в свою очередь, сами выделяют сигнальные молекулы, поддерживающие популяцию макрофагов. Ключевой цитокин, привлекающий моноциты в опухоль, — хемокин CCL2. Эти клетки служат основным источником опухолевых макрофагов, для которых один из главных факторов выживания — CSF-1.

Цель исследования — изучение влияния p53 на профиль экспрессии вышеперечисленных цитокинов при активации программы ЭМП.

Использовалась генетически модифицированная линия MCF7 клеток РМЖ с индуцируемой доксициклином экспрессией Zeb1. В этих клетках методом лентивиральной трансдукции получен стабильный нокдаун гена онкосупрессора p53. С помощью иммуноблоттинга показано, что при активации экспрессии фактора Zeb1 количество эпителиального маркера Е-кадгерина снижается, а количество мезенхимного маркера виментина повышается. Данные подтверждают адекватность этой модели ЭМП. Методом ОТ-ПЦР показано, что активация Zeb1 повышает экспрессию цитокинов CCL2 и CSF-1, в то время как присутствие p53 дикого типа, наоборот, негативно регулирует экспрессию каждого из них.

Закключение. Исходя из представленных данных, можно предположить, что присутствие p53 дикого типа в раковых эпителиальных клетках, претерпевающих ЭМП, тормозит привлечение опухоль-ассоциированных макрофагов к опухоли. В свою очередь, в раковых клетках может усиливаться негативная селекция по подавлению экспрессии p53, например, за счет Zeb1.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-75-10059).

Подавление урокиназного рецептора ассоциировано с эпителиально-мезенхимальным переходом и метастазированием нейробластомы

Е.В. Семина^{1,2}, А.А. Шмакова^{1,2}, П.С. Климович^{1,2},
К.А. Рубина¹, К.Д. Рысенкова^{1,2}

¹ГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²Институт экспериментальной кардиологии, ФГБУ «НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва

Введение. Нейробластома — одна из наиболее агрессивных и распространенных детских опухолей с высоким риском метастазирования. Молекулярные основы прогрессирования и метастатического распространения нейробластомы во многом остаются неясными. Урокиназная система (урокиназа uPA и ее рецептор uPAR) играет важную роль в процессах опухолевого роста и метастазирования, а подавление

uPA и uPAR предлагается в качестве потенциальной терапевтической мишени.

Цель исследования — изучить роль подавления uPAR в миграции и метастазировании нейробластомы.

Материалы и методы. В работе использованы клетки мышинной нейробластомы Neuro2a. Экспрессия uPAR подавлялась с помощью систем CRISPR/Cas9n или shPHK (ΔuPAR). Для оценки миграции использован анализ заживления «царапины» *in vitro*. Мышам C57BL/6N вводили 106 клеток Neuro2a WT или Neuro2a-shuPAR, экспрессирующих GFP в качестве репортера, и через 3 недели анализировали размер опухоли и ее метастазирование (количество GFP⁺ клеток на поле зрения изображения легочной ткани).

Результаты. Обнаружено, что подавление uPAR парадоксально приводит к существенному увеличению миграции клеток Neuro2a *in vitro* ($p < 0,001$, ANOVA). Кроме того, отмечены характерные изменения морфологии ΔuPAR клеток: увеличение размера клеток ($p < 0,0001$, ANOVA) и снижение способности формировать колонии ($p < 0,05$, ANOVA). Выдвинуто предположение, что в клетках ΔuPAR запускается ЭМП, один из основных механизмов регуляции метастазирования опухолевых клеток. Действительно, в клетках ΔuPAR наблюдалось снижение экспрессии эпителиальных маркеров (Е-кадгерина, окклюдина и клаудина-5) и увеличение экспрессии мезенхимальных маркеров (N-кадгерина и α-гладкомышечного актина). В клетках ΔuPAR возростала экспрессия транскрипционного фактора ЭМП Snail ($p < 0,01$, ANOVA). При оценке роста и метастазирования нейробластомы *in vivo* обнаружено, что подавление uPAR существенно снижает рост первичной опухоли ($p < 0,0001$, t-тест), однако усиливает способность клеток Neuro2a метастазировать в ткань легких. Выявлено существенное увеличение количества GFP⁺ клеток в поле зрения легочной ткани у мышей, которым вводили Neuro2a-shuPAR по сравнению с Neuro2a WT ($p < 0,01$, t-тест).

Закключение. Полученные данные указывают на новый механизм регуляции ЭМП и метастазирования опухолевых клеток, ассоциированный со снижением экспрессии uPAR в клетках нейробластомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-015-00186).

Подавление урокиназного рецептора приводит к химиорезистентности нейробластомы

Е.В. Семина^{1,2}, А.А. Шмакова^{1,2}, П.С. Климович^{1,2},
К.Д. Рысенкова^{1,2}, К.А. Рубина¹

¹ГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²Институт экспериментальной кардиологии,
ФГБУ «НМИЦ Кардиологии Минздрава России, Москва

Введение. Урокиназный рецептор (uPAR) — рецептор, связывающий внеклеточную протеазу урокиназу (uPA). Взаимодействие uPA/uPAR стимулирует инвазию и миграцию, индуцирует ангиогенез и активирует пролиферацию опухолевых клеток. uPAR участвует в активации внутриклеточной сигнализации за счет латеральных взаимодействий с другими рецепторами и сборки «сигнасомы». Ранее мы показали, что подавление uPAR снижает пролиферацию клеток нейробластомы, но увеличивает миграцию по механизму запуска ЭМП. Известно, что ЭМП ассоциирован с химиорезистентностью опухолевых клеток.

Цель исследования — оценить влияние подавления uPAR на химиочувствительность клеток нейробластомы.

Материалы и методы. Использовались клетки мышиной нейробластомы Neuro2a. Экспрессия uPAR подавлялась с помощью CRISPR/Cas9n или shPNC (ΔuPAR). Для оценки химиочувствительности клетки Neuro2a обрабатывались цисплатином (30 мкМ) в течение 24 ч, затем оценивалась активация апоптоза. Для понимания роли uPAR в первичных и рецидивирующих нейробластомах человека также проанализирован ряд опубликованных данных транскриптомов.

Результаты. При действии цисплатина в клетках ΔuPAR уровень активации каспазы-3 и апоптоза оказался значимо ниже, чем в клетках дикого типа (WT). Химиорезистентность клеток ΔuPAR оказалась ассоциирована со снижением активации ключевого онкосупрессора p53, оцениваемой по фосфорилированию Ser15 после действия цисплатина по сравнению с WT. Один из возможных механизмов — запуск сигнализации через p38 при подавлении uPAR (увеличение фосфорилирования p38 в клетках ΔuPAR по сравнению с WT), что характерно для дормантных клеток, нечувствительных к ХТ. Чтобы подтвердить полученные данные, сделан анализ экспрессии uPAR в нейробластомах человека. Оказалось, что высокая экспрессия uPAR в первичной опухоли предсказывает плохую выживаемость при нейробластоме, однако рецидивирующие нейробластомы имеют значительно сниженную экспрессию uPAR.

Заключение. Выявлено, что падение экспрессии uPAR в клетках нейробластомы приводит к снижению чувствительности к противоопухолевой терапии. Эти данные впервые указывают на двоякую функцию uPAR

в нейробластоме: с одной стороны, высокая экспрессия uPAR провоцирует пролиферацию клеток опухоли, с другой стороны, подавление uPAR может привести к возникновению химиорезистентных клеток опухоли, способствующих ее дормантности и рецидиву.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-015-00186).

Особенности морфологии и клиническая значимость разных типов опухолевых микрососудов при плоскоклеточных раке шейки матки и раке легкого

М.А. Сеньчукова^{1,2}, Е.В. Макарова^{1,2}, Е.А. Калинин^{1,2},
Н.Н. Волченко³

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России;

²ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер»;

³Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России

Цель исследования — установить особенности морфологии опухолевых микрососудов при плоскоклеточных РШМ и РЛ и оценить их клиническую значимость.

Материалы и методы. Исследовано 65 архивных парафиновых блоков пациентов с ПРШМ (I–IIA стадии) и 62 парафиновых блока пациентов с ПРЛ (I–IIIA стадии). Срезы окрашены гематоксилином Майера и эозином, проведен ИГХ-анализ с использованием антител к CD34, подопланину, HIF-1α и Snail. Статистическая обработка полученных результатов выполнена с использованием программы Statistica 10.

Результаты. При плоскоклеточных видах РШМ и РЛ выявлено 8 типов опухолевых микрососудов: обычные микрососуды, дилатированные капилляры (ДК), ДК со слабовыраженной экспрессией CD34, ДК контактного типа, атипичные ДК, структуры с частичной эндотелиальной выстилкой, капилляры в солидном компоненте опухоли, лимфатические сосуды в лимфоидных и полиморфно-клеточных инфильтратах стромы опухоли. Установлено, что с риском рецидива плоскоклеточного РШМ коррелировали следующие факторы: ДК со слабовыраженной экспрессией CD34 ($p = 0,0005$), ДК контактного типа ($p = 0,000005$), наличие рыхлой неоформленной соединительной ткани в строме опухоли ($p = 0,008$) и феномен фрагментации в солидном компоненте опухоли ($p = 0,004$), при котором опухолевые клетки приобретали фибробластоподобную форму и были с ядерной экспрессией Snail и HIF-1α. При наличии в опухоли 2 и менее перечисленных факторов 5-летняя безрецидивная и общая выживаемость пациенток с плоскоклеточным

РШМ оказались идентичными и составили 90,3 %, а при наличии 3-х или 4-х факторов — 33,3 % ($p < 0,00001$). При плоскоклеточном РЛ наиболее значимыми факторами неблагоприятного прогноза служат: ДК со слабо-выраженной экспрессией CD34 ($p = 0,0005$), капилляры в солидном компоненте опухоли ($p = 0,0002$), наличие рыхлой неоформленной соединительной ткани ($p = 0,002$), фрагментации солидного компонента опухоли ($p = 0,02$). При наличии в опухоли 2 и менее названных неблагоприятных факторов 5-летняя безрецидивная и общая выживаемость составили 82,8 %, а при наличии 3-х или 4-х факторов — безрецидивная выживаемость составила 39,4 % ($p = 0,002$), а общая выживаемость — 42,4 % ($p = 0,003$). Сделано предположение, что рост опухоли по альвеолам мог нивелировать значимость сосудов контактного типа при плоскоклеточном РЛ, тогда как включение в исследование образцов опухолей пациентов преимущественно с I стадией могло нивелировать значимость капилляров в солидном компоненте опухоли при плоскоклеточном РШМ.

Заключение. Полученные результаты подтверждают неоднородность опухолевых микрососудов по морфологии и клинической значимости при плоскоклеточных РШМ и РЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-415-560005) и субъекта РФ (19-415-560004).

Определение показателей внутриклеточных протеолитических систем в тканях люминального рака молочной железы на этапах лимфогенного метастазирования для выявления возможных путей ухода опухолей от иммунного надзора

Е.Е. Серeda¹, Е.С. Колегова¹, Г.В. Какурина¹,
Д.А. Коршунов¹, Е.А. Сиденко^{1,2}, Н.А. Тарабановская¹,
А.В. Дорошенко¹, И.В. Кондакова¹

¹ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Цель исследования — изучение содержания иммунных субъединиц LMP-2 и LMP-7 и протеолитической активности протеасом в тканях при люминальном РМЖ на этапах лимфогенного метастазирования для выявления возможных путей ухода опухолей от иммунного надзора.

Материалы и методы. Всего в исследование включено 109 больных люминальным А, люминальным В (HER-) РМЖ со стадией T1-3N0-1M0, комбинированное лечение которых начато с оперативного этапа

лечения. Материал — опухолевая и неизменная ткань молочной железы, в которой определяли химотрипсиноподобную и каспазаподобную активность протеасом, а также содержание иммунных субъединиц протеасом LMP-2 и LMP-7.

Результаты. При люминальных видах рака в опухолевой ткани обнаружено статистически значимое увеличение, по сравнению с неизменной тканью, химотрипсиноподобной активности протеасом в 2,3 раза ($p = 0,001$), каспазаподобной активности протеасом — в 2,4 раза ($p = 0,009$). По сравнению с неизменной тканью содержание субъединицы LMP-2 в ткани люминального А рака оказалось снижено на 31 % ($p = 0,04$), а при люминальном В раке выявлено увеличение содержания субъединицы LMP-7 в 1,25 раз ($p = 0,049$). При сопоставлении показателей протеасомной системы в опухолевой ткани в зависимости от вовлеченности в процесс метастазирования регионарных лимфатических узлов выявлены статистически значимые изменения в содержании иммунных субъединиц и каспазаподобная активность протеасом. При люминальном А раке в отсутствии лимфогенных метастазов (N0) зарегистрировано увеличение каспазаподобной активности протеасом в 3 раза ($p = 0,004$) по сравнению с опухолями N1. Статистически значимых изменений в содержании иммунных субъединиц не выявлено. При люминальном В раке в отсутствии лимфогенных метастазов (N0) наблюдалось увеличение каспазаподобной активности протеасом в 3,8 раз, в то время как содержание субъединицы LMP-2 снижено в 2,3 раза по сравнению с опухолями, имеющими поражение регионарных лимфатических узлов (N1).

Заключение. Вероятно, при прогностически более благоприятной ситуации (люминальный А или В рак молочной железы без лимфогенных метастазов (N0), низкое содержание иммунных субъединиц может быть связано с механизмами, позволяющими опухолевым клеткам избежать контроль со стороны иммунной системы. При люминальном В раке с наличием лимфогенных метастазов (N1) повышенный уровень иммунных субъединиц LMP-2 в опухолях может быть связан с неиммунными функциями иммунных протеасом.

Влияние трансклутаминазы типа 2 на метилирование гистонов в условиях повреждения ДНК

Е.Ю. Смирнов¹, Ю.А. Гненная¹, О.А. Федорова¹,
М. Пьячентини^{1,2}, Н.А. Барлев¹

¹ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;

²Университет Тор Вергата, Рим, Италия

Введение. Резистентность к ХТ-препаратам обуславливается различными факторами, такими как экспрессия ABC транспортеров, цитохромов, эффектами опухолевого микроокружения, а также нарушением различных

сигнальных путей. Изменения в сигнальных путях, отвечающих за клеточный ответ на повреждение ДНК, могут служить одним из способов, обуславливающих развитие резистентности к генотоксическим препаратам у опухолевых клеток. Трансглутаминаза типа 2 (TG2) — это Ca^{2+} -зависимый фермент, который катализирует посттрансляционные модификации белков, имеющие множество ферментативных активностей (трансамидазная, протеин дисульфид изомеразная и др.). Повышенный уровень экспрессии обнаружен в раковых клетках резистентных к химиопрепаратам. TG2 участвует и в ответе на повреждения ДНК, как показано, и при обработке химиопрепаратом (этопозид), и при обработке ионизирующим излучением.

Цель исследования — оценить влияние TG2 на метилирование гистонов, ассоциированных с клеточным ответом на повреждение ДНК.

Материалы и методы. Линии мышинных эмбриональных фибробластов MEF с разным статусом TG2 (нокаут) оценены на предмет чувствительности к препарату доксорубину с использованием метода МТТ. Методом вестерн-блоттинга определены уровни метилированных гистонов H3 и H4 при обработке доксорубином. В клеточных линиях гепатокарциномы человека HepG2 и Huh7 при помощи системы CRISPR/Cas9 получен нокаут TG2. Оценены уровни метилированных гистонов H3 и H4 в хроматиновой фракции при обработке доксорубином с использованием вестерн-блоттинга.

Результаты. В линии мышинных эмбриональных фибробластов MEF с нокаутом TG2 обнаружено снижение триметилированного гистона H3 по лизину в положении 9 или 36 (H3K9me3 или H3K36me3) по сравнению с линией дикого типа. При этом в нокаутной линии повышен уровень H3K4me3, а также H4K20me1 и H4K20me2. Показана повышенная чувствительность к доксорубину у линии MEF с нокаутом TG2 методом МТТ. В линии гепатокарциномы человека HepG2 обнаружено повышение уровня монометилированного гистона H4 по лизину в положении 20 при обработке доксорубином.

Заключение. TG2-зависимые изменения в метилировании гистонов свидетельствует о влиянии TG2 на клеточный ответ на повреждение ДНК и подтверждают данные о повышенной чувствительности линий с нокаутом TG2 к генотоксическому препарату доксорубину.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-75-10076).

Взаимосвязь между концентрацией цитокинов при влиянии на них фактора дифференцировки HLDF и маркерами эпителиально-мезенхимального перехода у пациентов с заболеваниями молочной железы

А.А. Студеникина, А.В. Бернадо

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Введение. Клеточная атипия с последующей малигнизацией при незлокачественных заболеваниях (НЗ) молочной железы сопровождается нарушением дифференцировки и индукцией ЭМП. Известно, что фактор дифференцировки HLDF изменяет связывание цитокинов с мембраной и оказывает влияние и на цитокин-продуцирующую функцию клеток биоптатов.

Цель исследования — изучение взаимосвязи между продукцией цитокинов при влиянии HLDF и экспрессией маркеров ЭМП при инвазивной карциноме неспецифического типа (ИКНТ) и при НЗ молочной железы.

Материалы и методы. Использовались супернатанты биоптатов 54 пациентов с ИКНТ молочной железы: 22 пациента с лимфогенным метастазированием (ЛМ+) и 32 пациента без него (ЛМ–), а также 17 пациентов с НЗ молочной железы. Для определения спонтанной продукции часть биоптата инкубировали в среде DMEMF-12, для определения влияния HLDF — другую часть биоптата в том же объеме среды с добавлением 20 мкг/мл HLDF. Используя ИФА, в супернатантах определяли концентрации IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, TNF- α , IFN- γ , VEGF. Далее оценивали индекс влияния HLDF (ИБHLDF = А/Б, где А — концентрация при влиянии HLDF; Б — концентрация при спонтанной продукции). На парафиновых срезах опухолей проводили ИГХ-исследование экспрессии β -1-интегрина (CD29) и кадгерина-Е (CDH1). Оценивали отношение количества клеток, экспрессирующих маркер, к не экспрессирующим. Статистическую обработку выполняли при помощи Statistica V 6.0.

Результаты. У пациентов с ЛМ+ выявлен статистически значимо более низкий ИБHLDF на продукцию IFN- γ ($p = 0,040$) чем у пациентов с НЗ молочной железы, а ИБHLDF на продукцию IL-4 ($p = 0,024$) оказался ниже по сравнению с ЛМ–. У пациентов с НЗ молочной железы обнаружена сильная обратная корреляционная связь между экспрессией CDH1 и ИБHLDF VEGF ($R = -0,743$, $p = 0,001$), у пациентов с ЛМ– выявлена умеренная обратная между экспрессией CDH1 и ИБHLDF TNF- α ($R = -0,429$, $p = 0,014$), а у пациентов с ЛМ+ умеренные связи между

экспрессией CDH1 и IBHLDL IL-10 ($R = -0,529$, $p = 0,011$), а также между экспрессией CD29 и IBHLDL IL-4 ($R = -0,464$, $p = 0,030$). У НЗ молочной железы и ЛМ+ HLDF подавляет продукцию VEGF и TNF- α , что способствует клеточной стабильности и сопряжено с увеличением CDH1 в клетках, а у пациентов с ЛМ+ наблюдается увеличение CD29 на фоне снижения продукции IL-4.

Заключение. Выявлено, что фактор дифференцировки HLDF обладает избирательным действием на клетки опухоли и ее микроокружения.

Циркулирующие в крови больных раком молочной железы экзосомы в опухолевой диссеминации

О.С. Тутанов¹, М.Ю. Коношенко¹, К.В. Проскура²,
Е.А. Орлова³, Г.Д. Сагарадзе⁴, Т.А. Штам⁵, Н.В. Юнусова⁶,
А.Ю. Александрова³, С.Н. Тамкович^{1,7}

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

²ГБУЗ НО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер»;

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

⁴ГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

⁵ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

⁶НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»;

⁷ГБОУ ВО «Новосибирский государственный университет»

Введение. Экзосомы, секретируемые в биологические жидкости различными типами клеток, включая опухолевые клетки, служат важными участниками межклеточной коммуникации. На культурах клеток показано, что опухолевые экзосомы стимулируют ангиогенез, увеличивают клеточную подвижность и повышают их инвазивный потенциал. Известно, что часть циркулирующих в крови экзосом ассоциирована с поверхностью форменных элементов, однако их роль в опухолевой диссеминации остается неясной.

Цель исследования — выяснить роль циркулирующих в крови экзосом плазмы в опухолевом росте и диссеминации на примере больных раком молочной железы.

Материалы и методы. Экзосомы из плазмы и цельной крови больных раком молочной железы (РМЖ, $n = 46$) и здоровых женщин ($n = 23$) выделяли методом ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием. Природу полученных экзосом подтверждали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, крио-микроскопии, проточной цитофлуориметрии, трекового анализа. Ангиогенную активность экзосом оценивали с помощью методики образования капилляроподобных структур (КПС) в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVES) на Матригеле (BD BioSciences). Стимуляцию клеточной подвижности

и адгезию клеток MCF10A (псевдо-нормальные клетки) и SKBR-3 (карцинома МЖ) оценивали после добавления экзосом плазмы и суммарной крови здоровых женщин и больных РМЖ. Наблюдаемые эффекты регистрировались методом видеомикроскопии с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse-Ti (Nikon, Япония). Белки экзосом идентифицировали с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Результаты. Показано, что ангиогенный потенциал возрастает в ряду: суммарные экзосомы крови здоровых женщин < суммарные экзосомы крови больных РМЖ < экзосомы плазмы больных РМЖ. При этом добавление суммарных экзосом крови здоровых женщин к HUVES ингибирует ангиогенез в системе *in vitro*. Экзосомы плазмы и суммарные экзосомы крови больных РМЖ значительно стимулируют клеточную подвижность: добавление к MCF10A приводит к увеличению числа мигрирующих клеток, а к SKBR-3 — к увеличению числа мигрирующих клеток и их скорости.

С помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии с высокой достоверностью ($p < 0,05$) в экзосомах крови здоровых женщин и больных РМЖ идентифицированы 111 и 146 белков соответственно. В регуляцию клеточной подвижности вовлечены 23 и 14 % белков экзосом крови здоровых женщин и больных РМЖ соответственно, из них с негативной регуляцией данного процесса ассоциированы только 4 белка (AKT1, APOE, BARD1 и GDF2), которые уникальны для экзосом крови здоровых женщин. В регуляцию ангиогенеза вовлечено значительно меньше экзосомальных белков — 9 % у здоровых женщин и 3 % у больных РМЖ, а ингибирующие ангиогенез белки выявлены всего по 1 в каждом случае (GDF2 и BMP7 соответственно).

Заключение. Показано, что секретируемые в кровоток раковыми клетками экзосомы, ассоциированные с форменными элементами, наряду с экзосомами плазмы вовлечены в опухолевый рост и диссеминацию. Выявленные в составе экзосом белки, ассоциированные со стимуляцией клеточной подвижности и ангиогенеза, в дальнейшем могут быть использованы в разработке новых мишеней противоопухолевых препаратов.

Биологическая роль сплайс-изоформ E3-убиквитинлигазы MDM2-A, B и C в клеточных моделях рака легкого человека

Е.К. Тананыкина, О.А. Федорова, Н.А. Барлев,
О.Ю. Шувалов

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. В неопухолевых клетках количество основного онкосупрессора человека — белка p53 — необходимо тонко контролировать. Важнейший негативный регулятор p53 — E3-убиквитин лигаза MDM2.

Поэтому MDM2 часто сверхэкспрессирован в ЗНО различного генезиса. Помимо влияния на пролиферацию и миграцию, сверхэкспрессия MDM2 способствует резистентности опухолевых клеток к генотоксическим препаратам. Во многих злокачественных новообразованиях человека также наблюдается сверхэкспрессия сплайс-изоформ MDM2. Из-за своей структуры, отличной от полноразмерной формы, основные сплайс-изоформы MDM2-A, MDM2-B и MDM2-C не способны физически взаимодействовать и убиквитинилировать p53, следовательно, не могут выполнять p53-опосредованные функции. Несмотря на часто детектируемую экспрессию сплайс-изоформ MDM2 во многих типах опухолей, их функции мало изучены.

Цель исследования — выявить биологическую роль сплайс-изоформ MDM2 в клеточных моделях РЛ человека.

Материалы и методы. Сделан дизайн праймеров для ПЦР в режиме реального времени, позволяющих специфично детектировать каждую из изучаемых сплайс-изоформ MDM2. С использованием лентивирусной трансдукции получены модельные p53-негативные клеточные линии РЛ H1299 с сверхэкспрессией полноразмерного белка MDM2, мутантной формы, а также сплайс-изоформ MDM2. На полученных линиях оценивались следующие параметры: влияние полноразмерной и сплайс-изоформ MDM2 на пролиферацию клеток (технология xCelligence), митохондриальный потенциал, а также на способность к распознаванию 2-цепочечных разрывов ДНК.

Результаты. Разработанные нами праймеры специфично распознают сплайс-изоформы MDM2. Показано, что сверхэкспрессия полноразмерной формы MDM2 приводит к значительному увеличению интенсивности пролиферации у клеточной линии H1299, в то время как сверхэкспрессия сплайс-изоформ подавляет пролиферацию. Также, полноразмерная изоформа MDM2 и сплайс-изоформа MDM2-C значительно повышают митохондриальный потенциал опухолевых клеток H1299, тогда как сплайс-изоформа MDM2-B — понижает. В ответ же на радиационное повреждение ДНК основные изоформы MDM2 снижают узнавание 2-цепочечных ДНК-разрывов.

Заключение. Полученные данные указывают на противоположные роли основной и сплайс-изоформ MDM2-A, B и C в пролиферации клеток. При этом все изоформы могут ингибировать распознавание 2-цепочечных ДНК-разрывов, что потенциально может привести к геномной нестабильности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 21-75-10138).

ACTN4 и NF-κB совместно и по отдельности влияют на пролиферацию, миграцию и лекарственную устойчивость клеток немелкоклеточного рака легкого

Д.Г. Тентлер, К.С. Новицкая, Г.В. Васильева,
Е.В. Ломерт, Д.В. Кригер

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Транскрипционный фактор NF-κB и его коактиватор *ACTN4* традиционно рассматриваются как онкогенные факторы. Активация NF-κB приводит к подавлению апоптоза и повышению устойчивости клеток к противораковой терапии. Многочисленные исследования связывают постоянную активность NF-κB с клеточной подвижностью и активацией ЭМП. Аналогичным образом высокая экспрессия *ACTN4* часто (хотя и не всегда) ассоциируется с повышенной пролиферацией и миграцией раковых клеток, метастазированием и плохим прогнозом у пациентов. Однако результаты как клинических, так и экспериментальных исследований прогностического значения экспрессии гена *ACTN4* не всегда совпадают и зависят от типа опухоли. Также неясно насколько уровень экспрессии *ACTN4* может влиять на активность NF-κB в разных типах клеток и насколько оба фактора могут совместно влиять на развитие опухоли.

Цель исследования — анализ совместного влияния NF-κB и *ACTN4* на подвижность, пролиферацию и устойчивость раковых клеток к действию препаратов.

Материалы и методы. В качестве объекта исследований взяты линии НМРЛ с активацией NF-κB, вызванной гиперэкспрессией гена *RELA* или обработкой TNF-α. Для изменения экспрессии *ACTN4* использовались CRISPR/Cas9 нокаут и трансдукция полноразмерной кДНК. Полученные линии проверялись на миграции и их скорость, способность к образованию колоний, выживаемость после генотоксического стресса, экспрессию маркеров ЭМП и NF-κB-зависимых генов.

Результаты. Предварительные данные подтвердили, что эффекты активация NF-κB и высокой (низкой) экспрессии *ACTN4* варьируют в зависимости от линии. Так, в клетках H1299 и активация NF-κB, и подавление *ACTN4* вызывают замедление пролиферации и миграции клеток. Судя по включению EdU и окраске на фосфогистон H3, активация NF-κB стимулирует деление клеток, но вызывает нарушения полимеризации тубулина, что, вероятно, и служит причиной подавления пролиферации и миграции. Механизмы эффектов *ACTN4* сейчас исследуются. При этом, изменение экспрессии *ACTN4* не влияет на миграцию клеток

эпителиальной линии H460, и эффект NF-κB также не столь очевиден. В нашей работе не детектировали влияния NF-κB на устойчивость клеток к генотоксическому стрессу, однако изменение экспрессии *ACTN4* влияет на устойчивость клеток к этопозиду и ионизирующему излучению.

Заключение. Изменение экспрессии *ACTN4* и активности NF-κB могут оказывать как совместное, так и самостоятельное влияние на свойства раковых клеток. Планируется продолжение данной работы — исследование совместного влияния *ACTN4* и NF-κB на более широкую панель клеточных линий с различным эпителиально-мезенхимным статусом и мутационным фоном.

Новое в изучении биоэнергетики раковой клетки

И.В. Тюмин¹, О.В. Тюмина^{1,2}, В.А. Мельников²

¹Центр клеточных технологий, ГБУЗ МЦ «Династия», Самара;

²ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России

Введение. За последние 10 лет представления молекулярной онкологии об энергетическом метаболизме злокачественной клетки кардинально изменились, ведется поиск новых молекулярных механизмов в каскадных путях биоэнергетики рака.

Нами выдвинута и разрабатывается теория «энергетической метаплазии раковых клеток», т. е. приобретения дополнительного автотрофного способа получения энергии (хемосинтетические реакции) в процессе онкогенеза. Доказательство гипотезы открывает перспективы объяснения некоторых вопросов онкогенеза и нового подхода к лечению раковых заболеваний.

Цель исследования — изучить и получить доказательства существования хемосинтетических реакций как способа получения энергии у раковых клеток.

Материалы и методы. Исследования проходили на базе Центра клеточных технологий ГБУЗ МЦ «Династия». Все эксперименты проведены *in vitro* с использованием культуры линии HeLa (карцинома шейки матки) и культуры мезенхимальных стволовых клеток человека в качестве контроля. Доказательство выдвигаемой теории проведено в 4 этапа. На 1-м этапе проведен аналитический обзор, 2-й этап — классический опыт Виноградского — определение жизнеспособности клеток в условиях ингибирования реакции хемосинтеза в результате связывания железа в культуральной среде, 3-й этап — изучение энергетического метаболизма методом анализа внеклеточных потоков, 4-й этап — биоинформатическое исследование.

Результаты. Аналитический обзор работ по эволюции способа получения энергии растительными и животными клетками выявил возможную хемосинтетическую реакцию для получения энергии у раковых клеток — окисление ионов железа ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$).

Проведенный классический опыт Виноградского по связыванию железа в культуральной среде злокачественной культуры HeLa показал резкое угнетение роста злокачественных клеток вплоть до их гибели. Эксперименты на анализаторе клеточного метаболизма SeaHorse выявили у клеток HeLa угнетение 2 классических путей получения энергии (окислительное фосфорилирование и гликолиз). В результате биоинформатического исследования в геноме человека найдены гомологи бактериальных генов, отвечающих за хемосинтетические реакции с участием ионов железа.

Заключение. Показано, что у злокачественных клеток возможны хемосинтетические реакции с участием ионов железа, что позволяет сменить энергетический фенотип и приобрести дополнительный автотрофный способ получения энергии, позволяющий приобретать раковым клеткам свойства неконтролируемого роста и метастатического распространения. Данный молекулярный каскад требует дополнительного изучения и представляет интерес в качестве мишени для разработки таргетных противоопухолевых препаратов.

Гиперметилированные гены длинных некодирующих РНК в первичных опухолях рака яичников и перитонеальных макроскопических метастазах

Е.А. Филиппова¹, С.С. Лукина¹, А.М. Бурданный¹,
Н.А. Иванова¹, И.В. Пронина¹, Т.П. Казубская²,
В.И. Логинов¹, Э.А. Брага¹, Н.Е. Кушлинский²

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

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

Цель исследования — определение новых гиперметилированных генов длинных некодирующих РНК (днРНК) в опухолях яичников и их роли в регуляции процессов развития РЯ и перитонеального метастазирования.

Материалы и методы. В работе использованы 40 образцов первичных опухолей, среди которых 17 взяты от пациенток без метастазов, 23 — от больных с метастазами и 19 перитонеальных макроскопических метастазов. Анализ уровня ДНК-метилирования генов днРНК проводили с применением количественной метил-специфической ПЦР в реальном времени с использованием набора qPCRmix-HS SYBR по протоколу фирмы «Евроген» в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США). Значимость различий оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни в системе для статистического анализа данных IBM SPSS Statistics 22.

Результаты. Впервые обнаружено многократное и статистически значимое ($p < 0,001$) повышение уровня метилирования более 10 генов днРНК в первичных

опухолях РЯ, что указывает на супрессорную функцию данных днРНК и онкогенную роль метилирования, подавляющего экспрессию этих генов. При анализе 19 образцов перитонеальных макроскопических метастазов (по сравнению с парными первичными опухолями) обнаружено статистически значимое снижение уровня метилирования 4 генов: *MEG3* ($p = 0,004$), *SEMA3B-AS1* ($p = 0,002$), *TINCR* ($p = 0,002$) и *ZNF667-AS1* ($p < 0,001$), что, по-видимому, связано с влиянием инактивирующего метилирования генов данных супрессорных днРНК на стимуляцию пластичной реверсии переходов ЭМП — МЭП при колонизации вторичных опухолей.

Заключение. Идентифицировано более 10 генов днРНК, гиперметилированных с высоким уровнем в первичных опухолях РЯ, которые можно использовать как новые биомаркеры для диагностики заболевания. Предполагается двойственная роль гиперметилирования 4 днРНК: драйверная — в развитии и прогрессии первичных опухолей, а также супрессорная функция — после колонизации вторичных опухолей, возможно, с активацией обращения ЭМП — МЭП.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-15-00368).

Характеристика моноцитов CCR2⁺ и CD163⁺ крови пациентов с колоректальным раком в динамике противоопухолевого лечения

А.А. Фролова^{1,2}, М.Р. Патышева^{1,2}, Е.С. Григорьева²,
М.Н. Стахеева², А.С. Тарасова², С.Г. Афанасьев²,
Н.В. Чердынцева^{1,2}, Ю.Г. Кжышковска^{1,3}

¹ФГАУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»;

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»;

³Институт трансфузионной медицины и иммунологии, Гейдельбергский университет, Маннгейм, Германия

Введение. Циркулирующие моноциты могут иметь фенотипические и функциональные особенности, индуцированные опухолью, и вовлекаться как в процесс роста и метастазирования, так и в ответ на терапию.

Цель исследования — охарактеризовать субпопуляционный состав моноцитов крови при КРР в динамике противоопухолевого лечения.

Материалы и методы. Методом проточной цитометрии у 40 больных раком ободочной кишки и 33 больных РПК в крови определено содержание моноцитов CD14⁺ и CD16⁺, CD163⁺ и CCR2⁺. Кровь собиралась от пациентов до лечения, после проведения НХТ для группы с РПК и через 7 сут после операции. В группу контроля вошли 32 здоровых донора.

Результаты. При КРР количество моноцитов CD14⁺16⁺CCR2⁺ по сравнению с донорами составило 62,78 (52,84–79,49), снижалось до 29,58 (4,31–76,15) %,

($p < 0,05$), обусловленное реализацией взаимодействия CCR2⁺ с его лигандом. То же наблюдалось и для CD14⁺16⁺CCR2: 15,85 (1,29–27,02) при КРР против 20,37 (12,27–32,94) % у доноров ($p < 0,05$). Содержание CD14⁺16⁺CD163⁺ оказалось ниже в группе КРР — 79,22 (71,43–88,51) по сравнению с донорами — 90,94 (80,55–96,85) % ($p < 0,05$), а для CD14⁺16⁺CD163⁺ — 85,63 (68,52–93,42) против 94,51 (86,89–98,22) % у доноров ($p < 0,05$). Схожая картина после НХТ наблюдалась в группе с РПК, где количество CD14⁺16⁺163⁺ увеличилось до 90,44 (86,84–97,41) против показателя до лечения — 73,08 (23,97–89,11) % ($p < 0,05$). Резекция опухоли активировала миграционный потенциал моноцитов за счет повышения субпопуляции CD14⁺16⁺CCR2⁺ у пациентов с КРР — 59,72 (9,68–74,9) % ($p < 0,05$).

Заключение. Анализ особенностей субпопуляционной структуры моноцитов при КРР выявил, что CD14⁺16⁺ и CD14⁺16⁺, экспрессирующие CD163⁺ и CCR2⁺, вовлечены в патогенез КРР вне зависимости от локализации процесса. Результаты позволяют исследовать эти субпопуляции в дальнейшем как новые мишени для иммунотерапии КРР.

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

Влияние нокаута гена IQGAP3 на выраженность злокачественного потенциала культуры клеток гепатомы человека Huh7

П.А. Хесина^{1,2}, О.М. Кривцова¹, И.Ф. Кустова¹,
Н.Л. Лазаревич^{1,2}

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

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

Введение. Высокая смертность и низкая эффективность лечения гепатоцеллюлярной карциномы определяются поздними сроками выявления заболевания и устойчивостью к ХТ. При гепатоканцерогенезе наиболее часто нарушаются функции опухолевых супрессоров p53 и Rb, компонентов MAPK- и Wnt-сигнального пути. Белки семейства IQGAP служат скаффолд-белками и взаимодействуют с компонентами MAPK-, NF-κB-, PI3K- и Wnt-сигнальных каскадов. Известно, что *IQGAP1* проявляет свойства протоонкогена, а *IQGAP2* — опухолевого супрессора. Функция *IQGAP3*, гиперэкспрессия которого описана нами ранее в подавляющем большинстве клинических образцов гепатоцеллюлярной карциномы, пока изучена недостаточно.

Цель исследования — изучение влияния нокаута гена *IQGAP3* в культуре клеток дифференцированной гепатомы человека Huh7 на основные биологические характеристики опухолевых клеток, определяющие их злокачественный потенциал.

Материалы и методы. Нокаут в 11 экзоне гена *IQGAP3* проведен методом геномного редактирования с использованием системы CRISPR-Cas9. Отбор клонов, в которых произошло редактирование всех копий *IQGAP3*, проведен методом иммуноблоттинга с антителами к *IQGAP3* и секвенирования участков вокруг сайта редактирования на платформе Illumina MiSeq. Для отобранных клонов исследовано влияние нокаута гена *IQGAP3* на способность к пролиферации, миграции и колониеобразованию.

Результаты. При анализе пролиферативного потенциала методом импульсного мечения синтезируемой ДНК 5' — бромдезоксисуридином снижение пролиферативной активности относительно контрольной культуры выявлено в 1 из 3 нокаутных линий (17 %), в других случаях изменения пролиферации не происходило. При анализе миграционного потенциала в камерах Бойдена во всех культурах выявлено снижение миграционного потенциала в 2–4 раза. Клоногенный потенциал всех нокаутных линий снижен в 2–3 раза относительно контрольной культуры.

Заключение. Показано, что нокаут *IQGAP3* в культуре клеток дифференцированной гепатомы человека Huh7 вызывает снижение злокачественного потенциала. Полученные данные указывают на то, что скаффолд-белок *IQGAP3* в клетках гепатоцеллюлярной карциномы играет опухоль-прототирующую роль и может рассматриваться как потенциальная мишень для противоопухолевой терапии.

Аберрации числа копий ДНК у больных немелкоклеточным раком легкого с высоким риском метастазирования и рецидивирования

А.А. Хозяинова, А.А. Щеголева, Т.С. Геращенко,
Р.С. Воробьев, Е.О. Родионов, О.В. Панкова,
В.М. Перельмутер, Е.В. Денисов
НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. Профилактика и раннее обнаружение гематогенных метастазов и локорегионарных рецидивов имеют решающее значение для улучшения лечения больных РЛ. Ранее показано, что различные сочетания предопухолевых изменений в эпителии мелких бронхов на удалении от первичной опухоли ассоциированы с риском прогрессирования НМРЛ. Так, наличие изолированной базально-клеточной гиперплазии (БКГ) связано с высокой частотой гематогенного метастазирования, а сочетание БКГ и плоскоклеточной метаплазии (ПМ) — с высокой вероятностью рецидивирования НМРЛ. Причины, обуславливающие высокий риск прогрессирования НМРЛ у больных с изолированной БКГ и сочетанием БКГ и ПМ, неизвестны.

Цель исследования — изучение аберраций числа копий ДНК (CNA) у больных НМРЛ, характеризующихся

высоким риском метастазирования и локорегионарного рецидивирования.

Материалы и методы. В исследование включены 47 больных НМРЛ, разделенные на 2 группы. В 1-й группе пациенты с изолированной БКГ и высоким риском гематогенного метастазирования. Во 2-й — пациенты с сочетанием БКГ и ПМ и высоким риском локорегионарного рецидивирования. Образцы ДНК выделяли из свежзамороженных образцов опухолевой ткани легкого с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США) и периферической крови фенол-хлороформным методом с последующей подготовкой библиотек набором SureSelect XT Human All Exon v. 7 (Agilent, США). Секвенирование проводили на платформе NextSeq 500 (Illumina, США). Биоинформатический анализ данных выполняли с помощью пайплайна GATK и инструмента ClinCNV.

Результаты. У пациентов с высоким риском метастазирования средняя мутационная нагрузка составила 45,2 против 64,9 % в группе с высоким риском локорегионарного рецидивирования.

Функциональное аннотирование генов с CNA, специфических для больных с высоким риском метастазирования, выявило их вовлеченность в сигнальный путь NF-κB — регулятора ЭМП ($p < 0,05$). У больных с высоким риском рецидивирования CNA захватывают гены, вовлеченные в регуляцию взаимодействия рецепторов ВКМ и активацию проницаемости эндотелиальных клеток сосудов ($p < 0,05$).

Заключение. Больные НМРЛ с высоким риском метастазирования и локорегионарного рецидивирования отличаются друг от друга по степени мутационной нагрузки и вовлеченности CNA в различные сигнальные пути.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 20-75-10060).

Мутационные сигнатуры немелкоклеточного рака легкого с высоким риском метастазирования и рецидивирования

А.А. Щеголева, А.А. Хозяинова, Т.С. Геращенко,
Р.С. Воробьев, Е.О. Родионов, О.В. Панкова,
В.М. Перельмутер, Е.В. Денисов
НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. Мутационные сигнатуры представляют собой спектр точечных мутаций (single-base substitution signatures, SBS), отражающих определенные сценарии канцерогенеза. На сегодняшний день описано около 50 SBS-сигнатур, ассоциированных с определенными эндогенными или экзогенными факторами. К настоящему моменту показано, что развитие НМРЛ ассоциировано со следующими мутационными сигнатурами:

SBS1 (дезаминирование 5-метил-цитозина), SBS2 и SBS13 (активация цитидиндезаминаз APOBEC), SBS3 и SBS9 (нарушение процессов репарации и репликации ДНК), SBS4 (курение), SBS5 (старение), и SBS18 (нарушения, вызванные АФК). Однако нет данных, насколько данные сигнатуры могут быть ассоциированы с прогрессированием НМРЛ. Ранее показано, что наличие изолированной БКГ в эпителии мелких бронхов больных НМРЛ связано с высокой частотой гематогенного метастазирования, а локорегионарные рецидивы чаще всего обнаруживаются у пациентов с сочетанием БКГ и плоскоклеточной метаплазии (ПМ). Однако, механизмы данной ассоциации не известны.

Цель исследования — оценка мутационных сигнатур в НМРЛ, характеризующихся высоким риском гематогенного метастазирования и локорегионарного рецидивирования.

Материалы и методы. В исследование включено 47 пациентов с НМРЛ: в 1-й группе — пациенты с изолированной БКГ и высоким риском гематогенного метастазирования, во 2-й — пациенты с БКГ и ПМ и высоким риском локорегионарного рецидивирования. Образцы ДНК выделяли из свежемороженой опухолевой ткани легкого и периферической крови и проводили подготовку экзомных библиотек с помощью набора SureSelect XT v. 7.0 (Agilent, США). Секвенирование вели на платформе NextSeq 500 (Illumina, США).

Результаты. Среднее количество функционально значимых мутаций в НМРЛ с высоким риском метастазирования (пациенты с изолированной БКГ) составило 199 ± 147 , а у больных с высоким риском рецидивирования (пациенты с БКГ и ПМ) — 243 ± 97 . У всех пациентов вне зависимости от степени риска прогрессирования НМРЛ обнаружены мутационные сигнатуры, связанные с дезаминированием 5-метил-цитозина (SBS1), курением (SBS4) и старением (SBS5). Однако оказалось, что для больных с высоким риском рецидивирования характерны мутационные сигнатуры, связанные с активацией цитидиндезаминаз APOBEC (SBS2 и SBS13) и нарушением процессов репарации (SBS30).

Заключение. Пациенты с высоким риском рецидивирования НМРЛ имеют более мутаторный фенотип опухоли по сравнению с пациентами высокого риска метастазирования, что, возможно, связано с наличием мутационных сигнатур, ассоциируемых с нарушением процессов репарации и активацией APOBEC.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-75-10060).

Прогнозирование онкологического риска у больных аденомами толстой кишки с учетом особенностей субпопуляций тетраспанинов и протеаз экзосом

Н.В. Юнусова, Е.С. Колегова, И.В. Кондакова,
С.Г. Афанасьев, О.В. Черемисина

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. Наиболее значимые предраковые заболевания — полипы толстой кишки, причем КРР в 90 % случаев развивается из аденоматозных полипов или аденом, риск малигнизации других гистологических форм полипов толстой кишки кратно ниже. Несмотря на то что удаление полипов позволяет снизить заболеваемость КРР на 20 %, полипэктомия не гарантирует отсутствия рецидива аденом. Кроме того, среди оперированных по поводу аденом толстой кишки в 6 раз чаще развивается рак ободочной и толстой кишки, чем в общей популяции. Очевидно, что прогнозирование онкологического риска у больных с полипами толстой кишки в анамнезе — важная задача современной онкологии.

Материалы и методы. В исследование включены 15 больных с аденомами толстой кишки и 40 больных с КРР II–III стадий. Экзосомы выделены из плазмы крови методом ультрафильтрации с двойным ультрацентрифугированием, охарактеризованы с использованием ТЭМ и проточной цитометрии на наличие CD9, CD81 и CD63. Определение уровня суммы α - и β -субъединиц 20S-протеасом в экзосомах выполнено вестерн-блоттингом, а субпопуляций металлопротеиназ (ADAM10/ADAM17, MMP9/MMP2/EMMPRIN) на поверхности CD9-позитивных экзосом — с помощью проточной цитометрии.

Результаты. Для построения модели использованы клинические данные (пол, возраст, индекс массы тела) и данные по маркерам экзосом больных с аденомами толстой кишки и пациентов с локализованным и местно-распространенным КРР. Показатели проверены как предикторы в модели логистической регрессии прогнозирования онкологического риска у больных с полипами толстой кишки. На основе модели, разработанной по критерию Хосмера–Лемешоу ($p > 0,05$, R -квадрат Найджелкерка $> 0,5$), определены 4 предиктора, которые можно использовать для прогнозирования онкологического риска, такие как возраст, уровень 20S-протеасом, субпопуляции MMP9⁺ и MMP9⁺MMP2⁺EMMPRIN⁺ экзосом. Далее проведена оценка чувствительности и специфичности данной модели, которая составила 93,8 и 80 % соответственно. Значение вероятности онкологического риска рассчитывали, учитывая значение регрессионной функции F и основание натурального логарифма (e). На следующем этапе оценен вклад каждого значимого показателя с помощью ROC-анализа: уровень

20S-протеасом ($AUC = 0,850$), MMP9⁺ ($AUC = 0,925$) и MMP9⁺MMP2⁺EMMPRIN⁺ ($AUC = 0,812$) субпопуляции, возраст пациентов ($AUC = 0,913$).

Заключение. Показано, что для прогнозирования онкологического риска у больных с аденомами толстой кишки значимы следующие параметры: уровни 20S-протеасом, субпопуляции MMP9⁺ и MMP9⁺MMP2⁺EMMPRIN⁺ экзосом. Уровень 20S-протеасом и доля MMP9⁺ повышают онкологический риск. Анализируя данные ROC-анализа, необходимо отметить важную роль субпопуляции MMP9⁺MMP2⁺EMMPRIN⁺ в отношении онкологического риска у больных с полипами толстой кишки, также данная субпопуляция снижает онкологический риск у больных аденомами.

Влияние протонного облучения (доза 10 Гр) на васкуляризацию и экспрессию маркеров ангиогенеза и воспаления в первичном очаге мышинной меланомы B16

А.О. Якимова¹, Е.И. Селиванова¹, О.Н. Матчук¹,
В.А. Мосина¹, В.Р. Гусарова¹, Е.А. Красавин²,
И.А. Замулаева¹

¹Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба, филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск;

²Международная межправительственная научно-исследовательская организация «Объединенный институт ядерных исследований», Дубна

Введение. Радиотерапия широко применяется для лечения различных онкологических заболеваний. Классический подход предполагает использование фотонного (например, γ -) излучения, существенный минус которого — радиационное повреждение окружающих опухоль нормальных тканей. Применение протонного облучения практически лишено этого недостатка благодаря особому пространственному распределению дозы ионизирующего излучения. Известно, что относительная биологическая эффективность протонов невелика и составляет 1,1–1,2 по критерию выживаемости клеток, в то время как клинические результаты использования протонных пучков (такие как локальный контроль и безрецидивная выживаемость пациентов) в ряде случаев оказываются лучше, чем при использовании фотонных излучений. Механизмы, лежащие в основе данного явления, до конца не изучены.

Цель исследования — изучить влияние облучения протонами в дозе 10 Гр на васкуляризацию и уровень экспрессии маркеров ангиогенеза и воспаления в образцах опухоли на модели мышинной меланомы B16.

Материалы и методы. Клетки меланомы B16 прививали в заднюю лапу мышей (200 тыс. кл./мышь),

через 12 дней опухоли локально облучали протонами в дозе 10 Гр. Периферические фрагменты опухолей собирали через 2 и 9 дней после лучевого воздействия. Уровень васкуляризации в образцах опухолей оценивали по относительному количеству эндотелиальных клеток CD146⁺ CD31⁺ методом проточной цитометрии. Анализ экспрессии маркеров ангиогенеза и воспаления (Vegfa, Vegfc, Il-6 и Il-8) проводили при помощи ПЦР в режиме реального времени, в качестве референсных выбраны гены *Hprt* и *Ipo8*, стабильность которых проверили с помощью алгоритмов BestKeeper и NormFinder.

Результаты. Согласно предварительным данным, относительное количество клеток CD146⁺ CD31⁺ в образцах опухолей после облучения протонами в дозе 10 Гр снижалось в среднем в 2 раза по сравнению с контрольной группой в обеих временных точках. Из-за высоких индивидуальных различий выявленные отличия нельзя считать статистически значимыми. На 9-е сутки после протонного облучения в опытной группе выявлено статистически значимое снижение уровня экспрессии Vegfa ($p = 0,004$), тенденция к снижению Vegfc ($p = 0,079$) и статистически значимое повышение уровня экспрессии Il-6 ($p = 0,002$) по сравнению с таковыми в контроле.

Заключение. Полученные данные указывают на то, что высокая клиническая эффективность протонного облучения может быть обусловлена, по крайней мере частично, угнетением васкуляризации и усилением локального воспалительного ответа в опухоли.

Методические особенности исследования внеклеточных везикул с помощью микроскопии высокого разрешения

Д.В. Багров¹, И.И. Никишин¹, А.М. Сенковенко¹,
В.В. Адлерберг¹, Г.О. Скрабин², А.В. Комельков²,
П.Б. Копнин², Е.М. Чевкина²

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова»;

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

Цели исследования: усовершенствовать методики визуализации внеклеточных везикул (ВВ) методами атомно-силовой (АСМ) и просвечивающей (ПЭМ) электронной микроскопии, чтобы сократить время приготовления образцов и обработки данных; установить особенности морфологии внеклеточных везикул на подложке.

Материалы и методы. Объекты исследования — экзосомы различного происхождения, выделенные из кондиционированной среды культивирования клеток, а также различных физиологических жидкостей человека.

Для исследования АСМ-методом образцы наносили на сляду, модифицированную NiCl₂. Измерения АСМ-методом проводили на микроскопе Solver PRO-M в полуконтактном режиме сканирования. Для исследования ПЭМ-методом образцы наносили на сетки, обработанные с помощью тлеющего разряда, и контрастировали 1 % р-ром уксуса. Измерения проводили на микроскопах JEM-1011 или JEM-1400.

Результаты. При исследовании ПЭМ-методом с использованием контрастирования солями тяжелых металлов, ВВ выглядят как округлые частицы с затемнением в центральной части или на периферии. Такая морфология получила название *cup-shaped morphology*, она проявляется вне зависимости от происхождения ВВ. Считается, что данная морфология возникает в результате деформации ВВ при их адсорбции на подложку, однако, по нашим данным, это не совсем так. Во-первых, при исследовании АСМ-методом оказывается, что на сляде такую морфологию имеет лишь около 1 % частиц. Во-вторых, оригинальным методом корреляционной микроскопии мы показали, что на сетках для ПЭМ углубление наблюдается лишь у 20–40 % частиц. Вероятно, наблюдаемая морфология возникает в результате затекания контрастирующего агента (уксуса) внутрь ВВ, и хотя мы приняли считать ее за артефакт, наблюдаемая морфология *cup-shaped morphology* позволяет отличать ВВ от примесей на ПЭМ-изображениях. Нами разработана программа, которая автоматизирует обработку таких изображений (www.bioeng.ru/scanav).

Заключение. Описанные в работе методики визуализации и обработки данных могут быть полезны для исследователей, которые изучают физиологические функции ВВ и их диагностический потенциал.

Транспорт глюкозы в ткани карцином эндометрия с учетом молекулярно-биологического типа этого заболевания

Л.М. Берштейн, А.О. Иванцов, А.Г. Иевлева, И.В. Берлев
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России, Санкт-Петербург

Цель исследования — провести сравнительный иммуногистохимический анализ экспрессии переносчика глюкозы GLUT-1 и ее котранспортера SGLT2, а также экспрессии соответствующих мРНК (генов) в опухолевой

ткани пациенток, страдающих одним из 4 молекулярно-биологических типов рака эндометрия (с мутацией гена *POLE*, дефектом репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, или MMR-D, экспрессией онкобелка P53 и без характерного молекулярного профиля/WCMP/) по классификации PROMISE (Talhouk et al. 2017, 2019; Murali et al., 2014; Berstein et al., 2019, 2021).

Материалы и методы. К работе привлекался материал от 194 ранее не леченных больных раком эндометрия, из них 12 — с мутацией *POLE*, 55 — с дефектом mismatch-репарации, 12 — с экспрессией P53 и 115 пациенток, у которых ткань новообразования не имела характерного молекулярного профиля. Относительная экспрессия мРНК генов *GLUT-1* и *SGLT2* определялась при помощи количественной ПЦР.

При проведении ИГХ-исследования оценивали мембранную экспрессию маркеров GLUT1 и SGLT2 и ядерную экспрессию ингибиторов циклинкиназ p21 и p27. Окрашивание проводилось в соответствии с рекомендациями производителей. Случай оценивался как положительный, если было окрашивание в любом количестве опухолевых клеток любой степени интенсивности (т.е. экспрессия либо была мозаичной, либо отсутствовала полностью).

Результаты. Наиболее часто положительная экспрессия GLUT-1 по данным ИГХ-исследования выявлялась при типах MMR-D и POLE, а экспрессия SGLT2 — при типе POLE. При том же типе POLE, как и при типе с экспрессией p53, отмечалась склонность к высокой (положительной) экспрессии ингибитора p27 циклинкиназ, что не было характерно для ингибитора p21 тех же энзимов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла. При оценке данных по экспрессии мРНК GLUT-1 и SGLT2 выяснилось, что экспрессия мРНК GLUT-1 наблюдалась во всех проанализированных образцах, в то время как положительная экспрессия мРНК SGLT2 присутствовала в 32 (19,6 %) из 163 опухолей. Уровень мРНК GLUT-1 и частота присутствия мРНК SGLT2 достоверно не различались между исследуемыми молекулярными типами рака эндометрия.

Выводы. Описываемое в последние годы с фундаментальной и клинической точки зрения различие между отдельными молекулярно-биологическими типами рака эндометрия говорит о необходимости принимать во внимание и роль эндокринных и метаболических факторов (Berstein et al., 2019, 2021), что подтверждается в настоящем сообщении и на примере механизмов, связанных с транспортом и, возможно, с утилизацией глюкозы.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОПУХОЛЕЙ

Possibilities of cytokine determination in various tissues and their clinical significance

V. Jurisic

*University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences,
Kragujevac, Serbia*

Cytokines are small proteins that participate in many interactions between cells of the immune system including the interaction between cells of the immune system and tumor tissues. Bearing in mind that the development of new technology has been developing enormously in the last period and those new methods of cytokine determination in various fluids and micro-concentrations are available to us. Here, the aim is to focus on the specific possibilities of determination and analysis of cytokine values in different tissues including serum, cell culture, and their supernatants. In addition, intracellular genetic regulation in single cells is of great interest. The results show that in addition to the analysis of serum cytokines traditionally determined in tumor patients, today it is important to determine the cytokines produced from cell cultures, with the special possibility of determining several cytokines simultaneously using multiplex assays. Cultured cells show a decrease in cytokine production in effector cells and NK cells, indicating suppression of the immune response depending on the clinical stage of the disease. This correlates with increased values of serum inflammatory cytokines. Determination of the intracellular profile of cytokines by flow cytometry also showed a decrease in the value in the population of NK cells or effector cytotoxic cells. Gene regulation of certain pro-inflammatory cytokines and their polymorphisms is important for understanding the possibility of immunomodulation. We expect that based on the new possibilities of cytokine determination using modern techniques, based on the principles of multi-omics technologies, better results will be achieved especially for personalized diagnosis or therapy in oncology.

Молекулярное профилирование соматических мутаций в клетках опухоли

Г.Ж. Абильдинова, Ж.М. Жабакова, А.А. Шинтемирова,
А.В. Боровикова

*Больница Медицинского центра Управления делами
Президента Республики Казахстан,
Нур-Султан, Республика Казахстан*

Введение. Для установления причины развития онкологического заболевания, уточнения его прогноза, выбора терапии с учетом индивидуальных особенностей необходимо изучение мутационного статуса клеток опухоли. Адаптационная (прецизионная) терапия значительно повышает клиническую и экономическую эффективность применения дорогостоящих лекарственных средств.

Цель исследования — поиск мутаций в клетках опухоли, заключенных в парафиновые блоки, для оптимизации назначения адаптационной терапии.

Материалы и методы. Исследовались парафиновые блоки с биопсийным/операционным материалом пациентов. ДНК и РНК извлечены из клеток опухоли, заключенных в парафиновые блоки, с использованием набора RecoverAll™ Multi-Sample RNA/DNA (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя. Применен молекулярно-генетический метод (NGS-технология) с использованием таргетного полупроводникового секвенирования Ion GeneStudio S5 Plus (Thermo Fisher Scientific, США). Подготовка библиотеки состояла из секвенирования амплифицированных фрагментов, анализ производился в системе Ion PGM™ согласно протоколу производителя. Биоинформационный анализ результатов осуществлялся с помощью программного обеспечения Ion Reporter™ Software, модуля анализа OncoPrint™ Focus Assay.

Результаты. В 48 % случаев при солидных опухолях различной локализации были выявлены изменения генома. В 70 % случаях идентифицированы миссенс-мутации [*BRAF* (V600E), *KRAS* (G12V), *NRAS* (Q61L), *IDH1* (R132H), *JAK3* (S493C), *PIK3CA* (E545Q), *PIK3CA* (E542K), *PIK3CA* (H1047R), *RET*] — точечные мутации

в нуклеотидной последовательности ДНК, вызывающие замену в белке одной аминокислоты на другую. У 20 % пациентов выявлено сочетание 2 мутаций [*PIK3CA* (E547K), *FGFR3* (G697S), *PIK3CA* (E542K), *KRAS* (Gly12Val), *EGFR* (A289T), *JAK3* (S493C), *BRAF* (G469V), *KRAS* (G12V), *PIK3CA* (H1047L), *IDH* p. (R132H)]. В 6 % случаев обнаружено увеличение числа копий генов *EGFR* и *KRAS*, в 4 % случаев — слияние гена (PHK) *MET- MET. M13M15, Tmprss2-ERG*. Поиск наиболее подходящих вариантов терапии проводился через реестры баз данных FDA, NCCN, EMA, ESMO.

Выводы. Полученные результаты показывают, что мультигенная диагностика при изучении мутационного статуса опухоли позволяет одновременное обнаружение различных типов биомаркеров (мутации и химерные гены), что является необходимым для настоящей персонализированной медицины, особенно в условиях растущего списка таргетных препаратов.

Клинико-экспериментальное обоснование нанобиотехнологического метода экспресс-диагностики опухолей придаточного аппарата глаза

А.П. Алексеева¹, С.В. Саакян¹, Д.А. Складнев²,
А.Ю. Цыганков¹, Н.Б. Чеснокова¹, О.В. Безнос¹,
В.В. Сорокин²

¹ФГБУ «НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца»
Минздрава России, Москва;

²ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Институт микробиологии
им. С.Н. Виноградского, Москва

Введение. Дифференциальная диагностика опухолей придаточного аппарата глаза может представлять значительные сложности, а окончательный диагноз требует гистологического исследования. Известно, что опухолевые клетки отличаются от нормальных клеток не только морфологически, но и более высокими уровнями клеточного метаболизма. Данные особенности опухолевых клеток проявляются в способности с высокой скоростью восстанавливать катионы, что может приводить к последующему формированию *in situ* биогенных наночастиц металлов.

Цель исследования — разработка нанобиотехнологического метода экспресс-диагностики опухолей придаточного аппарата глаза.

Материалы и методы. Образцы удаленных опухолевых тканей придаточного аппарата глаза ($n = 33$) и здоровых тканей из того же глаза ($n = 33$) помещали в аликвоты раствора соли серебра, которые служили в качестве источника катионов. Восстановительную активность оценивали по уровню синтеза биогенных

наночастиц серебра при взаимодействии с клетками злокачественных и доброкачественных опухолей, а также с клетками здоровых тканей в группе контроля. Формирование наночастиц регистрировали с помощью фотометра Synergy MX (Bio-Tek, США) в диапазоне 395–425 нм, специфичном для наночастиц серебра. Полученные результаты подтверждались данными гистологического исследования.

Результаты. Уровень восстановительной активности злокачественных немеланоцитарных опухолей ($n = 13$) превышал таковой показатель у клеток здоровых тканей (контроль) в $4,0 \pm 1,6$ раза и доброкачественных опухолей ($n = 17$) — в $2,2 \pm 0,6$ раза. Различия в способности опухолевых и здоровых клеток формировать *in situ* биогенные наночастицы серебра были заметны с 5-й минуты реакции восстановления катионов серебра. При сравнительном анализе восстановительной активности злокачественных опухолей зафиксирован более высокий уровень формирования *in situ* биогенных наночастиц серебра в реакционной смеси со злокачественными меланоцитарными опухолями (в 1-м случае в 11,4 раза выше, чем у клеток здоровых тканей, во 2-м — в 16,3 раза, в 3-м — в 6,5 раза), чем со злокачественными немеланоцитарными опухолями.

Выводы. Разрабатываемый метод позволяет проводить интраоперационную детекцию и экспресс-диагностику злокачественных опухолей придаточного аппарата глаза, а также в перспективе их дифференциальную диагностику, что позволит оптимизировать тактику хирургического лечения. Для уточнения уровней восстановительной активности различных видов опухолей необходимы дальнейшие исследования.

Активирующие точечные мутации генов *BRCA1/2* у больных с трижды негативным подтипом рака молочной железы в Азербайджанской популяции

Ш.Р. Алиева, Л.А. Меликова

Национальный центр онкологии, Баку,
Азербайджанская Республика

Введение. Трижды негативный РМЖ (Triple-negative breast cancer), частота которого составляет 10–24 %, в последние годы является одним из наиболее малоизученных подтипов, так как отличается агрессивностью клинического течения и незначительным числом молекулярных мишеней.

Цель исследования — изучение распространенности активирующих точечных мутаций генов *BRCA1/2* у женщин азербайджанской популяции с трижды негативным подтипом РМЖ.

Материалы и методы. Для определения мутации в генах *BRCA1/2* использовали молекулярно-генетический

метод (ПЦР), фрагменты были выявлены с помощью агарозного гель-электрофореза.

Результаты. Определение активирующих точечных мутаций генов *BRCA1/2* проводилось у 263 больных РМЖ. Во всех случаях диагноз верифицирован морфологически. Больные были разделены на 7 подгрупп с учетом примененных критериев: 1-я — семейный анамнез: больные, у которых кровные родственники 1-й и 2-й степени родства страдали РМЖ; 2-я — возрастная группа: пациенты с РМЖ в возрасте до 35 лет с семейным анамнезом и без такового; 3-я — двусторонний РМЖ; 4-я — мужчины с РМЖ; 5-я — двусторонний РМЖ; 6-я — РМЖ и яичника; 7-я — гормональный статус: трижды негативный РМЖ. Обследованные были в возрасте 21–87 лет, минимальный средний возраст составил 58 ± 3 года. Всем было проведено тестирование на носительство мутаций генов *BRCA1/2*. Трижды негативный РМЖ был у 29 женщин. Наибольшее число больных и женщин-носительниц *BRCA1/2*-мутаций было в 1-й подгруппе (с семейным анамнезом). Из 141 больных с семейным анамнезом 12 были носителями наследственных мутаций. Из 29 женщин с трижды негативным РМЖ у 2 обнаружены мутации гена *BRCA1* в локализации *BRCA1_185delAG* (1/29) и *BRCA1_5622T* (1/29), 2 мутации гена *BRCA2* в локализации *BRCA2_6174delT*.

Выводы. Таким образом, у 29 (11 %) пациентов был выявлен трижды негативный РМЖ и у 4 из них — мутации гена *BRCA1/2*.

Растворимые формы рецептора и лиганда контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в сыворотке крови больных саркомами костей: клиничко-морфологические корреляции

А.А. Алферов^{1,2}, Е.С. Герштейн^{1,2}, Е.А. Короткова¹,
Н.Ю. Соколов¹, И.В. Булычева¹, Е.А. Сушенцов¹

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

Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «Московский медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России

Введение. Первичные опухоли костей — редкие гетерогенные злокачественные новообразования, отличающиеся крайне агрессивным клиническим течением, неблагоприятным прогнозом и во многих случаях резистентностью к проводимой терапии. Поэтому в последнее время внимание привлечено к использованию принципиально новых патогенетических подходов, основанных на современных достижениях биохимии, молекулярной биологии и иммунологии опухолей, в частности новейших методов иммунотерапии, направленных на подавление контрольных точек иммунитета.

Цель исследования — анализ клиничко-диагностического значения растворимых форм рецептора и лиганда сигнального пути PD-1/PD-L1 (sPD-1 и sPD-L1) у больных с опухолями костей и их взаимосвязи с клиничко-морфологическими характеристиками наиболее распространенных злокачественных опухолей — остеосаркомы и хондросаркомы.

Материалы и методы. Обследовали 133 больных (77 мужчин, 56 женщин) с опухолями костей в возрасте 6–70 лет и 27 практически здоровых доноров 19–33 лет. У 14 пациентов выявлены доброкачественные новообразования, у 16 — пограничная гигантоклеточная опухоль, у 103 — злокачественные поражения костей, в том числе остеосаркома — у 39, хондросаркома — у 42 пациентов. Содержание sPD-L1 и sPD-1 в сыворотке крови определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа (Affimetrix, eBioscience).

Результаты. Уровень sPD-L1 в сыворотке крови больных с опухолями костей статистически значимо повышен относительно контроля ($p < 0,0001$), а уровни sPD-1 не различались. Выявлен порог концентрации sPD-L1—16 пг/мл, при котором чувствительность относительно здорового контроля составляет 79 %, специфичность — 80 %. При анализе особенностей выявления sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови пациентов с типичными остео- и хондросаркомами установлено, что при обоих типах опухолей уровень sPD-L1 статистически значимо выше, чем в контроле, однако при хрящобразующих опухолях преобладает sPD-L1, при костеобразующих — sPD-1: уровень sPD-1 у больных типичной остеосаркомой достоверно выше, чем у пациентов с типичной хондросаркомой ($p = 0,006$), а отношение sPD-L1/sPD-1 при хондросаркоме значимо выше, чем при остеосаркоме ($p = 0,0009$). Чувствительность теста sPD-L1 ≥ 16 пг/мл при остеосаркоме составляет всего 71,4 %, при хондросаркоме — 86,5 %.

Выводы. Соотношение растворимых форм рецептора и лиганда сигнального пути PD-1/PD-L1 различается у больных косте- и хрящобразующими опухолями костей, при этом sPD-L1 имеет потенциальное диагностическое значение именно при хрящобразующих опухолях.

Опухоль-ассоциированный белок бета-III тубулин (TUBB3) выявляется в морфологически нормальной ткани, окружающей очаг рака желудка

А.А. Башарина, И.Э. Мизаева, О.Б. Абу-Хайдар,
К.И. Чандрян, Н.О. Вихлянцев, А.Б. Равчеева,
С.Д. Коломийцев, Т.А. Богуш

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

Введение. Опухоль-ассоциированный белок бета-III тубулин (TUBB3) экспрессируется в эпителиальных новообразованиях, а в норме — лишь в нейронах и клетках Сертоли. Мы предположили, что выявление TUBB3 в морфологически нормальной («нормальной») ткани, окружающей опухолевый очаг, может являться прогностическим маркером локальной распространенности опухолевого процесса.

Цель исследования — изучение экспрессии TUBB3 в клетках «нормальной» ткани, окружающей очаг рака желудка.

Материалы и методы. Иммунофлуоресцентным методом и проточной цитометрией исследована экспрессия TUBB3 в 24 парах образцов рака желудка и окружающей «нормальной» ткани. Использованы первичные антитела к TUBB3 (ab7751) и вторичные — конъюгированные с DyLight650 (ab98729). Оценен уровень экспрессии TUBB3 (%) — количество специфически флуоресцирующих клеток относительно контроля (инкубация только с вторичными антителами).

Результаты. TUBB3 экспрессируется не только в ткани рака желудка, но и в окружающей «нормальной» ткани. В опухоли TUBB3 выявлен в 100 % случаев, а в «нормальной» ткани — в 79,2 %. В 36,8 % случаев уровень экспрессии маркера в «нормальной» ткани приблизительно равен показателю в опухоли, а в 63,2 % — значительно ниже. Средний уровень экспрессии TUBB3 в 1,6 раза выше в опухоли по сравнению с «нормальной» тканью органа — $50,9 \pm 10,7$ и $30,9 \pm 8,2$ % соответственно ($p < 0,0001$). Выявлена прямая корреляция ($p = 0,0061$) между уровнем экспрессии TUBB3 в опухоли и окружающей «нормальной» ткани желудка (г-Пирсона 0,54). Это соответствует средней силе связи между исследованными параметрами и означает, что, по крайней мере, в части случаев вероятность молекулярной трансформации морфологически нормальной ткани органа выше при более высоком уровне экспрессии TUBB3 в ткани рака желудка.

Выводы. Впервые выявлена экспрессия TUBB3 в клетках морфологически нормальной ткани желудка, окружающей опухолевый очаг. Учитывая, что TUBB3 — опухоль-ассоциированный белок, выявление маркера в «нормальной» ткани может указывать на локальную

распространенность опухолевого процесса и высокий метастатический потенциал опухоли. Таким образом, сравнительная оценка экспрессии TUBB3 в клетках как рака желудка, так и прилегающей «нормальной» ткани органа может быть дополнительным ориентиром при стадировании заболевания, а также выборе тактики послеоперационного лечения (активное наблюдение или терапия).

Работа выполнена в рамках программы исследований ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (рег. № АААА-А20-120020690077-0).

Растворимая форма белка B7-H3 у больных раком яичников и его прогностическая значимость

Т.П. Белова, Е.А. Короткова, Д.Н. Кушлинский,
В.Д. Ермилова, Я.З. Плиева, О.В. Ковалева, Д.А. Кудлай

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

Введение. В настоящее время выявлено несколько перспективных мишеней иммунных контрольных точек, таких как VISTA, B7-H3, LAG3 и др. Известно, что B7-H3 принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (семейство молекул B7) и участвует в регуляции иммунного ответа, опосредованного Т-клетками, воздействие на которые поможет разработать новые эффективные иммунопрепараты для терапии опухолей, в том числе и рака яичников.

Цель исследования — анализ уровней sB7-H3 в плазме крови больных раком яичников с учетом клинических, морфологических характеристик заболевания и прогноза.

Материалы и методы. Содержание растворимой формы белка ключевой точки иммунитета B7-H3 (sB7-H3) исследовали в плазме крови 75 больных эпителиальным раком яичников до начала лечения с помощью прямого иммуноферментного анализа Human B7-H3 Quantikine ELISA Kit (DB7H30, R&D) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты. Проведенный анализ показал наличие корреляционных связей между концентрацией sB7-H3 в плазме крови больных раком яичников и основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Содержание sB7-H3 было статистически значимо выше в плазме крови на более поздних стадиях заболевания, при наличии асцита и у пациенток с низкодифференцированным раком яичников. Выявили, что повышенное содержание sB7-H3 в плазме крови больных эпителиальным раком яичников ассоциировано с неблагоприятным прогнозом заболевания.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют в пользу актуальности и перспективах исследования маркера sB7-H3 в плазме крови больных раком яичников для разработки новых методов иммунотерапии.

Оптимизация диагностики HER-позитивного рака молочной железы с применением таргетных радионуклидных методов исследования

О.Д. Брагина^{1,2}, В.И. Чернов^{1,2}, В.М. Толмачев^{2,4},
С.М. Деев^{2,3}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»;

³ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской
академии наук», Москва;

⁴Уппсальский университет, Уппсала, Швеция

Введение. Гиперэкспрессия рецептора эпидермального роста HER2/neu отмечается у 15–20 % больных РМЖ. Существующие методики определения данного маркера (иммуногистохимическое исследование и FISH-анализ) имеют ряд существенных недостатков, что обуславливает необходимость поиска новых дополнительных диагностических агентов. В последние годы актуальным является проведение таргетной радионуклидной визуализации с использованием альтернативных каркасных белков. В отделении радионуклидной диагностики НИИ онкологии ТНИМЦ совместно с НИЦ «Онкотераностика» ТПУ (Томск), ИБХ РАН (Москва) и Уппсальским университетом (Уппсала) проводятся клинические исследования радиофармацевтических препаратов на основе различных альтернативных каркасных белков у больных РМЖ с гиперэкспрессией HER2/neu.

Цель исследования — изучение возможностей применения радиофармпрепаратов на основе меченных технецием-99m различных альтернативных каркасных белков для диагностики HER2-позитивного РМЖ у человека.

Материалы и методы. В исследование были включены 40 пациенток с диагнозом РМЖ (T1-2N0-1M0) до проведения системной терапии. У 20 больных была выявлена гиперэкспрессия HER2/neu, у 20 — экспрессии не выявлено. Статус HER2/neu определялся с применением иммуногистохимического метода исследования и FISH-анализа. Всем больным на этапе диагностики проводилось внутривенное введение препаратов в различных дозировках с последующим проведением радионуклидных методов введения в объеме сцинтиграфии в режиме whole body и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии.

Результаты. Активность препарата непосредственно перед введением больным составила $434 \pm 19,5$ МБк. Во всех случаях отмечалась хорошая визуализация первичной опухоли и метастатических лимфатических

узлов в подгруппе больных с гиперэкспрессией HER2/neu ($p < 0,05$, Mann–Whitney U test). Кроме того, в 4 случаях была проведена смена статуса HER2/neu в первичной опухоли. В 1 случае были выявлены дополнительные очаги опухолевого поражения проекции 5-го ребра слева, а также VIII–IX грудных позвонков. В 2 случаях была определена гетерогенность экспрессий HER2/neu в ткани первичной опухоли.

Выводы. По результатам проведенных исследований радиофармацевтические препараты на основе меченных технецием-99m альтернативных каркасных белков могут рассматриваться в качестве дополнительных диагностических агентов для определения статуса HER2/neu.

Полногеномный подход в выявлении наследственных опухолевых синдромов

М.М. Бяхова¹, А.Б. Семенова¹, В.Н. Галкин¹,
Е.Е. Баранова^{2,3}, О.В. Сагайдак², М.В. Макарова²,
М.С. Беленикин², Д.К. Черневский², Н.А. Бодунова⁴,
М.В. Воронцова⁵, А.М. Данишевич⁴, И.Е. Хатьков⁴,
Д.Ю. Каннер⁶, Н.А. Савелов⁶, А.В. Шабунин⁷, Д.Н. Греков⁷,
С.С. Лебедев⁷, Д.Н. Проценко⁸, А.О. Межуева⁸,
И.А. Назарова⁹, А.С. Привезенцев⁹

¹ГБУЗ «Городская клиническая онкологическая больница №1
ДЗМ», Москва;

²Медико-генетическая лаборатория ООО «Эвоген», Москва;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного
профессионального образования» Минздрава России, Москва;

⁴ГБУЗ «Московский клинический научно-практический
центр им. А.С. Логинова ДЗМ»;

⁵ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва;

⁶ГБУЗ «Московская городская онкологическая
больница №62 ДЗМ»;

⁷ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина ДЗМ»;

⁸ГБУЗ «Городская клиническая больница №40 ДЗМ», Москва;

⁹ГБУЗ «Городская клиническая больница им. Д.Д. Плетнева
ДЗМ», Москва

Цель исследования — изучение частоты встречаемости различных герминальных мутаций, ассоциированных с наследственными опухолевыми синдромами, среди пациентов, являющихся жителями г. Москвы, с диагностированными злокачественными новообразованиями.

Материалы и методы. С 01.02.2021 по 01.09.2021 обследовано 346 пациентов с подозрением на наследственный опухолевый синдром методом полногеномного секвенирования с валидацией методом секвенирования по Сэнгеру. В исследование включались лица со злокачественными новообразованиями следующих локализаций: РМЖ у женщин и мужчин — 288 пациентов, колоректальный рак — 45, рак яичника — 13. По результатам исследования проводилось медико-генетическое консультирование пациентов. На 2-м этапе

исследования планируется обследование родственников пациентов, у которых выявлены патогенные и/или вероятно патогенные мутации, ассоциированные с наследственным опухолевым синдромом.

Результаты. Около 10–15 % злокачественных новообразований обусловлены генетической предрасположенностью — носительством герминальных мутаций у пациента. Применение метода полногеномного секвенирования позволяет выявлять не только частые и известные мутации, ассоциированные с высоким риском развития наследственного опухолевого синдрома, но и редкие, в том числе ранее не описанные варианты. По результатам настоящего исследования у 346 пациентов выявлены 152 генетических варианта, ассоциированных с развитием наследственного опухолевого синдрома, которые были разделены на 3 группы в соответствии с рекомендациями ACMG (American College of Medical Genetics): патогенные ($n = 83$), вероятно патогенные ($n = 30$) и с неопределенной клинической значимостью ($n = 39$). 152 генетических варианта выявлены у 124 (35,8 %) из 346 пациентов. Из 288 пациентов с РМЖ 104 (36,1 %) — носители герминальных мутаций, ассоциированных с наследственным опухолевым синдромом, из 45 пациентов с колоректальным раком — 18 (40 %), из 13 пациентов с раком яичника — 2 (15,4 %). У 27 человек выявлены два и более генетических варианта, которые могут быть ассоциированы с повышенным риском развития наследственного опухолевого синдрома.

Выводы. Применение полногеномного секвенирования для обследования онкологических пациентов является новым шагом в понимании этиологии и эпидемиологии наследственных опухолевых синдромов, а также значимо повышает их выявляемость. Исследование показало, что треть пациентов, заболевание которых имеет признаки наследственного опухолевого синдрома, являются носителями герминальных мутаций. Полученные результаты позволят в дальнейшем обследовать родственников пациентов-носителей и сформировать для них, при необходимости, программу скрининга и своевременной диагностики злокачественного новообразования.

Мутации *IDH1/2* в диагностике хондронидных опухолей

В.О. Варачев, А.П. Шехтман², Д.А. Гуськов¹,
Д.В. Рогожин^{2,3}, Т.В. Наседкина¹

¹ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва;

²Российская детская клиническая больница ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Введение. Краниальные хондронидные опухоли составляют до 2 % всех опухолей головы и шеи. Выделяют доброкачественные (хондрома, хондромиксоидная фиброма) и злокачественные (хордома, хондросаркома, хондробластический вариант остеосаркомы) типы опухоли. Тактика лечения и прогноз при доброкачественных и злокачественных типах существенно различаются, в то же время диагностика является сложной комплексной задачей. Мутации в генах *IDH1/2* встречаются более чем в 30 % случаев хондросарком и могут служить диагностическим и прогностическим маркером этого типа опухоли.

Цель исследования — сравнительный анализ мутационного статуса *IDH1/2* и иммуногистохимических характеристик в образцах пациентов с краниальными хондронидными опухолями.

Материалы и методы. В исследование включены 79 пациентов в возрасте 17–74 лет (средний возраст 41 год) с краниальными хондронидными опухолями, из них 56 — с диагнозом хондросаркома, 9 — хордома, 7 — остеосаркома, 5 — хондромиксоидная фиброма, 2 — хондрома. Геномную ДНК выделяли из материала опухоли, фиксированного в парафиновых блоках. Для определения мутационного статуса генов *IDH1/2* использовали метод ПЦР в реальном времени с зондами TaqMan с последующим секвенированием по Сэнгеру. Также мутацию *IDH1* R132 определяли иммуногистохимическим методом с использованием поликлональных антител к мутантному белку *IDH1*.

Результаты. Определение мутации R132 в гене *IDH1* с помощью ПЦР в реальном времени и секвенирования было выполнено в 66 образцах. У пациентов с хондросаркомой ($n = 45$) различные замены нуклеотидов в кодоне 132, приводящие к замене аргинина (R), были выявлены в 42 % случаев. Наиболее часто встречалась замена C > T (R132C), G > A (R132H), G > T (R132L), C > G (R132G). Также мутация R132 была выявлена в образцах остеосаркомы ($n = 2$), хондромы ($n = 1$) и хордомы ($n = 1$). Иммуногистохимический анализ был проведен у 63 пациентов. Определение мутации R132 *IDH1* было выполнено обоими методами, совпадение результатов составило 80 %. Мутаций в гене *IDH2* выявлено не было.

Выводы. При анализе мутационного статуса гена *IDH1* в образцах хондросаркомы мутация R132 выявлена в 42 % случаев (ПЦР в реальном времени) и 51 % случаев (иммуногистохимия). Секвенирование по Сэнгеру позволяет не только установить факт наличия мутации, но и определить ее тип. При хондросаркомах выявлен широкий спектр нуклеотидных замен в кодоне 132 гена *IDH1*. Обнаружение мутации R132 в образцах остеосаркомы, хондромы или хордомы может послужить основанием для дальнейшего анализа и уточнения диагноза.

Особенности мутационного статуса гена *FLT3* у больных острыми миелоидными лейкозами пожилого возраста

А.В. Виноградов¹, А.В. Резайкин¹, С.В. Сазонов^{1,2},
А.Г. Сергеев¹

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург;

²ГИАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

Введение. Одним из актуальных направлений современной онкогематологии является персонализация мутационного профиля гемобластозов для назначения таргетных противоопухолевых препаратов. Особенно это актуально при лечении больных пожилого возраста, применение интенсивных схем стандартной полихимиотерапии у которых ограничено ввиду плохой переносимости и наличием медицинских противопоказаний, обусловленных коморбидностью пациентов.

Цель исследования — детекция мутаций в гене *FLT3* для определения показаний к назначению ингибиторов тирозинкиназ у больных острыми миелоидными лейкозами пожилого возраста.

Материалы и методы. Исследованы 55 проб пациентов с *de novo* острыми миелоидными лейкозами в возрасте 60–75 лет. Детекцию мутаций в гене *FLT3* проводили методами прямого мРНК-секвенирования и ПЦР с последующим фрагментным анализом.

Результаты. В результате исследования мутации в гене *FLT3* были выявлены в 8 (14,5 %) случаях, в том числе в 7 (12,7 %) — внутренние тандемные дубликации, в 1 (1,8 %) — несинонимичная замена в тирозинкиназном домене. В большинстве *FLT3*-положительных проб морфологический вариант острого миелоидного лейкоза соответствовал M4 по FAB ($n = 5$), значительно реже определялись варианты M1 ($n = 2$) и M5 ($n = 1$). Цитогенетический вариант удалось определить только в 4 образцах: нормальный кариотип — 1, трисомия хромосомы 8 — 1, трисомия хромосом 13 и 14 — 1, комплексные аберрации — 1. В остальных наблюдениях кариотипирование было неэффективным ввиду отсутствия в полученном биоматериале метафазных пластинок.

С использованием компьютерного моделирования в программном пакете Protein Homology/AnalogY Recognition Engine определены изменения мутантной тирозинкиназы FLT3 при выявленных мутациях. Установлено, что в большинстве случаев они вызывали нарушение аутоингибированного состояния белка за счет «открытого» положения активационной петли и обуславливали чувствительность к ингибиторам тирозинкиназ I типа. В одном случае при аминокислотной замене в положении 1827, незадрагивающей активационную петлю, методом компьютерного моделирования определены резистентность к ингибиторам тирозинкиназ I типа и чувствительность к ингибиторам II типа.

Выводы. Таким образом, выявленные особенности острого миелоидного лейкоза пожилых могут использоваться для разработки программ лечения, включающих ингибиторы тирозинкиназы I и II типов.

Невус Рида и меланома кожи у детей

Г.М. Волгарева¹, Л.Э. Завалишина², О.А. Кузнецова²,
О.С. Бузова¹

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

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России,
Москва

Введение. Дифференциальная диагностика между невусом Рида, который часто встречается у детей и подростков, и меланомой кожи, высокозлокачественной опухолью, обнаруживаемой у педиатрических пациентов крайне редко, представляет некоторые трудности. Важнейшим условием успешного лечения ребенка является ранняя диагностика. Дополнение классического гистологического исследования иммуногистохимическим тестом на маркерные белки может повысить точность диагностики. Ранее мы предложили использовать при дифференциальной диагностике доброкачественных и злокачественных пигментных новообразований кожи у детей иммуногистохимический тест на несколько белков и подтвердили пригодность этих маркеров в случае дифференциальной диагностики между меланомой и гигантским невусом.

Цель исследования — оценка пригодности комплекса белков (циклина D1, p16INK4a и HLA-антигенов I класса) при дифференциальной диагностике невуса Рида и меланомы кожи у детей и подростков.

Материалы и методы. Три образца пигментных новообразований кожи были получены при хирургическом лечении пациентов в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина: два образца невуса Рида (от девочки 9 лет и 15-летнего юноши) и образец меланомы кожи, развившейся у 8-летнего мальчика. Материалы были представлены парафиновыми блоками. Иммуногистохимическое окрашивание проводили антителами к циклину D1, p16INK4a, а также к HLA-антигенам I класса.

Результаты. Обнаружены различия между невусом и меланомой в экспрессии всех трех маркеров. Так, в образцах невуса ядерная экспрессия циклина D1, активатора пролиферации, имела место приблизительно в 30 % клеток, в меланоме — в подавляющем большинстве клеток. Ядерная экспрессия ингибитора клеточных делений p16INK4a в меланоме оказалась резко снижена по сравнению с невусом: он выявлялся в 10 % ядер меланомы и в 90 % ядер невуса. HLA-антигены I класса присутствовали на поверхности отдельных клеток невуса, но полностью отсутствовали на мембранах и в цитоплазме клеток меланомы, что могло способствовать «ускользанию» этой опухоли от иммунологического надзора организма.

Выводы. Иммуногистохимический тест на белки циклин D1, p16INK4a и HLA-антигены I класса перспективен при дифференциальной диагностике между невусом Риды и меланомой кожи у детей и подростков.

Роль микроРНК-661 как маркера инвазии при раке эндометрия

Д.У. Гафурбаева¹, А.В. Ахметзянова², Н.А. Нигматулина³,
А.А. Ризванов¹, Р.Р. Мифтахова¹

¹ФГАУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»;

²ГАОУ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ», Казань;

³ГАОУ «Республиканская клиническая больница МЗ РТ», Казань

Введение. Инвазия в миометрий является одним из ведущих факторов, определяющих прогноз и выбор тактики лечения при раке эндометрия. Ввиду отсутствия специфического маркера инвазии при раке эндометрия поиск сывороточных маркеров является актуальной задачей. МикроРНК в плазме и сыворотке крови находятся в стабильной и устойчивой от активности эндогенной РНКазы форме и имеют большой потенциал в качестве диагностических биомаркеров. Уровень экспрессии микроРНК-125a-3p, микроРНК-30c и микроРНК-661 был исследован при разных видах онкологических заболеваний и ассоциирован с инвазией опухолевых клеток и прогрессированием заболевания.

Цель работы — исследование ассоциации уровня экспрессии микроРНК-125a-3p, микроРНК-30c и микроРНК-661 и миометриальной инвазии при раке эндометрия.

Материалы и методы. В исследование вошли 26 пациенток с раком эндометрия, из них 18 — с инвазией менее 1/2 толщины миометрия и 8 — более 1/2. РНК выделяли из сыворотки крови при помощи коммерческого набора Zymo Research (США). Полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией была проведена с помощью наборов реагентов MicroRNA Reverse Transcription Kit и MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific, США). Нормализацию про-

водили по экспрессии гена U54.

Результаты. Проведен корреляционный анализ между уровнем экспрессии микроРНК и концентраций опухолевых маркеров (Ca-125, HE-4, CA19-9 и CEA), физиологическими и клиническими параметрами (статус ожирения и менопаузы, количество беременностей, инвазия в миометрий). Обнаружена ассоциация глубины миометриальной инвазии и уровня экспрессии микроРНК-661: уровень экспрессии был выше в группе пациенток с инвазией в миометрий более 1/2 толщины ($p = 0,015$). Экспрессия микроРНК-125a-3p была выше у пациенток в менопаузе ($p < 0,001$). Ранее было показано, микроРНК-661 влияет на инвазию клеток РМЖ посредством регуляции экспрессии белков клеточной адгезии Нектин-1 и StarD10 (Vetter G., 2010).

Выводы. Повышенный уровень экспрессии микроРНК-661 у пациенток с опухолевой инвазией в миометрий свидетельствует о возможном участии микроРНК-661 в патологическом процессе.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Новая мутация гена TP53 у молодой пациентки тувинской принадлежности с диагнозом рак молочной железы

П.А. Гервас¹, А.Ю. Молоков¹, А.А. Зарубин²,
Н.В. Чердынцева¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»;

²НИИ медицинской генетики ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Введение. Для монголоидного населения России мутации генов, обуславливающие риск развития наследственных форм РМЖ, остаются малоизученными. Основной метод поиска его ассоциированных мутаций — высокопроизводительное секвенирование (NGS). Одной из проблем интерпретации данных NGS являются впервые найденные и редкие варианты с неизвестной клинической значимостью.

Цель исследования — с помощью инструментов ActiveDriverDB и ProteinPoint, позволяющих искать и визуализировать мутации сайтов посттрансляционной модификации белков, реклассифицировать генетические варианты, найденные у тувинок с РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены тувинки в возрасте до 55 лет с признаками наследственного РМЖ. Подготовка библиотек ДНК проводилась с использованием набора Hereditary Cancer Solution™ с целью обогащения 27 генов, ассоциированных

с онкосиндромами. Секвенирование выполнялось на платформе NextSeq500 (Illumina, США).

Результаты. Мутация гена *TP53* (rs1555526933) была обнаружена у молодой тувинки 44 лет с диагнозом РМЖ. В базе данных dbPubMed (rs1555526933, chr17:7579716, G > A, Pro27Leu) эта мутация является вариантом неизвестного значения (unknown significance) с отсутствием данных о частоте встречаемости минорного аллеля. Согласно данным инструмента ActiveDriverDB мутация расположена дистально в сайте посттрансляционной модификации белков, отвечающих за связывание с киназами, регулирующих гены клеточного цикла и др. (ATM, CHEK2, CDK, MAPK). Согласно данным ProteinPoint мутация находится в кодоне, где описана патогенная мутация гена *TP53* p. Leu26GlnfsTer4 (NM_000546.6 (TP53): c. 77_80delinsAAGAACGT (p. Leu26fs), приводящая к формированию синдрома Ли — Фраумени.

Выводы. Так как сведения о малочисленных этнических группах не учитываются крупномасштабными проектами и базами данных, использование альтернативных инструментов с целью аннотирования генетических вариантов обладает несомненной информативностью.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18–29–09046.

Молекула повреждения ткани почек KIM-1 в плазме крови больных почечно-клеточным раком

Е.С. Герштейн¹, Н.Г. Трофименко², Е.А. Короткова¹,
С.Д. Бежанова¹, В.В. Бояринцев²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²Главное медицинское управление делами Президента РФ, Москва

Введение. Важная задача в области улучшения результатов лечения больных почечно-клеточным раком — поиск и валидация маркеров для его ранней диагностики, которых в клинической практике пока нет. В 2018 г. установлено, что еще до возникновения и/или выявления почечно-клеточного рака в плазме крови повышается уровень молекулы повреждения ткани почек KIM-1.

Цель исследования — сравнительная оценка уровней KIM-1 в плазме крови здоровых доноров (группа контроля) и больных злокачественными и доброкачественными новообразованиями почек, его роли в диагностике и прогнозе почечно-клеточного рака.

Материалы и методы. Обследованы 125 больных почечно-клеточным раком в возрасте 33–81 года, 14 (29–84 года) — с доброкачественными новообразованиями почки и 68 (18–71 год) практически здоровых доноров. Содержание KIM-1 в плазме крови

определяли ИФА-методом с помощью наборов реактивов Human Serum TIM-1/KIM-1/HAVCR Quantikine ELISA Kit.

Результаты. Выявлено статистически значимое повышение содержания KIM-1 в плазме крови больных почечно-клеточным раком по сравнению с контролем (медианы 305 и 37,8 пг/мл соответственно, $p < 0,0001$). Частота превышения порогового уровня 90 пг/мл, соответствующего верхнему, 95 %. ДИ контроля у больных почечно-клеточным раком составила 79,2 %, у пациентов с доброкачественными опухолями — 50 %. Специфичность относительно здорового контроля составляет 96 %. Уровень KIM-1 высоко значимо повышался с увеличением распространенности почечно-клеточного рака и уже на I стадии в 4,3 раза по медиане превышал показатели в контрольной группе ($p < 0,0001$). Частота выявления I–II стадий почечно-клеточного рака при пороговом уровне 90 пг/мл — 75 %; III–IV стадий — 94 %. Наиболее высокие уровни KIM-1 обнаружены у больных папиллярным раком (медиана 644 пг/мл), что более чем вдвое выше, чем при светлоклеточном и в 32 раза выше, чем при хромофобном почечно-клеточном раке. Уровень KIM-1 в 7 раз выше по медиане при GIII–IV, чем при GI–II степени дифференцировки опухоли ($p < 0,0001$). При пороговом уровне KIM-1 163 пг/мл, соответствующем медиане маркера при I стадии почечно-клеточного рака, выявлены значимые различия 3,5-летней выживаемости как в общей группе: при высоком уровне маркера — 49 %, при низком — 95 % ($p < 0,01$); так и при I стадии почечно-клеточного рака: 62 и 100 % соответственно ($p < 0,05$).

Выводы. KIM-1 плазмы крови может стать первым высокочувствительным маркером раннего выявления почечно-клеточного рака. Обсуждается связь уровней KIM-1 в плазме крови больных почечно-клеточным раком с прогнозом заболевания.

Экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона в образцах ткани молочной железы у женщин с предопухолевыми и опухолевыми образованиями молочной железы

А.С. Гильдиева, Н.С. Шомансурова, А.А. Абдувалиев

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр онкологии и радиологии Минздрава РУз, Ташкент, Республика Узбекистан

Введение. Достижения генетики и молекулярной биологии смогли оказать огромное влияние на понимание природы малигнизации и течения злокачественных новообразований. В настоящее время в комплекс лабораторных исследований в онкологии, помимо классических морфологических методов, вошли

иммуногистохимические с идентификацией молекулярно-генетических маркеров. Морфологические и иммуногистохимические методы исследования в совокупности расширили возможности клинической онкологии в прогнозировании патологических процессов.

Цель работы — исследование экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона в образцах ткани молочной железы у женщин с предопухолевыми и опухолевыми образованиями молочной железы.

Материал и методы. Для выявления факторов риска развития РМЖ и прогноза с последующей разработкой комплексных мер профилактики обследованы 90 пациенток с диагнозами узловая форма фиброзно-кистозной мастопатии, фибroadенома молочной железы и рак *in situ* молочной железы. Иммуногистохимический анализ проводили стандартным методом, применяемым для биопсийного материала, залитого в парафин с помощью моноклональных антител фирмы «ДАКО». Были изучены рецепторы эстрогенов и прогестерона. Для визуализации применялась система детекции REVEAL-Biotin-Free Polyvalent DAB.

Результаты. Положительная экспрессия рецепторов эстрогенов наблюдалась чаще всего у женщин при фиброзной мастопатии узловой формы и при раке *in situ* (71,85 и 60,0 % соответственно). Положительная экспрессия рецепторов прогестерона выявлена у 50 % женщин со всеми формами патологии молочной железы (фибрroadеномой, фиброзной мастопатией узловой формы, раком *in situ*). Отрицательная экспрессия обоих маркеров рецепторов эстрогенов и прогестерона реже встречалась при фиброзной мастопатии узловой формы (9,4 %) по сравнению с женщинами, имеющими фибroadену и рак *in situ* (28,6 и 20,0 %, соответственно). Фиброзно-кистозная мастопатия узловой формы может являться промежуточной стадией в развитии злокачественного процесса. Так как следствием действия эстрогенов могут стать изменения пролиферативной активности эпителиоцитов молочной железы, высокая экспрессия рецепторов эстрогенов при узловой форме фиброзной мастопатии и раке *in situ* рассматривается как важный критерий озлокачествления опухоли.

Выводы. Исследования молочной железы больных с предопухолевыми и опухолевыми образованиями, осуществляемые с применением иммуногистохимических реакций и морфометрии, могут способствовать более объективной оценке изменений молочной железы при патологических процессах в ней.

МикроРНК как молекулярно-генетические маркеры в диагностике неоплазий и преинвазивного рака шейки матки

Т.А. Димитриади, Д.В. Бурцев, Е.А. Дженкова
ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. В настоящее время недостаточно известно о специфических микроРНК, задействованных в развитии цервикальной интраэпителиальной неоплазии 1–3 степеней тяжести и переходе к карциноме *in situ*. Проведенный нами ранее метаанализ позволил выделить 8 микроРНК (miR-1246, miR-145, miR-196b, miR-34a, miR-20a, miR-21, miR-375, miR-96), обладающих потенциальной значимостью в прогрессировании предраковых заболеваний в РШМ.

Цель исследования — анализ особенностей экспрессии miR-1246, miR-145, miR-196b, miR-34a, miR-20a, miR-21, miR-375, miR-96 и их генов-мишеней, а также генов, ассоциированных с ними в общих сигнальных путях, в тканях шейки матки у пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией 1–3 степеней тяжести и карциномой *in situ*.

Материалы и методы. Для оценки уровня экспрессии микроРНК и матричной РНК использовали метод количественной ПЦР в режиме реального времени. Анализ данных проводили на языке программирования Python с использованием библиотеки SciPy. Поиск генов-мишеней осуществляли с помощью алгоритма TarPmiR и анализировали избыточную представленность микроРНК в сигнальных путях (Over-Representation Analysis). Для выявления генов, ассоциированных с генами-мишенями в общих сигнальных путях, использовали алгоритмы GIAN (Genome-scale Integrated Analysis of gene Networks in Tissues) и «сетевая интеграция с несколькими ассоциациями».

Результаты. Для микроРНК miR-145, miR-196b, miR-34a, miR-20a, miR-21, miR-375 и miR-96 обнаружено снижение экспрессии в подгруппе пациенток с карциномой *in situ*, при этом для 4 микроРНК (miR-145, miR-34a, miR-20a и miR-375) выявлено увеличение уровня экспрессии при цервикальной интраэпителиальной неоплазии 1 и 2 степеней тяжести.

Выводы. Обнаруженные особенности экспрессии микроРНК в подгруппах пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией 1–3 степеней тяжести и карциномой *in situ* были ассоциированы с экспрессией их генов-мишеней (*CDKN2A*, *MKI67*, *TOP2A* и *CD82*), а также генов, связанных с ними в общих сигнальных путях (*PGK1*, *THBS4 (TSP4)* и *ECM1*)

Определение соматических мутаций в гене *BRAF* методом пиросеквенирования

О.П. Дрибноходова¹, А.Ю. Бухарина¹, А.С. Есьман¹,
Е.А. Дунаева¹, Г.В. Лешкина¹, Э.В. Борисова¹,
Я.А. Войцеховская¹, В.Н. Хлявич², А.И. Дауд²,
К.О. Мионов¹

¹ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии»
Роспотребнадзора, Москва;

²Иностранное унитарное консультативное предприятие
«МедАрт», Минск, Республика Беларусь

Введение. Выявление соматических мутаций в гене *BRAF* может использоваться в клинике для уточнения диагноза, прогнозирования и выбора терапии. Метод пиросеквенирования позволяет определять любые мутации в изучаемом участке в количественном формате.

Цель исследования — разработка комплекса методик на основе пиросеквенирования для выявления соматических мутаций в гене *BRAF* с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24.

Материалы и методы. Аналитические характеристики определяли на разведениях образцов плазмидной ДНК, включающих участок гена *BRAF* без мутаций или с одной из мутаций V600E, V600R, V600K, V600M, K601E. Апробацию провели на 132 образцах, полученных от 127 пациентов с узловыми образованиями щитовидной железы. Разработан комплекс из трех методик для пиросеквенирования фрагментов гена *BRAF* и алгоритма анализа для поиска мутаций в 592–602 кодонах *BRAF*, дифференцировки мутаций в 600-м кодоне и детекции мутации K601E. Эти методики позволяют выявлять в образцах с высокой концентрацией ДНК 2 % мутаций V600E и V600M, 1 % V600K и V600R, и 3 % K601E. В образцах с низкой концентрацией (<500 копий/ПЦР) предел обнаружения составил 5 % мутантного аллеля для всех мутаций.

Результаты. При тестировании биологического материала было обнаружено 53 образца с мутацией V600E, полученных от 51 пациента. Доля мутантного аллеля составляла 4,9–50 %. Из них у 42 пациентов был установлен диагноз папиллярного рака щитовидной железы, у 6 — подозрение на папиллярный рак, у 1 — анапластический рак, у 1 — атипия неясного значения и у 1 диагноз не определен. Из 127 пациентов мутации были выявлены у 42 из 53 пациентов с диагнозом папиллярного рака, у 6 из 13 пациентов с подозрением на рак, у 1 из 10 пациентов с атипией неясного значения, у единственного пациента с анапластическим раком и у 1 из 7 пациентов без установленного диагноза. У 6 пациентов с доброкачественными образованиями, единственного пациента с NIFTP и 37 с фолликулярными опухолями мутации обнаружены не были.

Выводы. Данный подход позволяет определять все клинически значимые мутации в 592–601-м кодонах

гена *BRAF*, обеспечивает достаточную чувствительность для выявления частых мутаций в 600-м и 601-м кодонах и дает возможность однозначно дифференцировать все тестируемые мутации даже в образцах с долей мутантного аллеля менее 10 %. Подобный принцип тестирования может быть применен для поиска редких мутаций в гене *BRAF* и определения мутаций в других онкогенах.

Ключевые компоненты PI3K/Akt сигнального каскада: связь с клиническим течением эстроген-положительного рака молочной железы

Т.А. Дронова¹, Н.Н. Бабышкина¹, Е.М. Слонимская²,
Н.В. Чердынцева¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный
исследовательский медицинский центр
Российской академии наук»;

²ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный
университет»

Введение. Каскад PI3K/Akt является универсальным механизмом регуляции пролиферативных процессов опухолевых клеток, гиперактивация которого ассоциирована с неблагоприятным течением и прогнозом многих злокачественных новообразований.

Цель исследования — проанализировать полиморфные локусы (SNPs), экспрессию мРНК и содержание белковых продуктов генов *Akt1*, *PTEN*, *CCND1* в сопоставлении с клинико-морфологическими параметрами заболевания у пациенток с эстроген-положительным РМЖ.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужил 141 образец опухолевой и нормальной прилежащей тканей. Генотипирование SNPs *Akt1* (rs1130233), *PTEN* (rs11202592) и *CCND1* (rs678653), а также их экспрессионный профиль изучены при помощи ПЦР в режиме реального времени. Уровень белковой продукции pAKT, PTEN и циклина D1 оценен методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Обнаружена тенденция к преобладанию дикого генотипа CC гена *PTEN* (rs11202592) среди пациенток старше 50 лет ($p = 0,088$). Высокий уровень транскрипционной активности генов *Akt1* и *PTEN* ассоциирован с малым размером опухолевого узла (T1) ($p = 0,017$ и $p = 0,056$ соответственно). Низкий уровень экспрессии гена *CCND1* чаще встречался среди больных с размером опухоли до 2 см (T1) ($p = 0,059$). Среди пациенток младше 50 лет отмечено значимое увеличение уровня продукции pAkt ($p = 0,001$). Установлен низкий уровень экспрессии белка PTEN у больных репродуктивного возраста ($p = 0,043$).

Выводы. Выявлены особенности профиля ключевых компонентов PI3K/Akt сигнального пути, которые

могут характеризовать клиническое течение эстроген-положительного РМЖ. Так, в формировании благоприятного, с учетом клинических характеристик, эстроген-положительного подтипа РМЖ следует отнести дикий генотип гена *PTEN* (rs11202592), высокий уровень экспрессии генов *Akt1* и *PTEN* и низкий уровень транскрипционной активности *CCND1*.

Разработка метода идентификации экспрессируемых соматических мутаций в плазме крови пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой

Л.М. Дьяков¹, П.А. Хесина^{1,2}, О.М. Кривцова¹,
Д.А. Шавочкина¹, И.Ф. Кустова¹, А.Д. Горев¹,
Н.Е. Кудашкин¹, Ю.И. Патютко¹, Н.Л. Лазаревич^{1,2}

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

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

Введение. Гепатоцеллюлярная карцинома — самая распространенная форма первичного рака печени, для которой характерны высокая межопухолевая гетерогенность вызывающих ее генетических нарушений и высокий уровень рецидивирования. Одним из наиболее перспективных направлений для мониторинга рецидивирования опухоли после резекции представляются выявление опухоль-специфических генетических изменений и разработка способов их выявления в циркулирующей ДНК (цДНК) с помощью методов «жидкостной биопсии». Мы предполагаем, что опухоль-специфические «драйверные» соматические мутации с высокой функциональной значимостью предпочтительно находятся в кодирующих участках генов, активно экспрессируемых в опухоли, и могут быть выявлены при транскриптомном секвенировании.

Цель работы — разработка метода выявления в плазме крови пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой фрагментов опухолевой ДНК, содержащих экспрессируемые соматические мутации, выявленные при транскриптомном анализе.

Материалы и методы. С использованием данных транскриптомного секвенирования 40 случаев гепатоцеллюлярной карциномы нами был разработан метод выявления и отобраны специфические для конкретных опухолей экспрессируемые однонуклеотидные мутации. Для большинства случаев их число составило 10–20 вариантов.

Результаты. На примере мутации в гене *TLN* проведено сравнение чувствительности различных методов детекции однонуклеотидных замен и возможности их количественной оценки. Метод ПЦР в реальном времени с TaqMan зондом и аллель-специфическими праймерами позволяет уверенно детектировать

мутантный вариант в небольшом количестве (2 нг) опухолевой или цДНК, но не в нормальной ткани или цДНК других пациентов; однако не может быть использован для количественной оценки доли мутантной ДНК. Эта проблема может быть решена методом капельной цифровой ПЦР с теми же праймерами и зондами. Глубокое секвенирование ампликонов, содержащих таргетные мутации, на платформе Illumina MiSeq позволило провести мультиплексный анализ полного спектра выявленных вариантов, а также их количественную оценку. Доля мутантных вариантов в опухоли составила 40,2–60,7 %, в цДНК — 4,3–29,6 %.

Работа частично поддержана грантом РФФИ 18-29-09164-мк.

Вirus папилломы человека при раке шейки матки *in situ*

Е.А. Здрева¹, М.К. Ибрагимова^{1,2}

¹Институт биологии, экологии, почвоведения сельского и лесного хозяйства ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»;

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Введение. Злокачественные опухоли репродуктивной системы являются наиболее частыми в структуре онкологической заболеваемости женщин, среди которых РШМ — одна из самых распространенных форм новообразований. Выявление РШМ в стадии *in situ* не входит в статистику заболеваемости РШМ и составляет приблизительно 17303 случая в год. Рак шейки матки *in situ* — это нулевая стадия, при которой злокачественные изменения локализуются в эпителии шейки матки, не затрагивая базальную мембрану. Пусковым фактором возникновения РШМ более чем в 90 % случаев является инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР). Результатом своевременного выявления и лечения РШМ *in situ* является предотвращение дальнейшего прогрессирования злокачественного процесса.

Цель исследования — выявление, типирование и определение вирусной нагрузки папилломавирусной инфекции высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) у пациенток с диагнозом РШМ *in situ*.

Материалы и методы. В исследование включено 27 пациенток в возрасте 24–79 лет с диагнозом РШМ *in situ*. Диагноз верифицирован гистологически, опухоли были охарактеризованы в соответствии с классификацией FIGO. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки. Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ проводили методом ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (Rotor-Gene 6000 «Corbett Research», Австралия) с использованием комплектов реагентов

фирмы «Amplisens®» (Москва, Россия). Значение вирусной нагрузки рассчитывалось в геномных эквивалентах ДНК ВПЧ/10⁵ клеток.

Результаты. Наличие ВПЧ-положительного рака шейки матки *in situ*, ассоциированного с одним или одновременно с несколькими типами ВПЧ, были обнаружены у 17 (63,0 %) пациенток, у 10 (37,0 %) больных ВПЧ в опухоли не был выявлен. Стоит отметить, что в ранее проведенных исследованиях частота ВПЧ-положительных пациенток с РШМ I–IV стадий составила 72,4 %, у 27,6 % пациенток ВПЧ в опухоли выявлен не был. Генотипирование вирус-положительных образцов показало превалирование ВПЧ 16 типа (76,5 % случаев), что согласуется с литературными данными и полученными ранее результатами (67,8 %). На втором месте по частоте встречаемости находятся ВПЧ 33 и 56 типов (по 17,7 %). Согласно предыдущим исследованиям, в группе больных РШМ I–IV стадий 2-е место занимал только ВПЧ 33 (22,6 %). Для пациенток с РШМ *in situ* в 5,9 % случаев детектировали ВПЧ 39, 45, 51, 52 типов. В результате исследования распространенности моно- и микстинфицирования было выявлено преобладание моноинфицирования (70,5 %), а частота встречаемости двух и более генотипов вируса одновременно составила 29,5 %. При определении вирусной нагрузки (концентрации ДНК вируса) в исследуемых образцах было показано, что количество пациенток с показателем низкой вирусной нагрузки (3lg ДНК ВПЧ/10⁵ клеток) составило 70,6 %. Согласно предыдущим результатам, в группе женщин с РШМ I–IV стадий ранее был выявлен показатель малозначимой вирусной нагрузки (22,6 %), в то время как показатель клинически значимой вирусной нагрузки составил 77,4 %.

Выводы. Проведены выявление, типирование и определение вирусной нагрузки ВПЧ ВКР у пациенток с диагнозом РШМ *in situ*. Показаны высокий уровень инфицированности ВПЧ ВКР в исследуемой выборке пациенток, наличие высокого уровня клинически значимой нагрузки и превалирование ВПЧ 16 генотипа.

Уровни остеопонтина и протейна, связанного с химиорезистентностью (ABCG2), в сыворотке крови у пациенток с инвазивным раком молочной железы

Е.Ю. Зубарева¹, М.А. Сеньчукова^{1,2}, Е.В. Вирич¹,
О.В. Шидловская¹, Л.Р. Давлетьярова¹, М.Р. Зубарев¹

¹ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер»;

²ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет»

Введение. В настоящее время активно исследуется прогностическая и предиктивная значимость различных молекулярных маркеров при РМЖ. К перспективным маркерам относятся остеопонтин (OPN) и АТР-связывающий кассетный транспортер G2 (ABCG2). Однако их связь с клинико-морфологическими характеристиками РМЖ изучена недостаточно.

Цель исследования — оценить связь сывороточных уровней OPN и ABCG2 с клинико-морфологическими характеристиками РМЖ.

Материалы и методы. В проспективное пилотное исследование включены 69 пациенток с впервые выявленным инвазивным РМЖ. Уровни OPN и ABCG2 в сыворотке крови исследовали с помощью ИФА. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы Statistica 12.

Результаты. Установлено, что уровень ABCG2 коррелировал с клинической формой РМЖ ($p = 0,01$), стадией заболевания ($p = 0,004$) и наличием метастазов в регионарных лимфоузлах ($p = 0,02$). Высокий уровень ABCG2 (1,2 нг/мл и выше, 65 перцентиль) чаще наблюдался при диффузной форме РМЖ, чем при узловой (50 и 29 % соответственно, $p = 0,13$). Также высокий уровень ABCG2 чаще наблюдался при наличии метастазов в регионарные лимфоузлы, чем при их отсутствии (53 и 28 % соответственно; $p = 0,06$). При локальных формах РМЖ высокий уровень ABCG2 встречался реже (26,1, 50,0 и 75,0 % соответственно при I–IIa, IIb–IIIc и IV стадиях; $p = 0,1$). Достоверных корреляций уровня OPN с клинико-морфологическими характеристиками РМЖ не выявлено. Однако уровень OPN был выше у пациенток старше 55 лет ($3,5 \pm 2,8$, $2,0 \pm 2,4$ и $1,25 \pm 1,4$ нг/мл соответственно у пациенток старше 55 лет, 35–55 лет и моложе 35 лет; $p = 0,12$). Повышенный уровень OPN (2,4 нг/мл и выше, 65 перцентиль) чаще наблюдался при наличии ЛВИ, чем при ее отсутствии (46,1 и 25,0 % соответственно; $p = 0,17$) и реже — при наличии внутритротокового компонента (12,5 и 36,4 % соответственно; $p = 0,16$). Высокий уровень OPN реже наблюдался при высоком уровне ABCG2, однако различия в частоте статистически недостоверны ($p = 0,17$).

Выводы. Полагаем, что дальнейшие исследования прогностической и предиктивной значимости OPN и ABCG2 при РМЖ могут представлять несомненный интерес.

Связь уровней маркеров HIF-1α и TGF-β1 в сыворотке крови с выраженностью экспрессии PD-L1 и Snail в ткани опухоли при раке молочной железы

Е.Ю. Зубарева¹, М.А. Сеньчукова^{1,2}, О.В. Шидловская²,
Е.В. Вирич², Н.В. Зайцев², М.А. Осипова², М.Р. Зубарев²,
Д.Н. Филатова², Л.Р. Давлетьярова²

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный
медицинский университет»;

²ГБУЗ «Оренбургский областной онкологический диспансер»

Введение. Связь сывороточных уровней маркеров HIF-1α и TGF-β1 с выраженностью экспрессии PD-L1 и Snail в ткани опухоли при РМЖ изучена недостаточно.

Цель исследования — оценить корреляции уровней HIF-1α и TGF-β1 в сыворотке крови с выраженностью экспрессии PD-L1 и Snail в паренхиме и строме опухоли.

Материалы и методы. В пилотное исследование включены 97 пациенток с впервые выявленным инвазивным РМЖ. Уровни HIF-1α и TGF-β1 в сыворотке крови исследованы с помощью ИФА; выраженность экспрессии PD-L1 и Snail в паренхиме и строме опухоли — методом иммуногистохимии. Коэффициент экспрессии маркеров вычисляли в 5 полях как отношение: доля клеток без экспрессии × 1 + доля клеток со слабой экспрессией × 2 + доля клеток с выраженной экспрессией × 3/5. Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы Statistica 12.

Результаты. Установлено, что повышенный уровень TGF-β1 достоверно чаще наблюдался при люминальном А и Her2-позитивном РМЖ (66,7, 32,6, 23,1, 100 и 30 % случаев, соответственно при люминальном А, люминальном В HER2-негативном, люминальном В Her2-позитивном, Her2-позитивном и тройном негативном подтипе; $p = 0,001$), а пониженные при IV стадии (49,0, 52,0 и 14,0 % случаев соответственно при I—IIa, IIb—IIIc и IV стадиях; $p = 0,045$). При низком уровне TGF-β1 достоверно чаще, чем при повышенном, наблюдался лечебный патоморфоз III—IV степени метастазов в регионарных лимфоузлах (в 42,9 и 0 % случаев соответственно; $p = 0,02$). Установлено, что при низком уровне TGF-β1 коэффициент экспрессии PD-L1 был достоверно выше, чем при высоком (в паренхиме $2,0 \pm 0,5$ и $1,5 \pm 0,5$ соответственно; $p = 0,03$, в строме $1,5 \pm 0,3$ и $1,2 \pm 0,2$ соответственно; $p = 0,01$). Уровень HIF-1α был достоверно выше при IV стадии заболевания ($0,07 \pm 0,08$,

$0,06 \pm 0,005$ и $0,119 \pm 0,09$ нг/мл соответственно при I—IIa, IIb—IIIc и IV стадиях; $p = 0,04$) и значимо выше — при наличии микрокальцинатов на маммограммах ($0,077 \pm 0,07$ и $0,056 \pm 0,008$ нг/мл соответственно при их отсутствии и наличии; $p = 0,07$). При повышенном уровне HIF-1α коэффициент экспрессии Snail был достоверно выше, чем при пороговом значении маркера (в паренхиме $2,5 \pm 0,3$ и $1,8 \pm 0,3$ соответственно; $p = 0,01$, в строме $1,9 \pm 0,3$ и $1,4 \pm 0,2$ соответственно; $p = 0,008$).

Выводы. Определение уровней TGF-β1 и HIF-1α в сыворотке крови может быть использовано для оценки экспрессии PD-L1 и Snail в паренхиме и строме опухоли. Необходимы дальнейшие исследования для определения их прогностической и предиктивной значимости.

Мутация гена RNF43 у пациентки с первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой

И.А. Камаева, И.Б. Лысенко, И.А. Новикова,
Н.Н. Тимошкина

ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Цель исследования — обнаружение клинически значимой мутации для пациента с первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомой путем проведения высокопроизводительного секвенирования следующего поколения (NGS).

Материалы и методы. В исследование включены данные 20 пациентов с установленным диагнозом первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы различных стадий, получающих лечение на базе онкогематологического отделения ФГБУ «НМИЦ онкологии» в период с 2013 по 2021 г. Было проведено NGS-секвенирование нового поколения при помощи панели AVENIO Tumor Expanded Panel (Roche, США), включающей 77 генов. Материалом для исследования послужили парафиновые блоки пациентов. Выделение геномной ДНК из FFPE блоков производилось с использованием панели Gene Read DNA FFPE Kit (Qiagen, США) согласно официальному протоколу. Концентрацию ДНК измеряли флуориметрически на Qubit 2.0 (Life Technologies, USA). Обработка данных производилась при помощи программного обеспечения AVENIO Oncology Analysis Software для поиска клинически значимых мутаций.

Результаты. Среди отобранных пациентов проведен анализ генетического материала на наличие клинически значимых мутаций среди известных баз данных: COSMIC: v83, TCGA 9.0, ExAC:1.0, dbSNP:150, 1000 Genomes: phase_3_v5b, SnpEff:4.2. Выявлен миссенс-вариант, а также синонимичный вариант мутации в гене *RNF43* у пациентки с первично-рефрактерным течением первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы на фоне проводимой многокурсовой химиотерапии. Согласно литературным данным, мутации

в данном гене могут играть определенную роль в канцерогенезе различных типов солидных опухолей, например мутации в данном гене широко описаны при раке толстой кишки, поджелудочной железы. Обнаружена активирующая драйверная мутация в 9-м экзоне (rs531889929). Частота аллеля составила 53,71 %. Обнаружен синонимичный вариант мутации гена в 9-м экзоне (с. 1233С >Т). Частота аллеля составила 53,71 %. В базе данных ClinVar данная мутация не описана. Упоминание о данной мутации в публикациях также отсутствует.

Выводы. Высокопроизводительное секвенирование нового поколения выявило клинически значимые мутации в гене *RNF43*, терапевтический потенциал которых требует дальнейшего изучения.

Применение бесклеточных белоксинтезирующих систем для эпитопного картирования трансмембранных опухоль-ассоциированных антигенов

М.С. Карбышев¹, К.В. Смирнова^{1,2}, Л.Н. Мамедова¹,

К.С. Карбышев³, К.Е. Абдиева¹, А.М. Власов⁴

¹ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

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

³ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва;

⁴ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Введение. Совершенствование арсенала методических подходов к иммунодиагностике злокачественных новообразований предопределяет необходимость все более детальной характеристики иммунохимических реагентов, используемых в практике. Отсутствие исчерпывающих данных, характеризующих антигенные детерминанты, специфически распознаваемые тем или иным коммерчески доступным моноклональным антителом (мкАт), зачастую приводит к неоднозначным результатам исследований, особенно в случае изучения трансмембранных антигенов. Таким образом, все более актуальной становится разработка простых и эффективных комбинированных методов, позволяющих с высокой точностью локализовать и охарактеризовать как линейные, так и конформационные эпитопы.

Цель исследования — оценить возможности применения бесклеточной белоксинтезирующей системы для характеристики эпитопов трансмембранных антигенов (на примере белков TMEM41, EphA2 и FZD4).

Материалы и методы. Сайт-направленный мутагенез (последовательный аланиновый скрининг)

для линейных ДНК-матриц, используемых в бесклеточной белоксинтезирующей системе, осуществляли с использованием набора QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent), выделение и очистку ДНК ампликонов выполняли с QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Эксперименты по бесклеточному синтезу исследуемых антигенов выполняли с использованием системы TNT T7 Quick for PCR DNA (Promega). Выделение и очистку исследуемых антигенов проводили с Ni-NTA HisSorb Plates (Qiagen) в присутствии 1 % MNG-OG (Anatrace). Анализ связывания полученных в бесклеточной белоксинтезирующей системе антигенов с мкАт, проводили с применением метода поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore T200 (GE Healthcare). В качестве аналитов использовались препараты коммерчески доступных аффинно очищенных мкАт: 10A7 (для TMEM41), MAB3035 (EphA2) и MAB194–050 (для FZD4).

Результаты. Все исследуемые трансмембранные антигены были получены в эукариотической бесклеточной белоксинтезирующей системе с высокими выходами (0,35–0,47 мг/мл реакционной смеси). Экспериментально установлено, что эпитоп, распознаваемый антителом 10A7, является линейным, MAB3035 — линейным, MAB194–050 — конформационным.

Выводы. Применение бесклеточных белоксинтезирующих систем для расширенной характеристики взаимодействий «антитело-антиген» является перспективным инструментом совершенствования иммунохимической диагностики.

Оценка частоты встречаемости полиморфизма аллели HLA-A*, B*, C* у больных саркомами

А.Е. Карпов, Т.Л. Нехаева, И.Н. Жук, А.Б. Данилова, Н.А. Ефремова

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

Введение. Наличие аллели HLA A:2 связано с высокой частотой развития РМЖ и синовиальной саркомы. Однако для других сарком мягких тканей и остеогенных сарком такая связь до сих пор не установлена.

Цель работы — оценка частоты встречаемости полиморфизма аллели HLA-A*, -B*, -C* у больных саркомой мягких тканей и остеогенными саркомами.

Материалы и методы. В исследование включены 96 больных (36 мужчин, 60 женщин) в возрасте 18–67 лет с диагнозом саркома мягких тканей и остеогенная саркома, получавших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова в период с 2003 по 2020 г. Анализ экспрессии антигенов HLA I класса проводили, используя циклерплатную систему Protrans HLA-A*, -B*, -C* (Protrans, Германия). Полученные результаты сравнивали с данными регистра HLA-A*, -B*, -C* (Allele Frequency

Net Database, AFND) у 100 здоровых человек того же пола и возраста, проживающих в данном регионе.

Результаты. Всего было идентифицировано 50 вариантов аллелей HLA-A*, -B*, -C*. Сравнительное исследование показало, что частота встречаемости аллелей HLA-A*:02 (30,6 vs 29,5 %), HLA-A*:03 (17,2 vs 15 %), HLA-A*:25 (7,8 vs 5 %), HLA-A*:26 (5,6 vs 3,5 %), HLA-B*:08 (6,9 vs 4,5 %), HLA-B*:15 (9 vs 7,5 %), HLA-B*:18 (9,6 vs 6,5 %), HLA-B*:27 (5,3 vs 2,5 %), HLA-B*:37 (2,7 vs 1 %), HLA-B*:50 (2,7 vs 0,5 %), HLA-C*:12 (13,6 vs 11,5 %), HLA-C*:14 (2,5 vs 1 %), HLA-C*:16 (3 vs 1,5 %) была выше у пациентов с саркомой мягких тканей и остеогенной саркомой, чем у здоровых доноров ($p \leq 0,01$).

Выводы. Обнаруженные особенности полиморфизма аллелей HLA-A*, -B*, -C* у больных саркомой мягких тканей и остеогенной саркомой указывают на необходимость дальнейшего изучения выявленных различий в контексте патогенеза и прогноза заболевания.

Прогностическое значение локального уровня остеопонтина у больных раком шейки матки

Е. В. Каюкова, В. А. Мудров

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России

Введение. Рак шейки матки (РШМ) — одна из самых частых опухолей среди женщин во всем мире. В настоящее время отсутствуют прогностические критерии неблагоприятного исхода РШМ. Остеопонтин (OPN) является провоспалительным белком, способствующим метастатическому каскаду при прогрессировании некоторых онкологических заболеваний.

Цель исследования — установить прогностическое значение локального уровня OPN у первичных больных РШМ.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ ранее полученных нами результатов по изучению локального уровня OPN у первичных больных РШМ I–IV стадий методом проточной цитометрии. Рандомизация осуществлялась в две группы спустя 3 года после динамического наблюдения за больными: 1-я группа — пациентки без признаков прогрессирования заболевания ($n = 42$, средний возраст $37,0 \pm 9,8$ лет), 2-я — пациентки с неблагоприятным исходом РШМ ($n = 10$, средний возраст $40,0 \pm 5,2$ лет). Анализ данных проводился с применением критерия Манна–Уитни, прогностическая значимость оценивалась с помощью метода Каплана–Мейера.

Результаты. У больных РШМ с неблагоприятным исходом локальный уровень OPN был в 2,5 раза выше ($p = 0,016$), что отражалось на худшей безрецидивной (28,0 против 34,4 мес) и общей выживаемости (30,0 против 34,7 мес). Полученные данные о прогностическом

значении OPN в сыворотке крови у больных РШМ согласуются с нашими результатами исследования о максимально высоком содержании OPN в сыворотке крови у больных с генерализованным РШМ, а также при РШМ с G3 дифференцировкой первичной опухоли. Согласно данным литературы высокий уровень OPN коррелирует с факторами прогрессирования рака шейки матки (размер опухоли более 4 см, стадия опухолевого процесса, низкая степень дифференцировки) и также рассматривается как неблагоприятный прогностический фактор.

Выводы. Высокий локальный уровень OPN у больных РШМ является неблагоприятным прогностическим фактором возникновения прогрессирования.

Возможна ли дифференциальная диагностика преинвазивного и микроинвазивного рака шейки матки

П. И. Ковчур, О. В. Курмышкина, Л. В. Щеголева, Т. О. Волкова

ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

Введение. Одной из основных задач современной онкогинекологии является ранняя дифференциальная диагностика преинвазивного и микроинвазивного РШМ, основанная на молекулярно-генетических исследованиях.

Цель работы — предложить способ для дифференциальной диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии III степени и микроинвазивного рака шейки матки, оценить результаты проведенного комплексного лечения.

Материалы и методы. Проведено иммунологическое обследование у 65 женщин: 1 группа ($n = 35$) — с цервикальной интраэпителиальной неоплазией III степени; 2 группа ($n = 30$) — с микроинвазивным РШМ со 100 % ДНК ВПЧ. Иммунологические показатели сравнивали с аналогичными показателями здоровых женщин (контроль), выполненных на проточном цитометре MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Германия). Оценивалась экспрессия PD1, TIM3 и LAG3 маркеров в общей популяции CD3+CD8+ Т-лимфоцитов, характеризующих дисфункциональные Т-клетки при развитии РШМ.

Результаты. При иммунологическом исследовании определялось количество клеток с фенотипом CD3+CD8+PD1+TIM3+ и CD3+CD8+PD1+LAG3+ в общей популяции CD3+CD8+ Т-лимфоцитов. При сравнении результатов гистологического исследования и уровня экспрессии PD1, TIM3 и LAG3 маркеров в общей популяции CD3+CD8+ Т-лимфоцитов выявлено, что при цервикальной интраэпителиальной

неоплазии III степени количество клеток с фенотипом CD3+CD8+PD1+TIM3+ и CD3+CD8+PD1+LAG3+ в каждом из вариантов не превышает 5 % от общей популяции CD3+CD8+ Т-лимфоцитов. Напротив, при анализе пациентов с микроинвазивным РШМ количество таких клеток обнаружено более 5 % ($p < 0,05$). У всех пациенток ($n = 65$) проведено хирургическое лечение радиоволновым генератором «Фотек EA141» в объеме радиоволновой конизации шейки матки и выскабливания оставшейся части цервикального канала. Дополнительно в связи с обширностью поражения шейки матки и влагалища проводилось лазерное лечение отечественными хирургическими аппаратами «Ланцет-2» и «Аллод-01» по стандартной методике.

Выводы. Предложен новый точный способ дифференциальной диагностики цервикальной интраэпителиальной неоплазии III степени и микроинвазивного РШМ, что способствует точному выбору тактики лечения пациенток с сохранением репродуктивной функции.

Разработка нового молекулярно-генетического теста для выявления рака шейки матки у жительниц Якутии

И.В. Кононова¹, В.А. Алексеев¹, С.Н. Мамаева²,
А.А. Федотова², Н.А. Васильева², П.В. Никифоров³

¹ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных
медицинских проблем»;

²ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет
имени М.К. Аммосова», Якутск;

³ГБУ РС (Я) «Якутский республиканский
онкологический диспансер»

Введение. В дополнение к скрининговым тестам необходимы другие, также доступные по стоимости тесты на РШМ, которые улучшат его раннюю выявляемость. В основу нашего теста легли частые случаи обнаружения в крови пациенток с РШМ двух видов ДНК: внеклеточных везикул и циркулирующей, в которых представлена большая часть генома раковых клеток.

Цель работы — создать простой в исполнении и экономически доступный молекулярно-генетический тест для диагностики РШМ на основе одновременного обнаружения в крови человеческих и вирусных (ВПЧ) сегментов двухцепочечной ДНК (дцДНК), на старте работ подобрать биоматериал из фракций крови с простой пробоподготовкой, выбрать праймеры на основе доступности их синтеза и оптимальной цены.

Материалы и методы. Методом ПЦР-РВ исследована венозная кровь с ЭДТА-К2 у 5 пациенток, жительниц Якутии, с впервые выявленным РШМ. На момент забора крови к ним не был применен ни один из видов лечения данного заболевания. Из крови

подготовили 2 вида биоматериала — плазму и эритроцитарную взвесь, отмытые и разбавленные фосфатным буфером эритроциты. Для обнаружения сегментов дцДНК человека использовали праймер PC03/04, детектирующий сегмент, кодирующий β -глобин, для сегментов, кодирующих белки ВПЧ — L1 и E6/E7 — праймеры GP5+/6+ и MY09/11 соответственно. ПЦР проведена на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad) по протоколу 5X реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR+LowROX (5xMM).

Результаты. В плазме одновременно обнаружены GP5+/6+ и PC03/04 у 3 пациенток (пац. 1,2,3), у одной пациентки (пац. 4) получен негативный результат на оба сегмента, еще у одной (пац. 5) — на GP5+/6+ сомнительный, при негативном на PC03/04. В эритроцитарной взвеси обнаружены GP5+/6+ и PC03/04 у 4 пациенток (пац. 1, 3, 4, 5), у пац. 2 — негативный результат на наличие обоих сегментов. Как в плазме, так и в эритроцитарной взвеси обнаружены GP5+/6+ и PC03/04 в 40 % случаев (пац. 1 и 3). Или в плазме, или в эритроцитарной взвеси одновременно обнаружены GP5+/6+ и PC03/04 в 100 % случаев. Сегмент MY09/11 не был обнаружен ни в одном случае.

Выводы. У жительниц Якутии плазма и эритроцитарная взвесь могут служить материалом для теста по одновременному обнаружению сегментов человеческой и вирусной (ВПЧ) дцДНК — PC03/04 и GP5+/6+. Полученные результаты, вероятно, лягут в основу нового, экономически доступного молекулярно-генетического теста в дополнение к скринингу РШМ. Результаты свидетельствуют о необходимости проведения дальнейшей научной работы.

Растворимая форма контрольной точки иммунитета VISTA у больных саркомами костей

Ю.Б. Кузьмин, Е.А. Короткова, О.В. Ковалева,
И.Н. Кузнецов, Н.Ю. Соколов, Н.Е. Кушлинский

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

Введение. VISTA (V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation) — новая отрицательная иммунная контрольная точка, гомологичная запрограммированному лиганду клеточной смерти 1 (PD-L1) и принадлежащая семейству B7. Подобно хорошо изученным контрольным белкам PD-1, PD-L1 и CTLA-4, VISTA функционирует как ингибитор активации и пролиферации Т-клеток для поддержания толерантности и ограничения иммунопатологии.

Цель исследования — анализ уровней растворимой формы VISTA (sVISTA) в сыворотке крови больных первичными опухолями костей с учетом основных клинико-морфологических характеристик заболевания.

Материалы и методы. Представлены данные сравнительного ИФА содержания sVISTA в сыворотке крови 30 здоровых доноров (группа контроля), 79 больных первичными злокачественными (остеосаркома — 30, хондросаркома — 31, хордома — 14) и 14 пограничными (гигантоклеточная опухоль) новообразованиями костей. Концентрацию sVISTA определяли в сыворотке крови, полученной по стандартной методике с использованием ЭДТА до начала специфического лечения, с помощью набора реактивов для прямого ИФА Human VISTA/B7-H5/PD-1H ELISA Kit (RayBiotech, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия).

Результаты. В общей группе больных злокачественными новообразованиями костей медиана содержания sVISTA статистически значимо ниже по сравнению с контролем ($p < 0,05$). У больных опухолями костей и здоровых доноров старше 18 лет отмечено снижение с возрастом уровней sVISTA. Не выявлено различий в уровнях sVISTA между больными косте- (остеосаркома) и хрящобразующими (хондросаркома) опухолями костей и здоровыми донорами. Только у больных хордомой кости уровни sVISTA были статистически значимо ниже, чем в контроле ($p = 0,01$). В группах больных хондро- и остеосаркомой кости не отмечено значимых ассоциаций между содержанием sVISTA в сыворотке крови и основными клинико-морфологическими характеристиками заболевания. У больных остеосаркомой не выявлено связи между уровнями sVISTA и показателями общей выживаемости, тогда как у пациентов с хондросаркомой кости отмечена тенденция к благоприятному прогнозу при высоком содержании маркера в сыворотке крови.

Выводы. В общей группе больных злокачественными новообразованиями костей медиана содержания sVISTA статистически значимо ниже по сравнению с контролем ($p < 0,05$). У больных опухолями костей и здоровых доноров отмечено снижение с возрастом уровней sVISTA. У больных хордомой кости уровни sVISTA были статистически значимо ниже, чем в контроле ($p = 0,01$). Обсуждается возможность анализа экспрессии VISTA как в локальной опухоли, так и системно в сыворотке крови для анализа их связи с основными клиническими и морфологическими признаками заболевания и, возможно, с прогнозом.

Зонулин – биомаркер нарушения проницаемости интестинального барьера у больных воспалительными процессами и онкологическими новообразованиями толстой кишки

Н.Е. Кушлинский¹, Н.Н. Зыбина², П.В. Царапаев¹,
В.К. Боженко³, Е.А. Короткова¹, З.З. Мамедли¹,
И.С. Стилиди¹

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

²ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной
медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России,
Санкт-Петербург;

³ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

Введение. Зонулин принадлежит к семейству белков, обеспечивающих плотность межклеточных взаимодействий, что имеет существенное значение в организации барьерной функции в различных органах и тканях. Выход зонулина в просвет кишечника и кровь рассматривают как признак увеличения проницаемости интестинального барьера при воспалительных заболеваниях толстой кишки, сепсисе и, возможно, у больных колоректальным раком, а также при осложнениях после химиотерапии в онкологии.

Цель исследования — сравнительный анализ уровня зонулина в сыворотке крови здоровых доноров, больных воспалительными заболеваниями, доброкачественными и злокачественными опухолями толстой кишки.

Материалы и методы. Обследовано 138 первичных пациентов с заболеваниями толстой кишки в возрасте 25–78 лет. Из них у 15 выявлены доброкачественные новообразования толстой кишки, у 84 — колоректальный рак, у 39 — воспалительные заболевания толстой кишки. Содержание пептидов семейства зонулина в сыворотке крови определяли методом ИФА наборами ZONULIN ELISA (Immundiagnostic AG, Германия). Группу контроля составили 22 практически здоровых донора.

Результаты. В общей группе обследованных пациентов медиана (Me) зонулина в сыворотке крови составила 55,0 нг/мл и была статистически значимо выше по сравнению с контролем (34,8 нг/мл; $p = 0,00008$). Выявленные различия обусловлены в основном за счет высоких значений маркера в группах больных раком (Me = 56,7 [47,7; 69,1] нг/мл) и доброкачественными опухолями (Me = 58,9 [50,5; 74,2] нг/мл) толстой кишки, что было статистически значимо выше не только по сравнению с контрольной группой, но и с больными воспалительными заболеваниями толстой кишки (Me = 48,5 [38,2; 60,7] нг/мл; $p = 0,008$ и $p = 0,041$ соответственно).

Выводы. Полученные результаты указывают на повышенные уровни зонулина у больных воспалительными

заболеваниями, доброкачественными и злокачественными новообразованиями толстой кишки по сравнению со здоровыми донорами (что, вероятно, связано с нарушением проницаемости интестинального барьера у данной категории пациентов) и формируют основу для дальнейших исследований по использованию этого маркера в диагностике онкологических заболеваний толстой кишки.

Полиморфный вариант rs2735343 гена *PTEN* как возможный молекулярно-генетический маркер у пациентов с раком простаты

В.Н. Павлов², М.В. Логинова¹, Е.А. Иванова³,
И.Р. Гилязова^{2,3}

¹ГАОУ «Республиканский клинический онкологический диспансер», Уфа;

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

³Институт биохимии и генетики Уфимского Федерального исследовательского центра РАН

Введение. Рак простаты — гетерогенное и многофакторное заболевание. Применение новых молекулярно-генетических маркеров может иметь большую клиническую ценность в выборе наиболее подходящего метода лечения, принимая во внимание генетические характеристики пациента.

Цель исследования — изучение роли полиморфного локуса rs2735343 гена *PTEN* у пациентов с раком простаты в качестве молекулярно-генетического маркера риска развития заболевания.

Материалы и методы. Нами сформированы две группы пациентов: группа больных с раком простаты ($n = 457$); группа здоровых доноров, по возрасту, этнической принадлежности, территории проживания и численности соответствующая группе больных. ДНК индивидов обеих групп выделялась из периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции. При анализе распределения частот генотипов и аллелей учитывались возраст, стадия по TNM, уровень ПСА, гистологическая градация по шкале Глисона, группы риска, гистопатологические характеристики. Определение генотипов изученного полиморфного локуса rs2735343 гена *PTEN* проводилось с использованием метода аллельной дискриминации и технологии TaqMan.

Результаты. Для жителей Республики Башкортостан сравнительный анализ выборки пациентов с раком простаты и контрольной группы здоровых индивидов показал, что в основной группе с поздними стадиями заболевания статистически значимо чаще встречается генотип rs2735343*CG гена *PTEN* по сравнению с контрольной выборкой. Данный генотип

является рисковым в отношении развития рака простаты тяжелого течения ($p = 0,002$, OR = 2,05, 52 % CI = 1,31–3,22), в то время как генотип rs2735343*GG является протективным в отношении развития заболевания тяжелого течения ($p = 0,004$, OR = 0,51, 52 % CI = 0,32–0,81). Пациенты с раком простаты были разделены по группам риска в соответствии с классификацией D'Amico. У пациентов группы высокого риска рака простаты выявлено носительство генотипа rs2735343*CG гена *PTEN* ($\chi^2 = 6,78$, $p = 0,008$, OR = 3,36, CI = 1,27–4,38), что может быть маркером повышенного риска развития рака простаты, тогда как гомозиготный генотип rs2735343*GG гена *PTEN* ($\chi^2 = 6,9$, $p = 0,006$, OR = 0,41, CI = 0,22–0,77) является протективным маркером в отношении развития рака простаты.

Выводы. Мы провели данное исследование с целью изучения влияния полиморфного варианта rs2735343 гена *PTEN* на риск развития рака простаты в качестве фактора прогноза течения заболевания. Полученные нами данные расширяют знания о генетических основах предрасположенности к раку простаты.

Вирус Эпштейна–Барр у адыгейцев и славян в России: типы вируса, варианты *LMP1* и злокачественные новообразования

А.К. Лубенская, Н.Б. Сениута, И.В. Ботезату,
Т.Е. Душенькина, А.В. Лихтенштейн, В.Э. Гурцевич,
К.В. Смирнова

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

Введение. Структурные особенности вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) имеют определяющее значение для проявления его биологических свойств. На основе различий в последовательностях генов *EBNA2*, *EBNA3A*, — В и С идентифицированы два типа вируса, ВЭБ-1 и ВЭБ-2, обладающие разной способностью трансформировать В-клетки *in vitro*, и, возможно, играющие разную роль в возникновении ВЭБ-ассоциированных опухолей.

С учетом этнического разнообразия народов, населяющих Россию, а также отсутствия данных о штаммах ВЭБ, персистирующих среди здорового населения страны, **целью** данной работы явилось изучение инфицированности здорового населения Республики Адыгея и этнических славян Московской области ВЭБ, а также характеристика его основного онкогена *LMP1* среди персистирующих штаммов вируса.

Материалы и методы. В качестве образцов для исследования были использованы смывы ротоглотки 58 этнических адыгейцев Республики Адыгея и 40 смывов этнических славян Московской области. Эти образцы использовали для выделения и амплификации

ДНК ВЭБ, определения концентрации копий вирусной ДНК на 1 клетку смыва, а также для амплификации *LMP1* ВЭБ с последующим секвенированием полученных образцов гена и определения их белкового варианта (*LMP1*).

Результаты. Проведенные исследования показали высокий уровень инфицированности ВЭБ у представителей обоих этносов. У каждого из них доминировал разный тип вируса: у адыгейцев — ВЭБ-2, а у славян — ВЭБ-1, т. е. типы вируса, обладающие соответственно низким и высоким трансформирующим потенциалом *in vitro*. В отличие от славян с несколькими обнаруженными у них вариантами *LMP1*, у представителей адыгейцев выявлен только один его вариант B95.8 (96,6 %) и подтип B95.8/A (3,4 %), что подтверждается филогенетическим анализом. Несмотря на то, что у представителей Республики Адыгея и Московской области выявлено преобладание ВЭБ с разной способностью трансформировать клетки, статистически значимых различий между заболеваемостью опухолями носоглотки, а также ходжкинскими и неходжкинскими лимфомами в этих популяциях обнаружено не было.

Выводы. Факт обнаружения у двух этносов России доминирования различных типов ВЭБ поднимает вопрос об их этнической или географической привязанности и роли в индукции ВЭБ-ассоциированных опухолей у конкретного этноса. Для решения этого вопроса необходимо проведение дополнительных исследований в других географических регионах России у представителей разных этносов.

Иммунохимический анализ в диагностике и мониторинге гемобластозов

Н.В. Любимова^{1,2}, Ю.С. Тимофеев^{1,2}, М.Г. Томс¹,
Д.Ш. Османов¹

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

²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-
стоматологический университет им. А.И. Евдокимова»
Минздрава России

Введение. Лабораторная диагностика на основе комплекса иммунохимических и иммунотурбидиметрических исследований является одним из важнейших методов обследования больных с гемобластозами (множественная миелома, плазмочитома, неходжкинская лимфома). Используется панель иммунохимических маркеров, включающая электрофоретическое выявление парапротеинов в сыворотке крови и суточной моче и их идентификацию методом иммунофиксации с использованием специфических антисывороток к основным тяжелым и легким цепям иммуноглобулинов. Расширение возможностей диагностики парапротеинемий может быть достигнуто с применением иммунотурбидиметрического метода

определения свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов в сыворотке крови.

Цель исследования — оценка клинической значимости комплекса иммунохимических маркеров сыворотки крови и суточной мочи у больных с моноклональными гаммапатиями.

Материалы и методы. Обследованы 160 больных с гемобластозами (включая 118 больных с множественной миеломой) и 80 практически здоровых людей. Парапротеинемию выявляли методом иммунофиксации (Hydrasys, Sebia), СЛЦ иммуноглобулинов определяли иммунотурбидиметрией Freelite (Binding Site).

Результаты. С наибольшей частотой парапротеинемия выявлялась при множественной миеломе. При этом у 95 больных множественной миеломой была идентифицирована секреция моноклональных интактных иммуноглобулинов с тяжелыми цепями G (72), A (19) и M (4). Уровень парапротеинемии характеризовался выраженной вариабельностью (0,13–95,9 г/л) с максимальной секрецией в группе G-миеломы — 95,9 г/л при медиане 28,6 г/л. Наиболее высокая секреция κ-СЛЦ и λ-СЛЦ была выявлена в группе больных миеломой Бенс-Джонса. В группе больных плазмочитомой моноклональная секреция (G и A) наблюдалась в 34,8 % случаев, при использовании иммуноэлектрофореза и иммунотурбидиметрии диагностическая чувствительность составляла 65,2 %. У пациентов с неходжкинской лимфомой в 63,6 % случаев была выявлена парапротеинемия M- и G-типов. В комплексе с иммунотурбидиметрическим анализом частота выявления моноклональной секреции повышалась до 82 %.

Выводы. Комплексное использование иммуноэлектрофоретического и иммунотурбидиметрического анализов является наиболее эффективным лабораторным подходом в диагностике моноклональной секреции. Сочетание иммуноэлектрофоретического метода с иммунотурбидиметрией позволяет достичь максимальной диагностической чувствительности при моноклональных гаммапатиях.

Использование профилирования уровней микроРНК в качестве инструмента для поиска новых ключевых онкогенов, разработка базы данных для оценки опухолевого роста

А.П. Мазур, М.Н. Зарайский, И.А. Тищенко

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России

Введение. В настоящее время злокачественные глиомы являются одними из самых частых опухолей

центральной нервной системы у взрослых. Они отличаются высокими уровнями рецидивирования и смертности. Выбор оптимальной комплексной терапии для лечения глиом осложняется множеством факторов. В первую очередь, для правильной оценки степени их злокачественности необходимы достоверные маркеры. В настоящее время интенсивно разрабатываются возможности методологических подходов к поиску ранних специфических маркеров развития онкозаболеваний. Одно из направлений такого поиска — изучение диагностического потенциала малых регуляторных молекул — микроРНК.

Цель исследования — изучение возможности использования уровней экспрессии микроРНК для оценки эффективности противоопухолевой терапии; создание массива данных микроРНК с целью ранней диагностики, определения прогноза течения заболевания и оценки проводимого лечения.

Материалы и методы. Биоинформационный анализ микроРНК. Проведено определение двух микроРНК: 21 и 210. МикроРНК 21 полиспецифична, является сильным онкогеном, ее экспрессия увеличивается в большинстве солидных опухолей. Она увеличивает пролиферативную и инвазивную активность опухолевых клеток, является одной из первых микроРНК, определенных как онкомиР (вызывающая несколько типов рака, например глиобластому и астроцитому). МикроРНК 210 контролирует процессы ангиогенеза, нейrogenеза, пролиферацию и дифференцировки опухолевых клеток, а также апоптоза. Тотальная РНК была выделена из плазмы крови пациентов с заболеваниями различной степени тяжести. Изучение уровней экспрессии генов микроРНК проведено методом обратной транскрипции с использованием технологии StemLoop с последующим проведением ПЦР в режиме «реального времени» с помощью микроРНК-специфических праймеров и набора реагентов фирмы «Синтол» на амплификаторе DTLit.

Результаты. Разработаны критерии поиска микроРНК, специфичных для 5 распространенных типов рака (рак молочной железы, легких, желудка, тела матки и предстательной железы). Составлен массив данных, содержащий информацию о 300 микроРНК, их клинической значимости для диагностики и терапии выбранных типов рака. Произведено сравнение с контрольной группой пациентов без опухоли. Была показана статистически достоверная разница в уровнях экспрессии микроРНК 21 и 210, которые изменялись одинаково (повышение уровня экспрессии). Увеличение уровней экспрессии коррелирует с ростом опухолевой массы.

Выводы. Полученные в ходе работы данные могут быть использованы в динамике для оценки эффективности терапии, а также хирургического вмешательства. Дальнейшие исследования будут направлены на расширение панели микроРНК. Анализ различных микроРНК позволит получить информацию о новых ключевых генах

канцерогенеза, которые будут использоваться в качестве контрольных генов патологического процесса и генов для таргетной терапии, в частности при глиоме.

Определение точечных мутаций в промоторе гена *hTERT*

В.Д. Макарова, Э.К. Писарев, Т.С. Зацепин, М.Э. Зверева
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»

Введение. Теломеразная обратная транскриптаза человека (*hTERT*) — белковый компонент ферментативного комплекса, синтезирующего теломерные повторы, количество которых определяет пролиферативный потенциал клетки. В норме в соматических клетках теломеразы в основном не активна. Повышение активности теломеразы обусловлено многочисленными механизмами активации и характерно для злокачественных опухолей человека различного происхождения. Одна из причин активации теломеразы в соматических клетках — возникновение точечных мутаций в промоторе гена *hTERT*, которые приводят к появлению новых сайтов узнавания транскрипционными факторами. Наиболее часто однонуклеотидные замены встречаются в двух «горячих точках»: замены С228Т в позиции -124 и С250Т в позиции -146 относительно стартового кодона АТГ. В настоящее время ПЦР в реальном времени представляет собой один из наиболее распространенных методов определения нуклеиновых кислот. Однако зачастую мутантная ДНК с однонуклеотидной заменой не может быть определена на фоне преобладающей ДНК дикого типа напрямую без выделения в биологических жидкостях.

Цель работы — оценка новых подходов, например, на основе безамплификационных методов, цифровой капельной ПЦР, которые бы позволили преодолеть эти ограничения и достичь более низкого предела обнаружения соматических мутаций.

Материалы и методы. В настоящей работе проведены оценка применимости новых подходов на основе поверхностно усиленного гигантского комбинационного рассеивания, методики определения методами ПЦР в реальном времени и цифровой капельной ПЦР мутаций промоторной области гена *TERT*, а также сравнения нижних пределов обнаружения данных методов.

Результаты. В процессе выполнения данной работы были подобраны оптимальные условия для проведения ПЦР в реальном времени и цифровой капельной ПЦР. С использованием плазмидных конструкций, несущих фрагменты промотора гена *hTERT*, установлен нижний предел обнаружения для данных методик, а также была оценена применимость данных методов для анализа геномных ДНК различного происхождения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-08040).

Полиморфизм гена *TNF* – фактор риска и прогноза рака молочной железы

Т.Ф. Маливанова¹, Н.Н. Мазуренко², А.С. Осташкин¹,
Т.А. Астрелина¹

¹ФГБУ «ГНЦ Федеральный медицинский биофизический
центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва;

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

Фактор некроза опухоли (TNF) — это провоспалительный цитокин, повышенный сывороточный уровень которого ассоциирован с широким спектром заболеваний. Предполагается, что TNF может влиять на прогноз онкологических заболеваний, поскольку оказывает непосредственное цитотоксическое действие и участвует в регуляции иммунного ответа, но также способствует прогрессии опухоли. Ген *TNF* расположен в области HLA III класса и его однонуклеотидные замены -308 (G/A) TNF и -238 (G/A) TNF способны влиять на уровень экспрессии цитокина.

Наши исследования российской популяции (442 первичных больных РМЖ и 327 женщин контрольной группы) показали, что, хотя в общей выборке эти полиморфизмы не оказывают влияния на предрасположенность к РМЖ, но для носителей аллеля -238 (A) замена Pе655Val HER2 более чем в 5 раз повышает риск заболевания РМЖ. При изучении прогностической значимости полиморфизмов гена *TNF* мы показали, что как -308 (G/A) TNF, так и -238 (G/A) TNF снижают общую выживаемость больных РМЖ. Было определено, что при II–III стадиях РМЖ стадирование является прогностическим фактором только для носителей дикого типа и не влияет на исход заболевания для носителей полиморфизмов гена *TNF*. На общую выживаемость носителей полиморфизмов, но не носителей дикого типа, значительно влияет геномный контекст области генов HLA, а именно аутоиммунный гаплотип AN8.1, включающий маркерные аллели генов HLA I и II классов, что предполагает вовлеченность иммунной системы. Для носителей аллеля -238 (A) были выявлены некоторые биологические особенности РМЖ — 80 % опухолей имели низкий индекс пролиферации Ki67 и относились к благоприятному люминальному А типу, при этом имели наиболее неблагоприятный прогноз, что может говорить о недостаточности стандартной терапии.

По результатам проведенного анализа для больных РМЖ II–III стадии может быть предложен алгоритм неблагоприятного прогноза для двух генетически детерминированных групп в условиях стандартной терапии. В отсутствии стабилизирующего действия геномного окружения в виде гаплотипа AN8.1 аллель -308A гена *TNF* увеличивает риск неблагоприятного исхода в 2 раза (HR = 2,11 [1,10, 8,72], 10-летняя общая

выживаемость $47,4 \pm 11,5$ %), аллель -238A — в 3 раза (HR = 3,11 [1,56, 32,79], 10-летняя общая выживаемость $28,6 \pm 17,1$ %), по сравнению с носителями дикого типа (10-летняя общая выживаемость $73,7 \pm 3,5$ %).

Полученные данные могут быть использованы в рамках персонализированной медицины.

Экспериментальная проверка гипотезы о возможности использования белка бета-III тубулина в качестве маркера локальной распространенности опухоли в окружающей ткани органа

М.А. Маяк, А.А. Башарина, Н.С. Сапрыкина,
О.М. Рябинина, Т.А. Богуш

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

Введение. Белок бета-III тубулин (TUBB3) почти не определяется в нормальных эпителиальных тканях, за исключением эндотелиоцитов, но высоко экспрессирован во многих эпителиальных солидных новообразованиях, что делает его потенциально возможным маркером локальной распространенности заболевания, позволяющим уточнять тактику послеоперационного ведения пациентов.

Цель исследования — экспериментальная проверка гипотезы о возможности использования TUBB3 в качестве маркера локальной распространенности опухоли в окружающей ткани органа.

Материалы и методы. Исследование провели на мышах линии C57BL/6 с подкожно трансплантированным раком легкого Льюис, активно метастазирующим в легкие. Иммунофлуоресцентная оценка экспрессии TUBB3 проведена методом проточной цитометрии. Использованы первичные моноклональные антитела к TUBB3 (ab52623) и вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем DyLight 650 (ab98510). Исследованы три показателя экспрессии: уровень экспрессии — доля клеток, экспрессирующих маркер; интенсивность — экспрессия маркера в пересчете на клетку; интегральный индекс экспрессии — произведение двух показателей. Экспрессия TUBB3 оценена в 4 группах сравнения: ткань легкого интактных животных и на 11 сут после трансплантации рака легкого Льюис, метастаз опухоли в легком и визуально «нормальная» ткань легкого, окружающая метастаз, сформированный на 24 сут после трансплантации опухоли. Эксперименты проведены в трех повторах.

Результаты. Низкая экспрессия TUBB3 выявлена в нормальной ткани легкого интактных мышей, при этом в опухоли уровень, интенсивность

и интегральный индекс экспрессии были выше в 3, 18 и 60 раз соответственно. TUBB3 выявлен в визуально «нормальной» ткани, окружающей метастаз в легком на 24 сут после трансплантации опухоли, с уровнем, интенсивностью и индексом экспрессии, превышающими значения нормальной ткани легкого в 2, 4 и 8 раз соответственно ($p = 0,03$). На 11 сут после трансплантации опухоли в визуально «нормальной» ткани легкого экспрессия TUBB3 схожа с показателями для визуально «нормальной» ткани легкого, окружающей метастаз ($p > 0,05$), но существенно превышает таковые для нормальной ткани легкого интактных мышей: по уровню, интенсивности и индексу экспрессии в 2, 3 и 6 раз соответственно ($p = 0,03$).

Выводы. Подтверждена правомочность гипотезы, что выявление TUBB3 в визуально «нормальной» ткани легкого, окружающей опухолевый очаг, может служить маркером локальной распространенности опухоли.

Клинико-морфологический алгоритм диагностики ВИЧ-негативной саркомы Капоши

М.В. Мнихович¹, Т.В. Безуглова¹, А.В. Романов¹,
Д.А. Пастухова², С.В. Снегур³, Ю.Г. Павлова³

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека им. академика А.П. Авцына», Москва;

²ГБУЗ «ГКБ им. И.В. Давыдовского ДЗМ», Москва;

³ГБУ РО «Областная клиническая больница», Рязань

Введение. Дифференциальный диагноз саркомы Капоши включает множество опухолей, таких как дерматофиброма, гистиоцитоидная гемангиома, капошиформная гемангиоэндотелиома, ангиосаркома и множество других.

Цель исследования — вывести алгоритм рутинной патологоанатомической диагностики саркомы Капоши, включая ВИЧ-негативную саркому Капоши.

Материалы и методы. Исследован биопсийный материал от 9 (3 женщины, 6 мужчин) ВИЧ-отрицательных пациентов в возрасте 45–75 лет. В 7 (77,7 %) случаях пациенты (3 женщины и 4 мужчин) обратились с жалобами на опухоли кожи. В 2 (22,2 %, оба мужчины) случаях был выставлен посмертный патологоанатомический диагноз. Использовались методики: рутинная патогистологическая (окраска гематоксилин-эозином) и иммуногистохимическая с антителами CD31, CD34, CD3,

CD79a, HH8. Также было использовано несколько дополнительных антител по необходимости.

Результаты. Иммуногистохимические исследования показали мономорфную экспрессию CD34 эндотелиальными клетками, в то время как экспрессия фактора фон Виллебранда была гетерогенной, клетки в целом были отрицательными по CD31. Эндотелиальные и миофибробластоподобные клетки демонстрируют очаговую интенсивную ядерно-цитоплазматическую экспрессию HHV8. Миофибробластоподобные клетки продемонстрировали интенсивную положительность Ki-67. Использовали дополнительные маркеры (IgL (лямбда), IgL (каппа), CD38, CD3, CD79a, CD30). Клетки демонстрируют интенсивную цитоплазматическую экспрессию IgL (лямбда), IgL (каппа), CD38, мембранную и цитоплазматическую экспрессию CD3, CD30 и мембранную экспрессию CD79a.

Выводы. Патоморфологическая диагностика саркомы Капоши первым этапом должна включать рутинное (окраска гематоксилин-эозином) гистологическое исследование с учетом хаотического характера ангиогенеза, пролиферацию веретеновидных клеток с эндотелиальными маркерами, инфильтрацию мононуклеарных клеток. После оценки примерного гистогенеза опухоли рутинными гистологическими методиками следует провести расширенный дифференциальный диагноз с использованием иммуногистохимии с антителами CD34, CD36, CD31, фактора фон Виллебранда и Ki-67, а также HHV8. В качестве дополнительных маркеров могут быть использованы IgL (лямбда), IgL (каппа), CD38, CD3, CD79a, CD30.

Молекулярные маркеры вируса Эпштейна–Барр в диагностике и оценке прогноза ВЭБ-ассоциированных форм рака желудка

А.Д. Молчанов, А.С. Васильева, Н.Б. Сенюта,
Т.Е. Душенькина, В.Э. Гурцевич, К.В. Смирнова

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

Введение. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) — герпесвирус, который повсеместно распространен (более 90 % населения планеты инфицированы) и способен находиться в организме человека в течение всей его жизни без клинических проявлений у носителей вируса. Для того чтобы вирус достиг максимальной скорости колонизации, его инфекционный цикл чередуется между стадиями латентной и литической инфекции. Латентный цикл позволяет вирусу сохраняться в течение всей жизни инфицированного человека, в то время как литический цикл позволяет передачу новым хозяевам. В-лимфоциты являются основными клетками-мишенями

инфекции и основным резервуаром ВЭБ во время скрытой инфекции. Известно, что этот вирус является этиологическим агентом для целого ряда новообразований. Одним из важнейших вопросов онкогенеза в настоящий момент является процесс возникновения канцерогенеза клеток эпителия желудка при непосредственном влиянии ВЭБ. ВЭБ-ассоциированный рак желудка преимущественно локализуется в антральном отделе и теле желудка. От других форм рака желудка данная форма отличается более молодой возрастной группой пациентов, при этом подавляющее количество больных — мужчины.

Материалы и методы. К обследованию были привлечены 73 больных раком желудка, поступивших в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Соотношение обследованных женщин и мужчин равнялось 1:2,95, а средний возраст больных составил 62,2 года. Диагноз рака желудка устанавливали по совокупности анамнестических данных и результатов эндоскопического и морфологического исследований. С I—II стадией болезни было 13 больных, с III—IV — 50. Материалом для серологического и молекулярного исследований служила плазма крови больных на разных этапах болезни (до и после лечения, на этапе ремиссии, рецидива и метастазирования опухоли), различных возрастных групп, а также стадий злокачественного новообразования. Удаление белков из ДНК-содержащих растворов проводили фенол-хлороформной экстракцией, каждый образец ДНК изучали на присутствие вируса ВЭБ с помощью ПЦР в реальном времени, используя соответствующую пару праймеров. Для выявления титров вирус-специфических антител и показателей концентрации вирусной ДНК исследовали у больных раком желудка в состоянии ремиссии и рецидива.

Результаты. Плазма после лечения была взята у 17 больных. В процессе лечения у 43 больных констатировали ремиссию и у 12 — рецидив. По результатам исследования обнаружена зависимость величины показателей вирусного капсидного и раннего антигенов IgG, IgA и ВЭБ от возраста, стадии болезни и проводимого лечения. В данном исследовании отбиралась плазма, в которой число копий ДНК ВЭБ превышало 500 единиц. Стандартного критерия для определения ВЭБ + рак желудка на данный момент не существует, для этого необходимо создать обширную клиническую базу, по которой будет высчитано среднее арифметическое значение. Поэтому на данный момент за такое значение принимается стандарт для ВЭБ + нРНГ.

Выводы. Иммунологическое исследование образцов плазмы показало наличие маркеров у пациентов, которые только начали проходить химиотерапию или еще не получили лечения. Однако корреляции вирусного капсидного и раннего антигена IgA и IgG от типа и стадии злокачественного новообразования не обнаружено по причине не эндемичного региона и недостаточной клинической базы. На данный момент продолжается работа по созданию обширной

коллекции клинических образцов пациентов с целью получения более достоверных и точных результатов для заключения о корреляции концентрации ДНК ВЭБ с клиническими проявлениями болезни.

Перспективы определения уровня рецепторов CXCR1, CXCR2 и гиалуроновой кислоты в крови при немелкоклеточном раке легкого

Д.И. Мурашко, А.Д. Таганович

Белорусский государственный медицинский университет,
Минск, Республика Беларусь

Цель исследования — установление возможности комплексного определения уровня гиалуроновой кислоты, рецепторов CXCR1 и CXCR2 в диагностике плоскоклеточного рака легкого (ПКРЛ) и аденокарциномы.

Материалы и методы. Обследовано 105 пациентов с ПКРЛ, 88 — с аденокарциномой и 42 — без проявлений заболевания. Определение концентрации CYFRA 21-1 — классического опухолевого маркера в сыворотке крови для сравнения диагностической эффективности проводили методом иммунохемилюминесцентного анализа. Измерение уровня гиалуроновой кислоты в сыворотке крови проводили методом ИФА, а определение рецепторного аппарата крови — методом проточной цитометрии. Для оценки статистических различий между независимыми группами применяли статистический U-критерий Манна—Уитни. Оценку информативности биохимических тестов проводили с помощью ROC-анализа. Построение диагностических моделей осуществляли методом бинарной логистической регрессии.

Результаты. Уровень гиалуроновой кислоты в сыворотке крови, доля лимфоцитов, снабженных CXCR2, и плотность расположения CXCR1 в гранулоцитах (MFI) существенно увеличены в крови пациентов с аденокарциномой и ПКРЛ уже на I стадии заболевания и еще сильнее возрастают на II, III, IV стадиях. Их диагностические параметры сопоставимы или превышают таковые CYFRA 21-1. Комбинированное определение MFI CXCR1 в гранулоцитах, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, и уровня гиалуроновой кислоты в крови позволяют выявить I—II стадии ПКРЛ с диагностической эффективностью 94,1 %, а III—IV стадии — с эффективностью 93,3 %. Комбинация уровня в крови CYFRA 21-1, MFI CXCR1 в гранулоцитах и доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, позволяет выявить ранние стадии аденокарциномы с эффективностью 93,5 %. Комплексное определение в крови CYFRA 21-1 и доли лимфоцитов с CXCR2 информативно при выявлении поздних стадий аденокарциномы (эффективность 95,4 %). Комбинация уровня гиалуроновой кислоты в сыворотке

крови и доли лимфоцитов с CXCR2 позволяет дифференцировать I и II стадии ПКРЛ и аденокарциному с эффективностью 93,4 и 90,2 %, соответственно.

Выводы. Комплексное определение гиалуроновой кислоты в сыворотке крови, доли лимфоцитов, снабженных CXCR2, и MFI CXCR1 в гранулоцитах позволяет достичь более чем 90 % эффективности в диагностике ранних и поздних стадий различных гистологических подтипов немелкоклеточного рака легкого, даже при дифференциальной диагностике I и II стадий заболевания.

Особенности мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, амплификации гена *HER2* в зависимости от статуса микросателлитной нестабильности при колоректальном раке

А.А. Мусаелян^{1,2}, К.А. Оганян¹, В.Д. Назаров¹, С.В. Лапин¹, М.А. Беляев¹, А.А. Захаренко¹, С.В. Орлов^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», Сочи

Введение. Алгоритм ведения пациентов с распространенным колоректальным раком в настоящее время учитывает не только клинические, но и молекулярно-генетические особенности опухоли.

Цель исследования — определение характерных признаков мутаций в генах *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, а также амплификации *HER2*, исходя из статуса микросателлитной нестабильности (МСН) у пациентов с колоректальным раком.

Материалы и методы. У 530 пациентов с колоректальным раком исследовались МСН, мутации в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF*. МСН определялась с помощью фрагментного анализа с использованием маркеров BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, NR-27. Исследование мутации V600E, мутаций во 2-м, 3-м, 4-м экзонах генов *KRAS* и *NRAS* проводилось с использованием аллель-специфической ПЦР. Также у 100 пациентов с отрицательным статусом *KRAS/NRAS/BRAF* определена амплификация гена *HER2* с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* согласно рекомендации ASCO/CAP (2018). ПЦР с обратной транскрипцией была использована для определения транслокаций генов *NTRK1-3* у всех МСН-положительных пациентов с колоректальным раком. У 185 пациентов получены данные об уровне CA19-9 до проведения операции.

Результаты. МСН обнаруживалась в 6,8 % (36/530) случаев колоректального рака. Распространенность мутаций в генах *BRAF*, *KRAS* и *NRAS* при наличии МСН составила 72,2 %, а при отсутствии — 52,8 %. Мутация V600E в гене *BRAF* обнаруживалась чаще у пациентов

с МСН, чем с отсутствием: 44,4 и 3,0 % соответственно ($p < 0,0001$). Независимо от статуса МСН, мутация *BRAF* V600E ассоциирована с правосторонней локализацией ($p < 0,0001$), распространенностью первичной опухоли (Т3-4) ($p = 0,004$), поражением лимфатических узлов ($p = 0,009$), диссеминацией по брюшине ($p = 0,041$) и высоким предоперационным СА19-9 ($p = 0,014$). Общая распространенность мутаций в генах *KRAS* и *NRAS* составила 45,3 и 2,8 % соответственно. Мутации в гене *KRAS* взаимосвязаны с опухолями G1–2 ($p = 0,008$). Различий в частоте встречаемости aberrаций *KRAS* и *NRAS* в зависимости от статуса МСН не обнаружено. Амплификация гена *HER2* выявлена в 7 % *KRAS/NRAS/BRAF*-отрицательных случаев и была связана с наличием рака прямой кишки ($p = 0,044$), категории Т3-4 ($p = 0,041$) и метастатического поражения ($p = 0,018$). Амплификации гена *HER2* и транслокаций генов *NTRK1-3* при колоректальном раке с МСН не обнаружено.

Выводы. Колоректальный рак с МСН характеризуется более высокой распространенностью драйверных мутаций в основных генах, в частности мутации V600E в гене *BRAF*. Независимо от статуса МСН мутация *BRAF* V600E и амплификация гена *HER2* характеризуются агрессивным клинико-морфологическим паттерном.

Рецепторный статус циркулирующих нейтрофилов на разных стадиях рака почки

И.Р. Мягдиева¹, Е.С. Семенова¹, О.Ю. Горшков², Т.В. Абакумова¹, Т.П. Генинг¹

¹Ульяновский государственный университет;

²ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер», Ульяновск

Введение. В настоящее время значительный интерес вызывает неоднозначная роль нейтрофилов при раке почки. Свойства нейтрофилов определяются экспрессией мембранных рецепторов адгезии CD11b и CD15, а также CD16, являющегося маркером нейтрофилов, способных к фагоцитозу и антителзависимой клеточной цитотоксичности.

Цель исследования — оценить рецепторный статус циркулирующих нейтрофилов на разных стадиях рака почки.

Материалы и методы. Объектом исследования явились нейтрофилы периферической крови пациентов с верифицированным раком почки светлоклеточного типа I стадии (T1N0M0G1, $n = 30$, Ме возраста 63,0) и III стадии (распространенный процесс) (T3N0M0G2, $n = 30$, Ме возраста 59) до лечения. Группу контроля составляли условно здоровые доноры ($n = 15$, Ме возраста 54,0). От всех пациентов получено информированное согласие на участие в исследовании. Иммунофенотипирование циркулирующих нейтрофилов проводили с использованием метода флуоресцентной микроскопии

(моноклональные антитела к поверхностным антигенам CD11b, CD15, CD16, ЗАО «Сорбент», г. Москва). Данные обрабатывались с использованием ПО Statistical 13.

Результаты. Ранее доказано, что рецепторы адгезии CD11b и CD15 экспрессируются на поверхности нейтрофилов при воспалении и опухолевой инвазии, в том числе и при раке почки. Проведенное нами исследование показало значимое возрастание экспрессии CD11b на поверхности нейтрофилов у пациентов с раком почки на всех стадиях по сравнению с аналогичными показателями в группе контроля ($79,4 \pm 5,10$ против $18,9 \pm 3,5$ %; $p = 0,001$). Значимых отличий экспрессии молекул CD15 на мембране нейтрофилов в исследуемых группах нами не обнаружено. Ряд исследователей подтверждают, что при наличии злокачественного новообразования, в том числе и при раке почки, увеличивается экспрессия CD16 циркулирующими нейтрофилами. Нами получено значимое возрастание экспрессии CD16 на мембране нейтрофилов у пациентов при раке почки на III стадии по сравнению с I ($97,5 \pm 2,1$ против $82,7 \pm 3,18$ %; $p = 0,001$) и по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе ($97,5 \pm 2,1$ против $59,0 \pm 3,07$ %; $p = 0,001$). Кроме этого, была выявлена корреляционная связь экспрессии рецептора CD16 нейтрофилов со стадией рака почки ($r = 0,445$, $p = 0,001$).

Выводы. Таким образом, рецепторный статус циркулирующих нейтрофилов при раке почки определяется экспрессией CD11b и CD16, причем фенотип нейтрофилов при распространенном раке почки обусловлен повышенной экспрессией CD16.

Роль молекулярно-биологического маркера CDKN2A в ранней диагностике рака толстой кишки

Я.Н. Наврузов¹, С.Б. Абдужаппаров¹, Я.В. Тен²

¹Джизакский областной филиал Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра онкологии и радиологии, Республика Узбекистан;

²Республиканский специализированный Научно-практический Медицинский Центр Онкологии и Радиологии Минздрава РУз, Ташкент, Республика Узбекистан

Введение. В настоящем исследовании изучаются результаты ранней диагностики рака толстой кишки путем разработки молекулярно-биологических методов прогнозирования с использованием гена CDKN2A. Используя комплекс ранних диагностических мероприятий для выявления рака толстой кишки изучаются клинико-анамнестические данные, их корреляция с молекулярно-биологическими показателями. Также планируется разработать систему эффективного прогнозирования развития рака толстой кишки и формирования групп риска для научно-обоснованного консультирования семей с высокой предрасположенностью к раку тол-

стой кишки.

Цель исследования — разработка метода ранней диагностики рака толстой кишки путем определения метилирования гена CDKN2A.

Материал и методы. Исследования проведены в отделении колопроктологии РСНПМЦОиР МЗ РУз совместно с лабораторией биологии Центра высоких технологий у 18 пациентов (10 мужчин, 8 женщин). Средний возраст больных составил $48,4 \pm 3,8$ лет. В исследование включены пациенты с одиночными и множественными полипами, полипозом толстой кишки, а также больные, не имеющие в анамнезе онкозаболевания. У 6 больных был полипоз толстой кишки, у 7 — множественные полипы прямой и сигмовидной кишки, у 5 — одиночные полипы толстой кишки. Всем пациентам определяли уровни метилирования гена CDKN2A. Материалом для выделения ДНК служила сыворотка, полученная из венозной крови, и биопсийный материал. После конверсии ДНК проводили метилспецифичную ПЦР.

Результаты. Среди 18 больных с полипами и полипозом толстой кишки метилирование ДНК гена CDKN2A в сыворотке крови было обнаружено у 8. У 10 больных результат теста был отрицательным. Таким образом, диагностическая эффективность в отношении выявления рака толстой кишки в ранней диагностике при помощи определения метилирования ДНК гена CDKN2A составила 44,4 %.

Выводы. При наличии положительного теста на метилирование гена CDKN2A риск развития рака толстой кишки считался очень высоким, и пациенты подвергались оперативному лечению. Применение молекулярно-биологического маркера CDKN2A может быть эффективным методом в ранней диагностике рака толстой кишки. Данный метод диагностики требует проведения более глубокого исследования, основанного на изучении большего числа наблюдений.

Мутационный профиль редких меланоцитарных опухолей у детей

Т.В. Наседкина¹, В.В. Семенова^{1,2}, И.О. Барина¹,
Я.В. Вишневская², И.С. Клецкая³, А.М. Строганова²,
Т.С. Бельшева²

¹ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук», Москва;

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

³РДКБ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Введение. Меланоцитарные опухоли кожи у детей представляют собой гетерогенную группу доброкачественных и злокачественных новообразований, различающихся по морфологическим, клиническим и молекулярным характеристикам. В ряде случаев на фоне

доброкачественного пигментного новообразования развивается меланома кожи. Меланома кожи у детей и подростков является редким, но плохо поддающимся лечению заболеванием, в то же время отсутствие четких диагностических критериев затрудняет своевременную постановку диагноза. Анализ профиля мутаций может рассматриваться в качестве важного этапа дифференциальной диагностики невусов для определения риска возможной малигнизации.

Цель исследования — анализ молекулярно-генетического профиля редких меланоцитарных новообразований у детей, включая меланому кожи.

Материалы и методы. В исследование включены 12 пациентов с меланоцитарными опухолями, из них 4 случая меланомы кожи. Геномную ДНК выделяли из образцов ткани в парафиновых блоках. Проводили таргетное секвенирование кодирующих участков 35 генов, участвующих в процессах меланогенеза, меланомогенеза, пролиферации и клеточной адгезии.

Результаты. Мутации, выявленные в образцах невусов, в значительной степени зависели от клинических особенностей опухоли. Мутация p.V600E в гене *BRAF* была обнаружена в диспластическом невусе и невусе Рида. В образце голубого невуса выявлена мутация GNAQ p. Q209L. В 3 случаях гигантских врожденных меланоцитарных невусов выявлены мутации в гене *NRAS*, у 2 из этих пациентов на фоне невусов возникла меланома кожи. В одном случае в образце меланомы выявлена патогенная мутация p. N387K в гене *CTNIB1*, которая отсутствовала в клетках невуса. Еще у одного пациента мутации в генах *BRAF* и *NRAS* не выявлены, но в образце меланомы на фоне врожденного меланоцитарного невуса обнаружена патогенная мутация p. Q277X в гене *BAP1*. В образцах атипичных невусов Шпитц выявлены мутации в промоторной области гена *TERT*.

Выводы. Морфология и гистологические характеристики ткани невуса не всегда позволяют правильно определить тип невуса и оценить его потенциальную меланоомоопасность. Изучение спектра мутаций в образцах детей с редкими меланоцитарными опухолями, включая меланому, позволяет разработать более точные диагностические критерии и выявить генетические факторы риска малигнизации доброкачественных невусов.

Акваторин 3 в опухолевой ткани больных раком мочевого пузыря как диагностический маркер

Л.Н. Павлов, Л.М. Кутляров, В.З. Галимзянов,
К.В. Данилко, Р.Р. Хайруллина

ФГБОУ «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа,

Введение. Согласно литературным данным, аквапорин 3 играет одну из ключевых ролей в прогрессировании

и метастазировании рака. Акваторин 3 не является специфическим маркером доброкачественных или злокачественных эпителиальных новообразований, а изменения его экспрессии могут быть разнонаправленными в тканях пациентов с различными формами рака. Однако роль этого белка в развитии уротелиальной карциномы мочевого пузыря была исследована только в одной когорте пациентов.

Цель работы — изучение особенностей экспрессии аквапорина 3 в опухолевой и интактных тканях мочевого пузыря.

Материалы и методы. Были собраны свежие образцы тканей 39 пациентов с уротелиальной карциномой после трансуретральной резекции и радикальной цистэктомии. Профиль экспрессии генов транскрипта мРНК аквапорина 3 в 33 образцах опухолевых тканей или 17 образцах визуально нормальных тканей определяли с помощью ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Различия в экспрессии мРНК между неопластическими и интактными тканями мочевого пузыря оценивали с помощью U-теста Манна–Уитни в программе GraphPad Prism v. 6.0.

Результаты. Использовался $\Delta\Delta C_t$ алгоритм для определения относительного уровня экспрессии мРНК в опухолевой и интактной тканях мочевого пузыря 39 больных уротелиальной карциномой с использованием RT-PCR. Экспрессия мРНК гена аквапорина 3 была достоверно ниже в образцах опухолевой ткани, чем в интактных (Mann–Whitney $U = 173.0$, $p = 0,0274$), экспрессия аквапорина 3 значительно ниже в опухолевой ткани мочевого пузыря, чем в интактной.

Выводы. Показатель экспрессии аквапорина 3 при дальнейшем исследовании может быть использован для улучшения ранней диагностики и диагностики рецидива рака мочевого пузыря.

Иммуносигнатуры молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы

С.В. Подлесных¹, П.И. Колтышева¹, Е.Д. Тищенко¹,
Я.Н. Шойхет², А.Ф. Лазарев², И.В. Вихлянов³,
И.А. Беленинова³, Т.В. Синкина³, С.А. Джонстон⁴,
А.И. Шаповал^{1,4}

¹ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул;

²ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет», Барнаул;

³КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», Барнаул;

⁴Университет штата Аризона, Темпе, США

Введение. Ранняя диагностика молекулярных изменений РМЖ важна для успешного лечения. Особенности ранней продукция антител могут быть маркером онкогенеза.

Цель работы — разработка метода оценки и выявления иммуносигнатур при разных молекулярно-биологических подтипах злокачественных новообразований молочной железы.

Материалы и методы. Исследован 81 образец плазмы крови женщин 40–60 лет. В 1-ю группу вошли 40 пациентов с диагнозом РМЖ (С50, Т1–Т2), во 2-ю (контроль) — 41 здоровый донор. Подтипы определяли по клиническим рекомендациям. В работе применяли пептидные микрочипы (330 тыс. пептидов). Пептиды имеют случайную последовательность аминокислот. Использовали 1 мкл плазмы крови.

Результаты. На 1-м этапе исследования с помощью пептидных микрочипов (330 тыс.) выявлено, что в плазме крови пациентов с диагнозом РМЖ могут быть обнаружены антитела (иммуносигнатуры). Они взаимодействуют с 119 комбинаторными пептидами. Были определены частые мотивы аминокислот в пептидах для группы с РМЖ. На следующем этапе установлено, что циркулирующие антитела пациентов при различных молекулярно-биологических подтипах РМЖ имеют взаимодействие с разными пептидами, а также смешанными группами пептидов. В ходе анализа определены 634 комбинаторных пептида из 330 тыс. Эти пептиды могут специфически взаимодействовать с антителами пациентов, имеющих разные подтипы РМЖ. В исследовании были выявлены и смешанные подтипы РМЖ. Обнаружены мотивы в пептидах при подтипах РМЖ. В базе данных белков PDB (Protein Data Bank) выявлены варианты частичной гомологии этих пептидов с опухолеассоциированными белками и их экспрессией в опухолях.

Выводы. Выявленные пептиды можно использовать в разработке тест-систем для неинвазивной ранней диагностики разных молекулярно-биологических подтипов злокачественных новообразований молочной железы. Микрочип может использоваться для изучения и молекулярного скрининга онкориска в персонализированной медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания (ГЗ № FZMW-2020–0007) и РФФИ (проект № 19-44-220008/20).

Исследование субпопуляционного состава опухолеинфильтрирующих лимфоцитов в метастатических очагах меланомы кожи

Е.А. Просекина¹, Н.А. Ефремова¹, А.Е. Карпов¹,
Е.Ю. Федоруцева², Н.А. Максимова¹, А.С. Артемьева¹

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

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Введение. Опухолеинфильтрирующие лимфоциты (tumor-infiltrating lymphocytes, TILs) являются местным гистопатологическим отражением иммунного ответа хозяина против раковых клеток. Количество, локализация и фенотип TILs не только предсказывают ответ на иммунотерапию, но и определяют прогрессирование злокачественного новообразования. На сегодняшний день адоптивный перенос опухолеинфильтрирующих лимфоцитов находится в разработке для лечения метастатической меланомы кожи. Поиск и характеристика новых прогностических маркеров субпопуляционного состава TILs является важным этапом перед проведением терапии.

Цель исследования — подобрать оптимальную панель для исследования субпопуляционного состава TILs и оценить оптимальный метод для определения гетерогенности иммунного контекста метастатической меланомы кожи.

Материалы и методы. В исследование было включено 5 образцов метастатических меланом кожи пациентов, подвергнутых хирургическому лечению в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава России. Содержание TILs в клеточной суспензии определяли с помощью FACS Canto (BD Biosciense, USA) с использованием двух панелей антител (CD3-FITC/CD16-56-PE/CD45-PerCP-Cy5.5/CD-PE-Cy7/CD-APC/CD8-APC-Cy7 и CD45-APC-Cy7/CD4-PerCP-Cy5.5/CD25-PE-Cy7/CD127-BV421 (BD Biosciense, USA)). Полученные данные были обработаны с помощью программного обеспечения BD FACSDiva v9. Для иммуногистохимического окрашивания были использованы моноклональные антитела: CD4 (SP35, Ventana, USA), CD8 (SP57, Ventana, USA), CD3 (SP7, DBS, USA), CD19 (EP169, Cell Marque, USA), CD25 (Leica, UK), Foxp3 (EP340, Epitomics, USA) и система визуализации EnVision FLEX-HRP (Dako, USA). Изображения срезов были получены с помощью Panoramic 1000 (3DHISTECH Ltd., Hungary).

Результаты. Полученные данные с помощью FACS и ИHC продемонстрировали неоднородность иммунного контекста в метастазах меланомы кожи у разных пациентов. Обнаружено, что Т-клетки были доминирующим подмножеством и включали значительно больше CD4+, чем CD8+ Т-клеток. С помощью FACS была обнаружена субпопуляция регуляторных

Т-клеток, что не наблюдалось при иммуногистохимическом исследовании. ИНС позволила визуализировать островки субпопуляций в опухоли и ее строме, тогда как FACS позволил проследить дифференциацию и функциональную поляризацию Т-клеток.

Выводы. Представленные методы являются взаимодополняющими и могут быть использованы для лучшего понимания иммунного контекста метастатической меланомы кожи при принятии терапевтических решений.

KIM-1 как потенциальный уринологический маркер почечно- клеточного рака

Н.С. Сергеева, Т.А. Кармакова, К.Ю. Кануков,
И.И. Алентов, Н.В. Маршуткина

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

Введение. KIM-1 (kindey injury molecule 1) — молекула повреждения паренхимы почки, в норме в следовых количествах синтезируется в проксимальных канальцах почек. Увеличение экспрессии KIM-1 является ранним маркером ишемического и токсического повреждений почек. Уровень KIM-1 в крови и моче увеличивается при почечно-клеточном раке

Цель работы — исследовать возможности использования уровня KIM-1 в моче (uKIM-1) как опухолеассоциированного маркера почечно-клеточного рака.

Материалы и методы. Исследованы уровни uKIM-1 у 118 первичных больных почечно-клеточным раком (I ст. — 71, II ст. — 4, III ст. — 27, IV ст. — 16), у 20 больных почечно-клеточным раком в ремиссии, у 17 — при рецидиве заболевания, а также у 58 условно здоровых лиц с использованием иммуноферментного анализа EnzoLife Sciences KIM-1 ELISA (США) под контролем уровней креатинина мочи (Cr).

Результаты. Установлена целесообразность нормирования uKIM-1 на Cr мочи, что нивелирует гендерные различия и позволяет учитывать концентрацию мочи. Уровни uKIM-1/Cr у первичных больных почечно-клеточным раком почти в 5 раз превышали таковые у здоровых лиц ($4,63 \pm 0,56$ vs $0,96 \pm 0,13$ нг/мг), возрастали со стадией опухолевого процесса ($2,87 \pm 0,4$ нг/мг при I ст. vs $8,49 \pm 2,04$ нг/мг при IV ст.), снижались до нормальных значений в ремиссии ($0,79 \pm 0,14$ нг/мг) и возрастали до уровней, близких к таковым у первичных больных при рецидиве заболевания ($4,33 \pm 1,43$ нг/мг). После нефрэктомии уровни uKIM-1/Cr монотонно снижались (что свидетельствует об опухолевом источнике uKIM-1), а после резекции почки — повышались (что, вероятно, связано с воспалительными процессами в почечной паренхиме). У больных с I ст. почечно-клеточного рака наивысшие значения uKIM-1/Cr наблюдали при папиллярном, а наименьшие — при хромофобном

раке. При мочекаменной болезни уровни uKIM-1/Cr были сходны с таковыми у больных почечно-клеточным раком, а при пиелонефрите — превышали их ($3,05 \pm 0,87$ и $6,84 \pm 0,87$ нг/мг соответственно). AUC для uKIM-1/Cr (ROC-анализ против здоровых лиц) составила 0,860. Дискриминационный уровень uKIM-1/Cr 1,4 нг/мг обеспечивает чувствительность 75 % при специфичности 78,2 %.

Выводы. uKIM-1/Cr обладает базовыми свойствами опухолеассоциированных маркеров и может быть полезен для мониторинга больных почечно-клеточным раком с целью доклинического выявления рецидивов заболевания.

Д-димер – маркер активации свертывания и показатель эффективности применения антикоагулянтов в онкологии

О.В. Сомонова, А.Л. Елизарова

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

Цель исследования — анализ роли Д-димера как показателя эффективности применения антикоагулянтов в онкологии.

Материал и методы. Оценка уровня Д-димера была проведена у 270 онкологических больных, подвергшихся оперативному лечению. Больные I группы ($n = 140$) получали 4000 МЕ анти-Ха активности эноксапарина натрия в течение 7–20 сут послеоперационного периода. Больные II группы (контроль, $n = 130$) не получали медикаментозной профилактики тромботических осложнений.

Результаты. Под влиянием оперативного вмешательства наблюдалось дальнейшее нарастание маркеров внутрисосудистого свертывания крови. Концентрация Д-димера у больных контрольной группы увеличивалась к 5–6-м суткам в 2,5 раза ($4,1$ мкг/мл) и сохранялась высокой на протяжении всего периода наблюдения. У больных, получавших эноксапарин натрия с 1-х суток послеоперационного периода, концентрация Д-димера, конечного продукта деградации фибрина, увеличивалась после операции в меньшей степени, достоверно отличаясь на 5–6-е сутки от больных контрольной группы. Следует отметить, что у 15 больных, получавших 4000 МЕ анти-Ха активности эноксапарина натрия в послеоперационном периоде, отмечено значительное увеличение уровня Д-димера ($>3,0$ мкг/мл); у этих пациентов была увеличена доза низкомолекулярного гепарина, что позволило эффективно провести антитромботическую профилактику и предотвратить развитие тромботических осложнений. В группе больных, не получавших медикаментозной профилактики (II группа), частота тромботических послеоперационных

осложнений составила 17 (13 %) случаев, в группе больных, получавших низкомолекулярные гепарины (I группа), – 1 (0,7 %) случай.

Выводы. Д-димер является одним из показателей эффективности антикоагулянтной профилактики в онкологии.

Содержание DLK1 в сыворотке и ликворе больных с опухолями головного мозга

Л.В. Спирина, А.И. Рябова, Е.Ю. Мединцева

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Введение. DLK1 представляет собой трансмембранный протеин, экспрессирующийся в клетках головного мозга. Характерными свойствами протеина является активация Notch пути, ангиогенеза, пролиферации клеток. Существуют экспериментальные данные об увеличении экспрессии данного белка в глиомах по сравнению с неопухолевыми участками мозга. Отмечается, что экспрессия DLK1 высока в областях опухоли, где отмечается развитие гипоксии. Полагают, что это способствует высвобождению и ядерной транслокации внутриклеточного фрагмента DLK1 как в ткани глиомы мыши, так в культурах опухолевых клеток человека. Выявлено влияние ADAM17 и факторов, индуцируемых гипоксией, на индукцию трансмембранного протеина, что сопровождается активацией опухолевого роста и развитием инвазивных свойств опухоли. Выявленные факты указывают на увеличение количества растворимых форм неканонического лиганда Notch пути, DLK1 в ликворе и сыворотке крови при развитии опухолей центральной нервной системы. Показаны сведения о связи данного маркера с агрессивностью и неблагоприятным прогнозом заболевания. Дополнительно выявлены данные о роли этой растворимой формы белка в модулировании биологических особенностей опухоли.

Материал исследования. В исследование было включено 40 пациентов с мультиформными глиобластомами и 30 больных с глиомами, проходившими лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. Материалом исследования были сыворотка крови и ликвор больных с глиобластомами и глиомами Grade 2–3. Группой сравнения были пациенты без опухолей центральной нервной системы.

Результаты. В результате проведенного исследования отмечен рост белка DLK в сыворотке крови больных с глиомами Grade 2–3 и глиобластомами. Уровень маркера был повышен в 1,1 и 1,14 раза соответственно по сравнению с пациентами без опухолей центральной нервной системы. Рост содержания белка в 1,33 раза отмечен у пациентов с глиомами в цереброспинальной жидкости. Для больных с мультиформными глиобластомами подобных

изменений выявлено не было. Выявлено высокое содержание белка в сыворотке крови больных с глиомами Grade 2 по сравнению с Grade 1 и 3. При этом повышение содержания белка в 1,13 раза в сыворотке больных с глиобластомами было связано с развитием рецидивов заболевания, а рост данного маркера в 1,1 раза отмечен при развитии смертельных исходов заболевания (среднее время дожития $18,0 \pm 5,6$ мес). Наличие мутации IDH не влияло на уровень маркера в сыворотке и ликворе. Выявлена связь безрецидивной выживаемости с содержанием белка DLK1 в сыворотке крови у больных с глиомами. Так, безрецидивная выживаемость значимо выше у больных с уровнем белка DLK1 менее 0,322 нг/мл. У пациентов с глиомами Grade 2–3 выявлено снижение DLK1 в 1,23 раза в сыворотке крови при развитии неблагоприятного исхода заболевания (среднее время дожития $14,0 \pm 4,5$ мес) по сравнению с пациентами, которые имели большую общую выживаемость.

Выводы. Для больных с новообразованиями центральной нервной системы отмечено увеличение содержания DLK1 в крови пациентов. Рост показателя в ликворе показан для пациентов с глиомами. Выявлены разнонаправленные изменения уровня DLK1 в крови при оценке прогностической значимости показателя. Так, рост показателя ассоциирован со сниженной общей выживаемостью пациентов с мультиформными глиобластомами. Отмечена прогностическое значение белка DLK1 с развитием рецидивов заболевания.

Современная диагностика рака предстательной железы у мужчин молодого возраста

В.Ю. Старцев¹, Д.И. Кривоносов²

¹ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России;

²СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 19»,
Санкт-Петербург

PSA – часто используемый показатель для раннего выявления рака предстательной железы. Однако 20–30 % пациентов с впервые выявленным раком предстательной железы на момент выполнения биопсии имеют нормальные значения PSA. Исследования показали, что карциному простаты выявляют только у 32,4 % пациентов с PSA >4,0 нг/мл.

В клиническом руководстве NCCN представлены данные по определению концентрации циркулирующей в плазме крови опухолевой ДНК (цодНК). Анализ цодНК может играть важную роль в диагностике рака предстательной железы, особенно у пациентов, у которых нереально получить достаточное количество опухолевой ткани для анализа, и при назначении терапии ингибиторами поли (АДФ-рибоза) – полимеразы (PARP). В мае 2020 г. ингибитор PARP олапариб получил одобрение FDA для лечения пациентов

с метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы с онкогенными или потенциально онкогенными зародышевыми или соматическими мутациями генов гомологичной рекомбинации, а рукапариб был одобрен для пациентов с метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы с зародышевыми или соматическими мутациями гена *BRCA*.

Анализ цоДНК — это инструмент для отбора пациентов, к которым применима данная терапия, т. к. был выявлен высокий уровень совпадений соматических мутаций HRR в образцах плазмы и опухолевой ткани. Однако конкордантность способна отличаться для отдельных мутаций. Анализ цоДНК позволяет идентифицировать реверсивные мутации *BRCA*, определяющие приобретенную резистентность к ингибиторам PARP, а также установить гетерогенность опухоли, что невозможно оценить при биопсии. По данным исследований 202 пациентов с ранее не леченным метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы, получавших абиратерон или энзалутамид, установлено, что анализ цоДНК позволяет получить полную картину соматических мутаций и идентифицировать классы геномных альтераций, связанных с неблагоприятными клиническими исходами, включая дефекты генов *BRCA2*, *ATM* и *TP53*.

В результате анализа образцов плазмы и опухолевой ткани 62 мужчин с метастатическим раком предстательной железы установлено, что геномные и эпигеномные особенности нейроэндокринного кастрационно-резистентного рака предстательной железы могут быть выявлены с помощью тестов цоДНК. Данный метод с использованием таргетной панели, включающей идентификацию геномных (*TP53*, *RB1*, *CYLD*, *AR*) и эпигеномных альтераций (гипо- и гиперметилирование 20 различных участков), позволяет выявить пациентов с нейроэндокринным раком предстательной железы.

Необходимо оценить преимущества и недостатки выполнения теста цоДНК, по сравнению с исследованием опухолевой ткани, с учетом частоты ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Вероятно, данный метод скоро получит новое развитие и сможет занять достойное место для скрининга и своевременной верификации рака предстательной железы.

Иммуногистохимические маркеры CD4+ и CD8+ в оценке прогнозирования опухолевого процесса молочной железы

М.Н. Тилляшайхов, Н.С. Шомансурова, М.С. Гильдиева, Д.А. Нишанов

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр онкологии и радиологии Минздрава РУз, Ташкент, Республика Узбекистан

Введение. Важным направлением стало изучение диагностических и прогностических молекулярно-биологических маркеров в онкогенезе. Вопрос, связанный с воспалительными процессами в самой опухоли, остается открытым.

Цель исследования — изучение особенностей воспалительной инфильтрации иммунокомпетентными клетками лимфоцитами и макрофагами первичной опухоли для диагностики и прогнозирования опухолевого процесса.

Материалы и методы. Нами был изучен операционный и биопсийный материал 90 женщин с патологией молочных желез. В зависимости от патологии пациенты были поделены на 3 группы: I — с узловой формой фиброзно-кистозной мастопатии; II — с фиброаденомой; III — с карциномой *in situ*.

Результаты. Анализ показал, что у женщин в группе с диагнозом карцинома *in situ* наблюдалось преобладание количественного состава Т-лимфоцитов CD4+ $45,12 \pm 1,9$ % над количеством цитотоксических лимфоцитов CD8+ $31,4 \pm 1,45$ %. Здесь наблюдается преобладание Т-хелперов над цитотоксическими Т-лимфоцитами, присутствие которых в опухолевой ткани имеет прогностическое значение. При узловой форме фиброзной мастопатии количество CD4+ $41,5 \pm 1,24$ % и CD8+ $32,4 \pm 1,7$ %; при фиброаденоме — CD8+ $48,7 \pm 1,48$ % и CD4+ $36,2 \pm 1,3$ %.

Выводы. Как видно, преобладающим типом интра-туморальных лимфоцитов при карциноме *in situ* и при узловой форме фиброзной мастопатии в опухолевой ткани стали маркеры CD4+. Было выявлено преобладание экспрессии CD4+ над экспрессией CD8+, что является неблагоприятным прогностическим фактором.

Сравнительный анализ результатов секвенирования образцов опухоли с использованием двух коммерческих панелей разного размера

Д.Н. Хмелькова, И.Л. Плакса, И.В. Миронова,
Е.В. Мусатова, В.С. Каймонов
АО «ЦГРМ «Генетико», Москва

Введение. Применение метода секвенирования нового поколения (NGS) для выявления соматических мутаций в опухоли только начинает входить в клиническую практику в России, тогда как за рубежом этот метод уже получил определенное признание. В частности, использование метода NGS с целью поиска мишеней для применения таргетной терапии упоминается в отдельных клинических рекомендациях NCCN по лечению опухолей. Преимуществом метода NGS перед другими методами по выявлению мутаций является возможность исследовать генетические варианты одновременно в ряде генов. Размер панелей генов, применяемых в диагностике, может варьировать в широких пределах.

Цель исследования — сравнение результатов применения метода NGS с использованием двух разных по размеру панелей — коммерческого теста Foundation One (Roche) и кастомной панели Onconetix, разработанной в нашей лаборатории — на сопоставимых по размеру выборках образцов.

Материалы и методы. Тест Foundation One содержит 324 гена и позволяет определять большой спектр молекулярных изменений в опухоли, в том числе вариации числа копий генов, транслокации и комплексные биомаркеры опухоли — молекулярную нагрузку и микросателлитную нестабильность, тогда как панель Onconetix включает 48 генов и предназначена для поиска точечных мутаций и небольших инсерций и делеций в клинически значимых генах. Выборка пациентов, прошедших исследование Foundation One, составила 152 пациента, из них 30 % больных с опухолями центральной нервной системы, 23 % — с опухолями желудочно-кишечного тракта, 12 % — с опухолями печени и желчевыводящих протоков, 8 % — с опухолями головы и шеи, 5 % — с раком легкого и 5 % — с опухолями неизвестной первичной локализации. Остальные локализации встречались реже. Выборка пациентов, прошедших исследование Onconetix, была более клинически разнородной. Из 121 пациента у 18 % были опухоли желудочно-кишечного тракта, у 17 % — опухоли головы и шеи, у 9 % — опухоли центральной нервной системы, у 7 % — опухоли легкого. Опухоли молочной железы, лейомиосаркома матки и первично-множественный рак составили по 6 % от выборки. Другие локализации встречались реже.

Результаты. Из 152 пациентов, прошедших исследование Foundation One, 97 (64 %) пациентов получили

заключения, содержащие молекулярные изменения, ассоциированные с чувствительностью или резистентностью к тем или иным таргетным препаратам, из них у 11 опухоль характеризовалась высокой молекулярной нагрузкой. У 9 (6 %) пациентов не было выявлено никаких клинически значимых изменений в опухоли. По результатам исследования с помощью панели Onconetix в 35 (29 %) случаях из 121 были выявлены предиктивные маркеры для таргетной терапии, в 22 (18 %) случаях значимых изменений выявлено не было. Интересно отметить, что в 36 (37 %) случаях из 97 пациенты, получившие информацию о молекулярных маркерах, ассоциированных с таргетной терапией, по результатам теста Foundation One, могли получить эту информацию и в случае использования панели Onconetix.

Выводы. Таким образом, использование панелей, включающих большое количество генов и позволяющих определять различные типы молекулярных изменений в опухоли, очевидно, обладают большей клинической эффективностью. Однако в силу их достаточно высокой стоимости в качестве теста первой линии могут быть использованы более доступные по цене панели меньшего размера. Выявление нозологий, для которых применение панелей разного размера может быть клинически оправдано, является важной задачей развития молекулярной диагностики в онкологии.

Получение моноклональных антител ICO-402 к рецептору VEGF-R1

П.В. Царапаев, Н.В. Голубцова, Ю.А. Хоченкова,
О.С. Бурова, А.А. Рудакова, З.А. Соколова,
М.А. Барышникова

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

Введение. Применение моноклональных антител (МКА) широко распространено в онкологии для изучения опухолевых антигенов, иммунодиагностики и иммунотерапии опухолей, а также для изучения взаимосвязи опухолевого роста и ангиогенеза. Среди всех ангиогенных факторов белки семейства VEGF играют центральную роль в новообразовании сосудов. Рецептор фактора роста эндотелия сосудов VEGF-R1 представляет собой рецептор тирозинкиназы, часто экспрессируемый, в частности при меланоме. По данным литературы, экспрессия уровня VEGF-R1, обнаруженная в опухолевой ткани, образцах сыворотки или плазмы, может иметь прогностическое значение — установлена корреляция с агрессивностью заболевания, степенью злокачественности, выживаемостью и ответом на терапию.

Цель исследования — получение моноклональных антител ICO-402 к рецептору VEGF-R1.

Материалы и методы. Мышей линии BALB/С в возрасте 3 мес трижды иммунизировали внутривенно с интервалом 2 нед клетками метастатической

меланомы человека mel 1bг из коллекции клеточных культур ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в количестве $8-10 \times 10^6$ на мышь. Слияние проводили на 4-й день после последней иммунизации при помощи раствора полиэтиленгликоля ПЭГ/ДМСО (Sigma, USA). Для слияния использовалась перевиваемая клеточная линия мышинной миеломы NS-1, дефектная по гену ГГФРТ, т.е. не способная к синтезу ДНК. Полученную гибридому ICO-402 дважды клонировали методом лимитирующих разведений, нарабатывали асцитную жидкость, содержащую МКА ICO-402, на мышах-самках линии BALB/C. Выявление экспрессии VEGF-R1 в полученных МКА-402 проводили методом иммуноцитохимии на клеточных линиях меланомы и эпидермоидной карциномы A431. Использовали кроличьи антитела против рецептора VEGF-R1 (разведение 1:200, ab2350, Abcam, Великобритания), антимышьи и антикроличьи антитела, меченные флуорохромом Alexa Fluor® (Life Technologies, США). Анализ образцов проводили на флуоресцентном микроскопе Nikon 80i при 465–495 нм.

Результаты. Проведено сравнительное исследование МКА ICO 402, полученных в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО, с коммерческими антителами (anti-VEGFR1 rabbit IgG ab2350, Abcam, Великобритания). Методом иммуноцитохимии выявлена экспрессия рецептора VEGF-R1 на клеточной линии метастатической меланомы человека mel 1bг в асцитической жидкости, содержащей полученные МКА ICO-402, в разведении 1/25.

Выводы. Получены предварительные результаты выявления экспрессии VEGF-R1 в асцитической жидкости, содержащей МКА ICO-402. Планируется продолжить исследование методом реакции иммунофлуоресценции на проточном цитометре.

Высокотехнологичные молекулярно-генетические исследования в онкологии: опыт анализа когорты больных раком поджелудочной железы

П.А. Шаталов¹, Н.А. Фалалеева¹, Е.А. Быкова¹,
Д.О. Коростин², В.А. Белова², А.П. Шинкаркина¹,
А.Ю. Горбачев³, П.В. Шегай¹, А.Д. Каприн¹

¹ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва;

²Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

³Zenote. io LTD

Введение. Лекарственная терапия является основным методом лечения рака поджелудочной железы, однако биологические особенности опухоли обуславливают ее умеренную чувствительность к стандартным режимам химиотерапии. С целью выявления значимых молекулярно-генетических аномалий с последующим их использованием для разработки/подбора препаратов направленного действия все чаще используются методики секвенирования нового поколения (NGS).

Цель исследования — изучение молекулярно-генетических характеристик образцов опухоли больных раком поджелудочной железы методом NGS.

Материалы и методы. Анализу подвергнуты образцы опухоли 23 больных раком поджелудочной железы. Группа включала 13 мужчин и 10 женщин, медиана возраста — 64 года.

Результаты. При определении статуса микросателлитной нестабильности во всех случаях выявлен фенотип опухоли со стабильной системой репарации ДНК (MSS). В анализируемых образцах наблюдали различный уровень мутационной нагрузки — в диапазоне от 1,76 до 32,44 ТМБ. При уровне ТМБ 8/Мб и более (6 пациентов) показатели выживаемости без прогрессирования во всех случаях превышали 12 мес. При анализе мутационного профиля опухоли показатель варьировал от 493 до 5000 соматических мутаций (среднее 1603 ± 933). У 4 пациентов были выявлены соматические мутации 1-го класса патогенности. У 3 (13 %) пациентов опухоль характеризовалась наличием мутации в гене *KRAS*. Мутация в гене *P53* была обнаружена у 1 (4,3 %) пациента. Не было выявлено других, часто встречающихся при раке поджелудочной железы, генетических аномалий в генах *SMAD4* и *CDKN2A*, а также относительно часто встречающихся мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *KMT2C*, *PALB*. В 12 (52,1 %) образцах выявлена соматическая мутация 3-го класса в гене *PABPC1*, в 3 (13 %) — мутация в гене *FOXO1*. Обе мутации имели прогностическое значение при расчете показателей общей и беспрогрессивной выживаемости в данной выборке пациентов.

Выводы. Полученные результаты NGS среди российской популяции больных раком поджелудочной железы несколько отличаются от результатов зарубежных авторов и нуждаются в подтверждении на большем количестве материала. Тогда же станет возможным достоверно определить клиническое значение выявленных повторяющихся мутации предпринять попытку разработки новых препаратов направленного действия с учетом обнаруженных корреляций.

Сравнительный анализ содержания микроРНК в экзосомах секрета гастродуоденального сосочка у пациентов с раком поджелудочной железы и острым панкреатитом

К.Г. Шевченко, Н.А. Барлев

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва

Введение. Опухоли поджелудочной железы составляют значительную долю в структуре смертности от злокачественных новообразований, отличаются низкой выявляемостью на ранних стадиях и крайне плохо поддаются лечению. Несмотря на активно ведущийся поиск маркеров заболевания, прогресс в этой области весьма ограничен. В последние годы были разработаны методы для прямого отбора секрета гастродуоденального сосочка при помощи катетера на основе гастроскопического зонда. Получаемый с его помощью биоматериал на сегодняшний день остается малоизученным, однако теоретически он может быть использован для ранней высокоспецифичной диагностики рака.

Материалы и методы. В исследование вошли 5 пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы (III–IV стадии), 5 пациентов с острым панкреатитом. Материалом для исследования служили образцы секрета гастродуоденального сосочка, полученные с использованием изолирующего шунтирующего катетера Изикат (Пандэкс, Россия). Методом дифференцированного ультрацентрифугирования из образцов выделены экзосомы, которые затем были охарактеризованы различными физическими и биологическими методами. Из экзосом была также выделена тотальная РНК набором RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Германия). Далее полученный генетический материал изучался методами секвенирования и ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. По результатам исследования в секрете гастродуоденального сосочка в обеих группах были выявлены экзосомы в сопоставимых концентрациях. По данным динамического светорассеяния и сканирующей электронной микроскопии их размер также не отличался друг от друга. Далее был проведен анализ

их биохимического состава для оценки потенциальной возможности их использования для дальнейшего изучения. Из обнаруженных потенциальных мишеней для ранней диагностики наиболее перспективными являются микроРНК. Таким образом, на следующем этапе исследования была проведена каталогизация существующего пула микроРНК, а также их сравнительный анализ в двух группах пациентов.

Выводы. Изучен спектр и проведен сравнительный анализ микроРНК в экзосомах секрета гастродуоденального сосочка у пациентов с раком поджелудочной железы и острым панкреатитом.

Работа выполнена при поддержке госзадания по тематике «Исследование фармакологических мишеней, биологически активных соединений и систем их доставки в организм человека».

Поиск биомаркеров глиобластомы на основе протеомного анализа состава экзосом, секретируемых клетками глиом *in vitro*

Т.А. Штам^{1,3,6}, А.В. Волницкий^{1,3}, Л.А. Гараева^{1,3,5}, Р.А. Камышинский³, А.Т. Копылов², Е.С. Зорина², В.Ю. Байрамуков¹, А.С. Спицына¹, А. Шлихт⁴, С.Н. Нарыжный^{1,2}

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва;

³ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва;

⁴Дальневосточный федеральный университет, Владивосток;

⁵ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»;

⁶ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург

Введение. Экзосомы участвуют в основных процессах развития злокачественных глиом, включая злокачественную трансформацию, манипуляцию иммунным ответом, ангиогенез и инвазию. Экзосомы, секретируемые клетками глиобластомы, могут преодолевать гематоэнцефалический барьер и переносить молекулярный груз, полученный из опухоли, в периферическое кровообращение. Таким образом, определение молекулярного состава экзосом, высвобождаемых клетками глиобластомы, представляется перспективным подходом для разработки неинвазивных методов обнаружения специфических маркерных экзосомальных белков в периферической крови.

Цель исследования — определение общих экзосомных белков, представленных в препаратах из разных клеточных линий, и поиск потенциальных биомаркеров глиобластомы в экзосомах.

Материалы и методы. С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения мы провели протеомный анализ внеклеточных везикул, выделенных из кондиционированной среды 5 линий глиобластом. Везикулы были выделены методом ультрацентрифугирования и охарактеризованы по размеру, количеству и морфологии с помощью динамического светорассеяния, анализа траектории наночастиц, атомно-силовой и криоэлектронной микроскопии.

Результаты. Анализ данных масс-спектрометрии выявил 133 белка, содержащихся в экзосомах всех 5 линий глиом. Соотнося каждый белок с его основной функцией, были выявлены целые группы белков, которые связаны как с процессами, происходящими в опухолевых клетках, так и с возможными функциями секретируемых ими экзосом. Так, особое место занимает группа белков, регулирующих межклеточные контакты. Эти белки могут влиять на микроокружение опухолевых клеток, способствуя таким патологическим процессам как инвазия, ангиогенез и манипулирование иммунным ответом. Некоторые из них, например Annexin A2 (ANXA2), CD44 и Tenascin-C (TNC), могут рассматриваться как перспективные онкомаркеры, так как наличие их в крови коррелирует со степенью злокачественности опухоли.

Выводы. В результате исследования белкового состава (протеом) экзосом, секретируемых клетками глиом, в модельной системе клеточной культуры были выявлены несколько белков, которые экспрессируются в повышенных количествах в глиомных клетках — продуцентах экзосом. Таким образом, предложена панель из 11 белков (KPYM, ANXA1, TPIS, VIME, ANXA2, TERA, ENOA, PRDX1, G3P, HS90B, 1433E), потенциально являющихся маркерами глиобластомы.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 19-74-20146).

Выявление и характеристика больных гастроинтестинальными стромальными опухолями с дефицитом сукцинатдегидрогеназы В (SDHB)

В.В. Югай, Н.А. Козлов, Н.Н. Мазуренко, М.П. Никулин, П.П. Архири, И.С. Стилиди

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

Введение. Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) — наиболее распространенные саркомы желудочно-кишечного тракта, для которых характерна высокая частота мутаций в генах *KIT* и *PDGFRA*. 15 % ГИСО не имеют мутаций (*KIT*/*PDGFRA* WT, ГИСО дикого типа) и представляют собой гетерогенную группу опухолей по клиническим и молекулярным характеристикам. ГИСО дикого типа включают случаи с активацией генов *MAP* и *PI3K* — сигнальных путей, а также ГИСО с дефицитом сукцинатдегидрогеназы (SDH). Дефицит SDH вызывает неконтролируемую пролиферацию клеток и неоангиогенез. В группу ГИСО с дефицитом SDH входят пациенты с триадой Карнея, синдромом Карнея—Стратакиса и спорадические случаи, редко отвечающие на лечение иматинибом. Выявление пациентов ГИСО с дефицитом SDH позволит более эффективно применять таргетную терапию.

Цель исследования — выявить и изучить клинкоморфологические особенности ГИСО с дефицитом SDHB.

Материалы и методы. При исследовании 244 ГИСО были выявлены 45 ГИСО дикого типа, из которых 20 опухолей не имели мутаций в генах *BRAF*, *NFI*, и образцы тканей были доступны для иммуногистохимического исследования. Проведен анализ экспрессии субъединицы В (SDHB) с использованием моноклональных антител (клон EP288, Epitomics, 1:2000). Нарушение экспрессии SDHB является маркером инактивации функции комплекса SDH.

Результаты. Всего 13 случаев ГИСО были с дефицитом SDHB из 20 исследованных ГИСО дикого типа. Возраст пациентов варьировал от 13 до 69 лет с медианой 32 года. Превалировали женщины (11 больных), у 3 пациенток выявлена неполная триада Карнея (ГИСО и хондрома легких) и у 1 — полная триада (ГИСО, хондрома легких и параганглиома). У всех пациентов опухоль локализовалась в желудке, у 4 отмечено мультицентрическое поражение. Размер первичной опухоли варьировал от 1 до 17 см, средний размер — 8,1 см. Большинство пациентов обращались с клиникой желудочно-кишечного кровотечения и болевым синдромом. Веретеноклеточное строение клеток наблюдалось в 5 случаях, эпителиоидноклеточное — в 2 и смешанное строение — в 6. В половине случаев ГИСО отмечено

более 5 митозов в 50 полях зрения (х 400). У 2 пациентов выявлены отдаленные метастазы по брюшине, у 1 — метастазы в печени, а также синхронное поражение печени и брюшины выявлено у 3 пациентов. Поражение парагастральных лимфоузлов отмечено у 5 пациентов. 10-летняя выживаемость у данной группы пациентов — 82 %.

Выводы. ГИСО с дефицитом SDH — редкие опухоли ГИСО дикого типа, которые выявляют преимущественно у молодых пациентов. Опухоль локализовалась исключительно в желудке с возможным поражением парагастральных лимфоузлов. В половине случаев выявлялись отдаленные метастазы по брюшине и в печени. При этом данная группа пациентов характеризуется низким митотическим индексом, достаточно длительным периодом течения заболевания.

Молекулярно-генетические особенности и факторы прогноза гастроинтестинальных стромальных опухолей

В. В. Югай, Н. Н. Мазуренко, И. В. Цыганова,
М. П. Никулин, Н. А. Козлов, П. П. Архири, И. С. Стилиди
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) — наиболее распространенные саркомы желудочно-кишечного тракта, для 95 % которых характерна экспрессия CD117 (KIT). Более 80 % ГИСО содержат мутации *KIT* и *PDGFRA*, кодирующих рецепторные тирозинкиназы. В ГИСО с *KIT/PDGFRA* дикого типа (ГИСО WT) выявляется широкий спектр генетических нарушений. Анализ мутаций определяет чувствительность опухолей к ингибиторам тирозинкиназы и имеет не только предиктивное, но и прогностическое значение.

Цель исследования — изучение клинико-морфологических и генетических характеристик российских больных ГИСО с оценкой отдаленных результатов.

Материалы и методы. Мутации *KIT* (9, 11, 13, 17 экз.) и *PDGFRA* (12, 14, 18 экз.) определяли в ПЦР с прямым секвенированием в препаратах ДНК, полученных из опухолевых клеток с парафиновых срезов операционных биопсий от 244 пациентов с ГИСО. В ГИСО WT

исследовали мутации *BRAF*, *NF1* и экспрессию сукцинатдегидрогеназы В (SDHB), дефицит которой является маркером инактивации функции комплекса SDH. Проведено сопоставление генетических и клинико-морфологических данных для оценки общей выживаемости пациентов, получивших комбинированное лечение.

Результаты. ГИСО локализовались в желудке у 50 % ($n = 122$) пациентов, в тонкой кишке — у 37,7 % ($n = 92$), в толстой кишке — у 6,1 % ($n = 15$), в пищеводе — у 0,4 % ($n = 1$). Внеорганные ГИСО выявлены у 5,7 % ($n = 14$) больных. Большинство пациентов — женщины 59,4 % ($n = 145$) и их общая выживаемость выше, чем мужчин ($p = 0,010$), медиана возраста — 56 лет. Прогноз зависит от локализации и размера опухоли, количества митозов. Общая выживаемость пациентов с ГИСО желудка и прямой кишки выше, чем тонкой кишки ($p = 0,008$).

Мутации *KIT* выявлены в 68,9 % ($n = 168$) ГИСО, а *PDGFRA* — в 12,7 % ($n = 31$). В 45 ГИСО мутации не выявлены. Большинство пациентов имели мутации в 11-м экзоне *KIT* — 57,4 % ($n = 140$). Общая выживаемость была хуже у пациентов с делециями (медиана общей выживаемости (меОВ) — 113 мес), чем с точечными заменами (меОВ — 179 мес, $p = 0,018$) и инсерциями (меОВ не достигнута). Среди всех ГИСО наилучший прогноз у больных с дупликациями в 9-м экзоне *KIT* 9,0 % ($n = 22$), преимущественно в ГИСО тонкой кишки (меОВ — 71 мес). В отличие от *KIT*, мутации *PDGFRA* преимущественно выявлены в ГИСО желудка и отсутствовали в опухолях пищевода, 12-перстной и прямой кишки. Мутации выявлены в 18-м (8,6 %, D842V — 5,3 %) и 12-м (4,1 %) экзонах *PDGFRA*. Выживаемость таких больных выше (меОВ не достигнута), чем пациентов с мутациями *KIT*.

В двух ГИСО WT тонкой кишки выявлена мутация *NF1* (синдром нейрофиброматоза 1 типа). Мутация *BRAFV600E* обнаружена в 6 (13,3 %) ГИСО WT желудка и тонкой кишки. В 13 ГИСО WT, локализованных в желудке, выявлен дефицит SDHB. В группу входили молодые женщины, 4 из которых имели синдромы Карнея. В целом, пациенты ГИСО WT характеризуются более благоприятным прогнозом (меОВ — 250 мес), чем пациенты с мутациями *KIT/PDGFRA*.

Выводы. Подтверждено клинико-морфологическое и генетическое многообразие ГИСО у российских больных, выявлены редкие мутации и дефицит SDHB, впервые проведена оценка 10- и 20-летней общей выживаемости пациентов с комбинированным лечением.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

Доклады

Использование восстановления меди N-ацетилцистеином и аскорбатом для преодоления лекарственной устойчивости опухолевых клеток

Н.А. Агаджанян¹, С.А. Цымбал¹, М.С. Духинова¹,
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

Введение. Лекарственная устойчивость опухолевых клеток — актуальная угроза при подборе таргетной терапии, которая требует более детального изучения. При проявлении устойчивого фенотипа происходит существенное снижение эффективности прежнего подхода к лечению. Дальнейшее прогрессирование заболевания требует применять средства, имеющие более широкое воздействие на опухоль, которое не зависит от механизма сформированной устойчивости.

Медь участвует в метастазировании, регуляции пролиферации злокачественных клеток, играет немаловажную роль в поддержании баланса окисления и восстановления. Известно, что метаболизм меди в раковых клетках нарушен, это можно использовать при создании новой онкотерапии.

Цель исследования — изучить комбинации различных соединений меди с антиоксидантами (аскорбат и N-ацетилцистеин), обладающие синергическим эффектом и цитотоксичностью для опухолевых клеток с фенотипом лекарственной устойчивости.

Материалы и методы. Для оценки цитотоксичности антиоксидантов и медь-органических комплексов применялся метод МТТ-теста. Таргетные резистентные клеточные линии: серозной цистаденокарциномы яичников SKOV-3/CDDP, ХМЛ K562/4, аденокарциномы толстой кишки HCT116 p53-/-. Методом Дж.Л. Элмана и электрохимическим анализом выявлено понижение концентрации тиоловых (-SH) групп. Велся контроль

уровня экспрессии генов, участвующих в метаболизме меди и элиминации АФК (SOD, ATOX1, CAT, CTR1).

Результаты. Обнаружено, что комбинирование различных соединений меди с антиоксидантами (аскорбат и N-ацетилцистеин) приводит к синергическому эффекту и уничтожению популяции опухолевых клеток, даже обладающих фенотипом лекарственной устойчивости. Клеточная смерть обнаружена для резистентных клеточных линий серозной цистаденокарциномы яичников SKOV-3/CDDP, ХМЛ K562/4, а также аденокарциномы толстой кишки HCT116 p53-/-. Замена меди в органических соединениях на другие металлы не приводила к столь выраженному эффекту. Метод Дж.Л. Элмана позволил выявить, что при добавлении соединений, содержащих медь, происходит снижение концентрации тиоловых (-SH) групп, что косвенно указывает на их окисление и восстановление меди. Данный вывод подтвержден электрохимическим анализом. Повышенный уровень экспрессии генов, участвующих в метаболизме меди и элиминации АФК (SOD, ATOX1, CAT, CTR1) обнаружен спустя 24 ч после добавления медь-органического комплекса с N-ацетилцистеином в клеточную среду.

Первые данные получены в опытах на животных. Следующий этап доклинических испытаний будет проводиться с использованием модели полостных метастазов на лабораторных мышах.

Заключение. Использование комбинаций медь-органических соединений и восстановителей — перспективное потенциальное средство повышения эффективности методов борьбы с онкологическими заболеваниями, особенно в терапии форм с приобретенной МЛУ. В случае успешной реализации экспериментов наше исследование станет на шаг ближе к открытию нового ХТ-агента для противоопухолевой терапии, особенно эффективного в популяции с лекарственной устойчивостью.

Билатеральный синхронный рак молочной железы: клинко-эпидемиологическая характеристика женщин в Республике Мордовия по данным регионального канцер-регистра

А.З. Альмяшев, Д.А. Фомин, М.И. Костина

ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», Саранск

Введение. Билатеральный рак молочной железы (БРМЖ) характеризуется тенденцией к росту заболеваемости, в связи с этим представляется крайне важным изучение данной формы рака. С каждым годом увеличивается фундамент научных знаний и клинического опыта в данной сфере, в том числе новых молекулярно-генетических исследований.

Цель исследования — сбор информации в ходе клинко-эпидемиологического исследования женщин с диагнозом БРМЖ в Республике Мордовия.

Материал и методы. Проведен клинко-эпидемиологический анализ выборки из 93 пациенток с синхронным БРМЖ (2-я опухоль после 1-й в интервале 6–8 мес) из базы данных канцер-регистра Республики Мордовия. Данная группа пациенток составляет около 0,12 % от всех онкобольных, находящихся на учете в региональном канцер-регистре. Проживающих в городской местности — 68 %, в сельской — 32 % пациенток. Средний возраст в выборке на момент установления диагноза — 58 лет.

Результаты. Доля женщин с установленным диагнозом БРМЖ в возрасте до 40 лет — 12 %, от 40 до 75 лет — 76 %, старше 75 лет — 12 %. Распределение стадий заболевания в анализируемой группе: I стадия — 10 (10,8 %), II стадия — 46 (49,5 %), III стадия — 14 (15 %), IV стадия — 21 (22,6 %), стадия не установлена — 2 (2,1 %) пациентки. Доля больных с запущенным БРМЖ — 37,6 %. Умерло в разные сроки 56 женщин с БРМЖ: онкоспецифическая летальность — 44 (47,3 %), показатель летальности от иных причин — 12 (14 %) пациенток. Медиана общей выживаемости в выборке — 7 лет. Показатель общей 1-годовой выживаемости — 82 %, 3-летней общей выживаемости — 59 %, 5-летней общей выживаемости — 47 %.

Заключение. Отмечается тревожная тенденция роста запущенности БРМЖ у пациенток в Республике Мордовия, поздней диагностики и низкой 5-летней общей выживаемости. Резкое повышение эффективности химиотаргетной терапии и применение органосохраняющих функционально-щадящих операций возможно на сегодняшний день при ранней диагностике заболевания, к которой следует стремиться.

Усиление мезенхимально-эпителиального перехода посредством чередования 2D- и 3D-культивирования

Е.С. Анчакова, Е.В. Петерсен, Е.Ю. Скорова, Е.Ю. Шабалина

ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный

Цель исследования — оценка признаков мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП) при исследовании миграции 3D-клеточной культуры A549 при многократном чередовании 2D- и 3D-культивирования.

Материалы и методы. Сфероиды из культуры клеток A549 (200 кл/сфероид) высаживались на пластик 96-луночного планшета по стандартному протоколу и культивировались до получения гипермонослоя. Затем клетки пересаживались на чашку Петри. Цикл повторялся 4 раза. Среднее время цикла — 38 дней. Поведение клеток оценивали по изменению значений средней площади проекции (СПП) сфероида на пластике во временных точках контроля — 0 и 24 ч.

Результаты. Отмечено, что СПП сфероидов конечного цикла в точке 0 ч достоверно уменьшилась на 51 % ($p < 0,0001$, t -test). Через 24 ч после высадки сфероидов на пластик наблюдалось выраженное снижение СПП (относительно 1-го цикла) на протяжении 1–4 циклов: на 34 %, затем на 50 % и на 87 % ($p < 0,0001$, ANOVA). Таким образом, при увеличении номера цикла заметна тенденция к уменьшению как размеров сфероидов, так и относительной СПП в точке 24 ч. Сокращение СПП может достигаться за счет уменьшения числа делений или снижения скорости миграции клеток. Исследования А.К. Rustgi и соавт. (2020) показали, что при МЭП скорость пролиферации возрастает при снижении скорости миграции. Поскольку при 2D-культивации на пластике не наблюдалось снижения пролиферативной активности, уменьшение СПП возможно за счет снижения скорости миграции, что служит признаком МЭП. Это может означать, что при чередовании 2D- и 3D-условий усиливается МЭП.

Изменение относительного размера сфероида в 1-м и 4-м циклах тоже может свидетельствовать об увеличении числа клеток, совершивших МЭП. Использование параллельного 2D- и 3D-культивирования позволяет получать более точные результаты по МЭП за счет расширения совокупности учитываемых параметров. Последовательное уменьшение СПП при сохранении скорости пролиферации говорит о снижении скорости миграции и свидетельствует об увеличении интенсивности МЭП в процессе чередования 2D- и 3D-культивирования.

Заключение. Изучение механизмов эпителиально-мезенхимального и мезенхимально-эпителиального

переходов позволяет лучше понять природу метастазирования и способствует развитию персонализированного подхода к противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (№ 18-15-00391) на оборудовании ЦКП «Прикладная Генетика» МФТИ (соглашение № 075-15-2021-684).

Экспрессия ряда генов иммунных контрольных точек при светлоклеточном почечно-клеточном раке и ее связь с прогрессией заболевания

Н.В. Апанович¹, А.А. Алимов¹, П.В. Апанович¹,
Д.Ж. Мансорунов¹, А.Ю. Кузванова¹, А.А. Коротаева¹,
В.Б. Матвеев², А.В. Карпухин¹

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

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

Введение. Иммуноterapia злокачественных опухолей на основе ингибирования иммунных контрольных точек (ИКТ) относится к наиболее перспективным терапевтическим способам. Однако доля больных, отвечающих на такую терапию, пока не высока. Это может быть связано с действием иных ИКТ, помимо блокируемых.

Цель исследования — изучить функциональные особенности генов в опухоли светлоклеточного ПКР, которые могут быть связаны с недостаточной эффективностью блокирования PD-L1.

Материалы и методы. Методом ПЦР-РВ определяли и сравнивали уровни экспрессии 8 генов иммунных контрольных точек в парных (опухоль — норма) образцах светлоклеточного ПКР.

Результаты. При изучении экспрессии 8 генов (*PD-L1*, *IDO1*, *CEACAM1*, *PVR*, *TDO2*, *CD276*, *GAL9* и *ADAM17*) в образцах светлоклеточного ПКР выявили, что при повышенной экспрессии *PD-L1* одновременно экспрессируется 5 генов — *IDO1*, *TDO2*, *CD276*, *GAL9* и *ADAM17*. Частота их экспрессии превышает или равна частоте экспрессии *PD-L1* (36,7 %). Значимую корреляцию с экспрессией *PD-L1* продемонстрировала экспрессия генов *ADAM17*, *PVR* и *CD276* ($R = 0,74; 0,39; 0,38$ соответственно). Профиль экспрессии меняется в зависимости от стадии. Значимую связь со стадиями развития опухоли по ROC-анализу и точному критерию Фишера показали гены *IDO1*, *PVR* и *GAL9* ($p = 0,022; 0,009; 0,001$ соответственно). Экспрессия данных генов различается на разных стадиях также по U-критерию (p в интервале от 0,039 до 0,047). При этом *IDO1* и *GAL9* увеличивают уровень экспрессии на IV стадии, в то время как ген *PVR* — снижает.

Заключение. Получены данные о корреляции экспрессии *PDL1* с экспрессией ряда генов, связанных

с регуляцией иммунного ответа. Такие гены — кандидаты на блокирование иммунного ответа при ингибировании *PD-L1*. Выявлена зависимость профилей экспрессии генов ИКТ от стадии развития опухоли. Гены, повышающие уровень экспрессии при переходе в метастатическую стадию, могут рассматриваться в качестве перспективных ИКТ-мишеней терапии на данной стадии. Результаты могут иметь принципиальное значение для дальнейшего развития и повышения эффективности противоопухолевой терапии на основе блокирования ИКТ.

Различные неврологические симптомы у NSG-SGM3-мышей, несущих острый миелоидный лейкоз PDX или клеточные линии острого миелоидного лейкоза

Е.В. Байдюк¹, Л.Л. Гиршова², Е.В. Щелина²,
М.Л. Васютина², Е.В. Белоцерковская¹, А.В. Петухов^{1,2},
С.А. Силов¹, К.А. Левчук², А.Ю. Зарицкий²,
О.Н. Демидов^{1,2,3}

¹ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;

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

³INSERM U1231, Университет Бургундии,
Дижон, Франция

Введение. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — частая гематологическая злокачественная опухоль, характеризующаяся высокой летальностью. В последнее время модели ксенографтов, полученных от пациентов (PDX) и привитых иммунодефицитным мышам, значительно улучшили процесс сохранения опухолевых тканей для биомедицинских исследований. Для повышения эффективности трансплантации разработана модель мышей с γ -иммунодефицитом (NSG), несущих трансгенную вставку человеческих цитокинов (NSG-SGM3).

Цель исследования — описание PDX-модели ОМЛ в сравнении с ксенографтами клеточных линий ОМЛ человека на мышах NSG-SGM3.

Материалы и методы. Мононуклеарная фракция клеток костного мозга от 4 пациентов с ОМЛ, проходящих лечение в НМИЦ им. В.А. Алмазова, выделена методом градиентного центрифугирования. Клетки от каждого пациента вводили в латеральную хвостовую вену мышам NSG-SGM3. Аналогично вводились клеточные линии OCI-AML2 и HL60. Эффективность трансплантации контролировали с помощью анализа формулы крови, ПЦР и FACS-анализа.

Результаты. Все образцы с клеточными линиями ОМЛ успешно привиты мышам NSG-SGM3. Приживление опухолевых клеток от пациентов с ОМЛ оказалось достигнуто только для 50 % трансплантированных образцов. Успешная трансплантация подтверждалась

увеличенным числом лейкоцитов (более чем в 10 раз) в крови мышей, положительной реакцией ПЦР на специфичную для человека область гена *PPM1D* и наличием CD45⁺ положительных клеток человека в кровотоке. Более агрессивно болезнь протекала у мышей с введенными клеточными линиями ОМЛ. У животных наблюдались множественные новообразования (подкожные, внутримышечные, висцеральные) и симптомы нейрорлейкимии. Невропатические симптомы проявлялись как в поведении мышей — апатия, нарушение координации, так и в заметных физических расстройствах — паралич задних конечностей (AML2), асимметрия черепа, энофтальм (HL60).

Закключение. Клеточные линии ОМЛ OCI-AML2 и HL60 имеют высокую частоту успешной трансплантации и приводят к более агрессивному течению заболевания, подобному ОМЛ, у мышей NSG-SGM3, в отличие от первичного PDX ОМЛ. Нейрорлейкоз может быть успешно смоделирован клеточными линиями AML, но не первичным PDX AML. Первичные PDX для лечения ОМЛ без предварительного культивирования *in vitro* могут быть лучшей (более подходящей) моделью для разработки персонализированного лечения пациентов с ОМЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-75-20128).

Особенности лечения больных хроническим лимфолейкозом в Кыргызской Республике

А.М. Бейшембаев, А. Курманбекова

Кыргызский государственный медицинский институт переподготовки и повышения квалификации им. С.Б. Даниярова, Бишкек, Кыргызская Республика

Введение. Лечение больных ХЛЛ постоянно дополняется новыми протоколами, совершенствуются методики лечения. Эффективность лечения и прогноз заболевания для различных методик, которые применяются на данный момент в Кыргызстане, пока мало изучена.

Цель исследования — изучить особенности лечения хроническим лимфолейкозом в Кыргызской Республике.

Материалы и методы. Исследовано 20 больных с В-клеточным ХЛЛ (В-ХЛЛ) с установленными клинико-лабораторными показателями (лейкоцитоз, абсолютный лимфоцитоз, лимфоидная метаплазия костного мозга, лимфоаденопатия, гепатоспленомегалия). Среди них 12 пациентов мужского пола (средний возраст 64 ± 2 года), 8 — женского (средний возраст 68 ± 2 года). Проведена оценка результатов лечения.

Результаты. В условиях отделения онкогематологии Кыргызского государственного медицинского института переподготовки и повышения квалификации им.

С.Б. Даниярова проведены для 30 % пациентов флударабин-содержащие курсы: FC — флударабин, циклофосфан; FCR — флударабин, циклофосфан и ритуксимаб. Остальные больные получали стандартные курсы полихимиотерапии. На фоне FC и FCR достигнута полная или частичная ремиссия. Но у 2 пациентов с наличием CD38 развился ранний рецидив (в течение 6 мес после лечения). Общий ответ среди первичных пациентов, получающих FC- и RFC-терапию, составил 69 %, среди пациентов, получающих монотерапию хлорамбуцилом, — 57 %. Полная ремиссия отмечена у 4, частичная — у 2 пациентов соответственно.

Закключение. Лечение больных В-ХЛЛ с флударабин-содержащими курсами более эффективна, чем хлорамбуцилом, однако при наличии CD38 эффективность указанных протоколов низкая.

Иммунофенотипические особенности у больных хроническим лимфолейкозом в Кыргызской Республике

А.М. Бейшембаев, А. Курманбекова

Кыргызский государственный медицинский институт переподготовки и повышения квалификации им. С.Б. Даниярова, Бишкек, Кыргызская Республика

Введение. Современная диагностика В-ХЛЛ основывается на определении соответствующих маркеров, которые выявляются с помощью иммунофенотипирования лимфоцитов. На данный момент тема иммунофенотипических особенностей больных с В-ХЛЛ в Кыргызской Республике не изучена.

Цель работы — исследовать иммунофенотипические особенности больных с В-ХЛЛ в Кыргызстане.

Материалы и методы. Изучено 20 больных с В-ХЛЛ. Среди них 12 пациентов мужского пола (средний возраст 64 ± 2 года), 8 — женского (средний возраст 68 ± 2 года). У больных сделан забор костного мозга в объеме 4,0 мл, пунктат исследован в лаборатории «LabTest» в Бишкеке на проточном цитометре Beckman Coulter Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием MA Beckman Coulter.

Результаты. У 50 % обследованных пациентов выявлен В-ХЛЛ с помощью соответствующих иммунофенотипических маркеров CD5, CD19, CD20, CD22, CD23 с коэкспрессией CD25. У 40 % пациентов обнаружен мутационный маркер CD38, который определяет ответ на лечение или общую выживаемость пациентов с ХЛЛ. Наличие данного маркера указывает на плохой прогностический признак. При В-ХЛЛ наблюдается широкий спектр интенсивности CD45, а также тот факт, что экспрессия CD19 выше, чем у CD20. Экспрессия CD23 — важнейший маркер при дифференциальной диагностике с лимфомой зоны

мантии. Ключевые маркеры при В-ХЛЛ — экспрессия CD5⁺, CD10⁺, CD23⁺. Каждый клон лейкоэмических клеток экспрессирует легкие каппа- или лямбда-цепи иммуноглобулинов. Патогномичным признаком для В-ХЛЛ служат коэкспрессия CD19, CD20, CD5, CD23 и экспрессия иммуноглобулинов в мономорфной популяции малых лимфоидных клеток. В наших исследованиях также обнаружено 10 % атипичных форм ХЛЛ.

Заключение. Иммунофенотипический анализ особенностей группы пациентов в Кыргызстане показал, что встречаемость заболевания В-ХЛЛ выше, чем Т-клеточной формы. У 42,2 % пациентов выявлен маркер CD38, указывающий на плохой прогностический признак.

Модуляция активности противоопухолевых цитостатиков и их комбинаций с донором оксида азота – серосодержащим антиоксидантом, производным алкилированных фенолов ТС-13

Т.Н. Богатыренко¹, Н.В. Кандалинцева², Т.Е. Сашенкова¹,
У.Ю. Аллаярова¹, Д.В. Мищенко¹

¹ФГБУН «Институт проблем химической физики РАН»,
Черноголовка;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный педагогический университет»

Введение. Известно, что различные редокс-активные соединения оказывают синергическое воздействие, в частности антиоксиданты и оксид азота. Химические пути редокс-активных соединений связаны и обладают способностью усиливать или блокировать действия друг друга. Используемые в ХТ онкозаболеваний препараты зачастую усиливают генерацию АФК, влияя тем самым на редокс-гомеостаз. Модулируя редокс-состояния опухолей, можно влиять на действие различных цитостатиков на опухолевый процесс. Использование новых стратегий ХТ (метрономной) также может улучшить терапевтический диапазон действия цитостатиков за счет оптимального баланса между их активностью и токсичностью.

Цель исследования — изучение взаимодействия комбинации полифункционального серосодержащего фенольного антиоксиданта ТС-13 с донором оксида азота (NaNO₂) и противоопухолевыми цитостатиками — цисплатином, адриамицином, и циклофосфаном.

Материалы и методы. Противоопухолевую активность изучали на лимфолейкозе P388 мышей линии BDF1. Критериями эффективности лечения служили выживаемость и индекс увеличения средней продолжительности жизни (ILS, %) животных-опухоленосителей.

Результаты. Модулирующее действие ТС-13 и NaNO₂ при разных режимах введения препаратов и с разными

цитостатиками проявлялось по-разному: от цитопро- текторного (циклофосфан и цисплатин) до прооксидантного (адриамицин).

Заключение. Выявлено, что хемосенсибилизаторы ТС-13 и NaNO₂ обладают способностью усиливать или блокировать действие друг друга в зависимости от комбинации цитостатиков и редокс-состояния тканей, на которые направлено их действие.

*Работа выполнена в рамках госзадания
№АААА-А19-119071890015-6.*

Активация FGF-сигнального пути – перспективный прогностический маркер резистентности гастроинтестинальных стромальных опухолей к иматинибу мезилату

С.В. Бойчук¹, Е.Г. Михеева¹, А.Р. Галембикова¹,
А.Г. Сабиров², Р.С. Куртасанов², С.В. Петров², Д. Халиков²,
П.Б. Копнин³

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России;

²ГАОУ «Республиканский клинический онкологический диспансер им. проф. М.З. Сигала» МЗ РТ, Казань;

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

Введение. Несмотря на высокую эффективность таргетного препарата иматиниба мезилата (ИМ) — препарата 1-й линии терапии пациентов с ГИСО — у более 50 % больных развивается вторичная резистентность ГИСО к ИМ, спустя 2 года после начала проведения таргетной терапии. Вторичная резистентность может быть связана с рядом механизмов, включая вторичные мутации в генах *KIT/PDGFR*, амплификацию гена *IGF-1* инсулиноподобного фактора роста I, гиперэкспрессию киназы фокальной адгезии FAK, потеря экспрессии с-KIT в сочетании с гиперэкспрессией MET/AXL/FGFR2α и др.

Цель исследования — изучить влияние таргетной терапии ИМ на уровень экспрессии *FGFR1/2* и их лиганда FGF-2 в первичных ГИСО желудка.

Материалы и методы. В исследование включены пациенты с ГИСО, не получавшие таргетную терапию ИМ (*n* = 46), а также больные, получавшие ИМ в течение не менее 12–16 мес (*n* = 14). Уровень экспрессии *FGFR1/2* и *FGF-2* в образцах ГИСО проводили ИГХ-методом, а также методом вестерн-блоттинга. Образцы ГИСО также исследованы на наличие мутаций в генах *KIT* (экзоны 9, 11, 13 и 17) и *PDGFR*. Корреляционный анализ между экспрессией данных маркеров, группами риска и локализацией опухоли у пациентов с ГИСО проведен с применением t-критерия Стьюдента, критерия Манна–Уитни — Уилкоксона и Фишера.

Результаты. Корреляции между экспрессией *FGFR1*, 2 и *FGF-2* и локализацией опухоли, между мутационным статусом *KIT/PDGFR* и группой риска у пациентов с ГИСО, ранее не получавших лечения, отсутствовали ($p > 0,05$, тест Фишера). Также не выявлена корреляция между экспрессией *FGFR1*, 2 и *FGF-2* и возрастом ($p > 0,05$, ANOVA), а также связываемостью пациентов с ГИСО ($p > 0,05$, тест Каплана-Мейера). Мы обнаружили высокую корреляционную зависимость между экспрессией *FGF-2* в образцах ГИСО и лечением ИМ ($p = 0,01275$, тест Фишера). Данный результат свидетельствует о способности ИМ активировать FGF-сигнальный путь *in vivo*. Более того, экспрессия ядерной низкомолекулярной (18 кДа) формы FGF-2 обнаружена в подавляющем большинстве образцов ГИСО с высоким риском (6-я прогностическая группа). В то время как ГИСО с 1–5-й прогностическими группами экспрессировали преимущественно высокомолекулярные формы FGF-2 (22; 22,5; 24; 34 кДа), тем самым подчеркивая важную регуляторную роль FGF-2-опосредованной передачи сигналов в патогенезе ГИСО.

Закключение. В совокупности наши данные свидетельствуют о способности ИМ активировать FGF-сигнальный путь в ГИСО *in vivo*, а также о важной роли FGF-2 в развитии резистентности ГИСО к ИМ. Гиперэкспрессия FGF-2 в ГИСО может рассматриваться как потенциальный прогностический маркер заболевания и перспективная мишень для таргетной терапии.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-015-00034 А).

МК2206 – ингибитор АКТ-сигнального пути, сенситизирует клеточные линии остеосаркомы к ингибитору ДНК-топоизомеразы II типа

С.В. Бойчук, А.Р. Галембикова, Ф.Ф. Бикиниева
ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России

Введение. Ингибиторы ДНК-топоизомеразы II типа используются в лечении широкого спектра злокачественных новообразований, включая СМТ и остеосаркомы. Полная ремиссия случается редко, и большинство остеосарком и СМТ в конечном итоге прогрессируют вследствие развития устойчивости к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа. Между тем, роль АКТ-опосредованного сигнального пути хорошо изучена в отношении СМТ и остеосаркомы и может использоваться как независимый прогностический маркер рецидивирования, снижения общей и безрецидивной выживаемости.

Цель исследования — изучить способности селективного АКТ-сигнального пути МК2206 повышать чувствительности клеток остеосаркомы к ингибитору ДНК-топоизомеразы II типа — доксорубину.

Материалы и методы. Исследования проводили на клеточных линиях U2-OS, SAOS-2 и A673. Полу-максимальные ингибирующие концентрации (IC50) доксорубина, МК2206 и их комбинации рассчитаны на основе MTS-колориметрического анализа. Степень комбинированного воздействия (синергизм — антагонизм) количественно оценена с помощью алгоритма Chou–Talalay и программы SynergyFinder. Число аннексин-V-положительных клеток исследовали с помощью проточной цитометрии, а экспрессию маркеров апоптоза (расщепленные формы — каспаза-3 и PARP) — методом вестерн-блоттинга.

Результаты. Ингибирование АКТ-сигнального пути (МК-2206) повышало цитотоксическое действие доксорубина на всех клеточных линиях ОС. Об этом свидетельствует значительное увеличение экспрессии маркеров апоптоза (например, расщепленные формы каспазы-3 и PARP) в клетках ОС, культивированных в присутствии доксорубина и МК-2206, по сравнению с клетками подвергнутых культивированию только доксорубином. Следует отметить, что МК2206 в отдельности не проявлял цитотоксической активности. С помощью проточной флуориметрии обнаружено значительное увеличение числа аннексин-V-положительных клеток во всех клеточных линиях ОС, культивированных под влиянием доксорубина и МК2206. Выявлено почти 4-кратное снижение IC50 для доксорубина в отношении клеток ОС, культивированных в присутствии МК-2206, по сравнению с клетками, обработанными только вышеуказанным химиопрепаратом.

Закключение. активация АКТ-сигнального пути в ОС может быть привлекательной молекулярной мишенью для повышения чувствительности опухолевых клеток к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 21-75-00014).

Чувствительность опухолевых клеток к ДНК-повреждающим агентам повышают 2-амино-пирролкарбоксамиды

С.В. Бойчук¹, А.Р. Галембикова¹, Ф.Ф. Бикиниева¹,
П.Д. Дунаев¹, С. Зыкова², Н. Игидов²

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России;

²ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России

Введение. Лекарственные препараты, влияющие на динамическое состояние микротрубочек веретена деления, в настоящее время широко используются в терапии пациентов с различными онкологическими заболеваниями.

Цель исследования — изучение способности 2-аминопиррол-карбоксамидов (2-APCA) повышать чувствительность опухолевых клеток к ДНК-повреждающим агентам, например доксорубину, посредством их способности влиять на процессы репарации повреждений ДНК.

Результаты. Ранее проведенные нами исследования показали способность синтезированных нами 2-APCA влиять на процессы полимеризации тубулина и индуцировать гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза. Цитотоксическая активность соединений показана в отношении широкого спектра опухолевых клеточных линий, включая РМЖ, РЛ, рак простаты и СМТ.

Материалы и методы. Оценку жизнеспособности клеток проводили колориметрическим MTS-методом. Степень комбинированного воздействия исследуемых препаратов (синергизм—антагонизм) определяли количественно с помощью программы SynergyFinder. Гибель клеток по механизму апоптоза оценивали методом проточной цитофлуориметрии (аннексин V/PI) и вестерн-блоттинга (экспрессия расщепленных форм каспазы-3 и PARP). Влияние 2-APCA на эффективность гомологичной рекомбинации — методом проточной цитофлуориметрии с использованием репортерной клеточной линии U-2-OS-DR-GFP, позволяющей определить эффективность репарации повреждений ДНК по интенсивности свечения GFP и числу GFP-позитивных клеток.

Результаты. Выявлен значительный синергизм между действием 2-APCA и доксорубином. Например, в отношении клеток остеосаркомы U-2-OS данный показатель составил 12,52. Выявлено значимое увеличение числа аннексин-V-положительных клеток после их инкубации с комбинацией вышеуказанных препаратов, что коррелировало с повышенным уровнем экспрессии расщепленных форм PARP и каспазы-3. Также обнаружено значимое снижение уровня рекомбиназы Rad51 в опухолевых клетках, культивированных с 2-APCA, что может свидетельствовать о способности данного соединения ингибировать процессы гомологичной рекомбинации ДНК. Этот факт подтвержден на модели репарации с I-SceI-индуцированных разрывов ДНК с использованием репортерной клеточной линии U-2-OS-DR-GFP. Выявлено почти 6-кратное снижение числа GFP-позитивных клеток преинкубированных с 2-APCA до момента индукции 2-нитевых разрывов ДНК.

Заключение. Установлено, что 2-APCA повышают чувствительность опухолевых клеток к ДНК-повреждающему агенту — доксорубину, в результате их способности ослаблять эффективность процессов репарации повреждений ДНК, индуцированных доксорубином. Полученные данные раскрывают новые молекулярные механизмы эффективности применения ингибиторов микротрубочек веретена деления и генотоксических химиопрепаратов в терапии пациентов со злокачественными новообразованиями.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 20-15-00001).

Производные 3-гидроксихиназолина, аналоги эрастина, индуцируют ферроптоз в клетках карциномы молочной железы

А.М. Борисова, В.Н. Осипов, И.С. Голубева,
М.П. Киселева, Д.А. Хоченков, А.А. Вартамян
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Программы раннего выявления опухолей заметно повысили выживаемость больных РМЖ, однако итоги лекарственной терапии при РМЖ не всегда эффективны. В последние годы все больше сообщений указывают на то, что обнаруженный в 2012 г. новый тип регулируемой железо-зависимой гибели клетки — ферроптоз, способен элиминировать высокозлокачественные опухолевые клетки, уцелевшие после ХТ.

Цели исследования: изучение индукции ферроптоза в клетках карциномы молочной железы MCF7 производными 3-гидроксихиназолина (аналоги эрастина), синтезированными в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей; оценка противоопухолевой активности этих производных хиназолина на перерываемой карциноме молочной железы Ca-755.

Материалы и методы. В экспериментах *in vitro* использовали 2D-культивирование клеток, фазово-контрастный и флуоресцентный методы микроскопии. Исследования *in vivo* проведены на модели экспериментальной карциномы молочной железы, растущей в самках гибридов иммунокомпетентных мышей F1 (C57Bl/6 × DBA/2). Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли и увеличению продолжительности жизни леченых животных по сравнению с показателями контрольной группы.

Результаты. В работе исследованы 5 производных 3-гидроксихиназолина (аналоги эрастина), классического индуктора ферроптоза. Гибель опухолевых клеток по типу ферроптоза идентифицировали по уровню перекисного окисления липидов при концентрациях 1/3 и 1/5 IC50 исследуемых соединений. Уровень перекисного окисления липидов в клетках MCF7, индуцируемый соединением OVF-072, оказался сравним с активностью эрастина как при 1/3, так и при 1/5 IC50. Активность остальных 4 производных хиназолина составляла 50–70 % от активности эрастина. В экспериментах *in vivo* противоопухолевый эффект соединения OVF-072 проявился сильнее, чем у эрастина при той же дозе (30 мг/кг).

Заключение. Полученные предварительные результаты позволяют предположить, что производное хиназолина OVF-072 может рассматриваться в качестве перспективного противоопухолевого средства для лечения РМЖ.

BRAF- и MEK-ингибиторы в терапии гистиоцитоза из клеток Лангерганса

Е.А. Бурцев, Г.О. Бронин

ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница ДЗМ», Москва

Цель исследования — оценка эффективности и безопасности применения BRAF- и MEK-ингибиторов у больных с различными формами гистиоцитоза из клеток Лангерганса (ГКЛ).

Материалы и методы. В исследование включены 18 больных с различными формами ГКЛ. Пациенты разделены на 4 терапевтические группы в зависимости от наличия или отсутствия поражения «органов риска» ($RO^{+/-}$) — печени, селезенки или гемопоэза, а также наличия или отсутствия в клетках опухоли мутации в гене *BRAF* ($BRAF^{+/-}$). Распределение по данным критериям: 3 пациента в группе $RO^{+}BRAF^{-}$, 2 пациента в группе $RO^{+}BRAF^{+}$, 4 пациента в группе $RO^{-}BRAF^{+}$, 9 детей в группе $RO^{-}BRAF^{-}$. Оценка эффективности проводимой терапии у больных с мультисистемной формой ГКЛ RO^{+} проводилась в соответствии со специальной шкалой DAS (Disease activity score) для оценки активности ГКЛ. Оценка активности заболевания у больных в группах без поражения органов риска и моносистемными формами заболевания — по международной шкале RECIST v1.1 (Response evaluation criteria in solid tumors). Оценка токсичности и нежелательных побочных реакций — по международной шкале CTCAE v5.0 (Common terminology criteria for adverse events).

Результаты. Больные 3 групп ($RO^{+}BRAF^{+}$, $RO^{+}BRAF^{-}$, $RO^{-}BRAF^{+}$) получали терапию BRAF-ингибиторами (вемурафениб), больные из группы $RO^{-}BRAF^{-}$ — терапию MEK-ингибиторами (кобиметиниб). В группе BRAF-позитивных больных с поражением органов риска ($RO^{+}BRAF^{+}$) ответ на терапию вемурафенибом составил 100 % (3 случая из 3). Ответ носил быстрый характер: через 5 дней от начала терапии во всех случаях отмечалось уменьшение числа баллов по шкале DAS на 30 %. У 1 пациента отмечалось течение фотодерматита — кожная токсичность 2-й степени по шкале CTCAE. При оценке состояния через 1 мес от окончания терапии ни у одного ребенка не выявлено признаков реактивации заболевания. В группе больных $RO^{-}BRAF^{+}$ (4 пациента) оценка ответа проводилась по шкале RECIST v1.1. Частичный ответ PR на проводимую терапию отмечался в 3 случаях из 4. Прогрессия заболевания на фоне проводимой терапии и через 3 мес после ее окончания не выявлена. Отмечен 1 случай кожной токсичности 2-й степени по шкале CTCAE в виде фотодерматита. В группе больных $RO^{+}BRAF^{-}$ (2 пациента) оценка ответа проводилась по шкале DAS. Полный ответ зафиксирован в 100 % случаев. Признаков прогрессии заболевания через 3 мес после прекращения терапии не выявлено.

Токсичности, ассоциированной с приемом вемурафениба, не отмечалось. В группе $RO^{-}BRAF^{-}$ (9 пациентов) оценка ответа проводилась по шкале RECIST v1.1. В 5 из 9 случаев отмечен PR. Различные виды токсичности зафиксированы в 7 из 9 случаев. Наиболее часто среди побочных реакций отмечались диарея (7 из 9), электролитные нарушения (4 из 9), сыпь (4 из 9 пациента). В большинстве случаев токсичность носила дозозависимый характер и при коррекции дозировки препарата нивелировалась. У 1 ребенка зафиксирован случай токсичности 4-й степени (диарея, сыпь), приведший к смене MEK-ингибитора. При оценке состояния через 3 мес после прекращения терапии отмечен 1 случай прогрессии заболевания, однако при возвращении терапии MEK-ингибиторами состояние показало тенденцию к нормализации.

Заключение. Таргетная терапия ГКЛ оказалась эффективной во всех группах. Терапия BRAF-ингибиторами у больных с RO^{+} дает очень быстрый ответ. BRAF-ингибиторы могут быть эффективны у больных с $BRAF^{-}$ -статусом. MEK-ингибиторы эффективны в терапии ГКЛ типа $RO^{-}BRAF^{-}$. Токсичность MEK-ингибиторов носит дозозависимый характер. Необходимо определение длительности продолжения таргетной терапии MEK-ингибиторами.

Новый подход к стратификации риска больных с острым миелоидным лейкозом на основании экспрессии *GATA1*, *GATA2* и *TAL1*

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

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

Введение. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — гетерогенное злокачественное заболевание кроветворной системы. Пациенты с ОМЛ имеют низкую выживаемость и высокую частоту рецидивов. Необходима разработка новых подходов к прогнозированию течения ОМЛ и выявлению молекулярных механизмов регуляции генов, кодирующих мишени противоопухолевых препаратов для создания эффективных терапевтических методик. Факторы транскрипции *GATA1*, *GATA2* и *TAL1* служат ключевыми регуляторами экспрессии генов в гемопоэтических клетках, однако их роль при ОМЛ остается неясной.

Цели исследования: создать алгоритм прогнозирования ОМЛ на основании экспрессии гемопоэтических факторов транскрипции и связанных с ними генов; выявить препараты, повышающие чувствительность клеток ОМЛ к 5-азацитидину.

Материалы и методы. Мы создали рекомбинантные лентивирусные векторы, направляющие экспрессию

генов *GATA1*, *GATA2*, *TAL1* и генов флуоресцентных белков GFP и mCherry. Созданные на основе данных векторов лентивирусные частицы использовали для доставки генов в перевиваемые клетки лейкоза человека. С помощью ПЦР в режиме реального времени измеряли уровни мРНК генов. Локализацию белков исследовали методом конфокальной микроскопии. Долю жизнеспособных клеток оценивали колориметрическим методом (Cell Proliferation Kit) и окрашиванием аннексином V и пропидий йодидом.

Результаты. Анализ данных секвенирования РНК более 1 тыс. образцов пациентов с ОМЛ, находящихся в открытом доступе, выявил гены, экспрессия которых повышена одновременно с *GATA1*, *GATA2* и *TAL1*. При разделении больных на группы с высоким и низким уровнем экспрессии *GATA1*, *GATA2* и *TAL1*, мы показали, что для пациентов 1-й группы характерна низкая вероятность выживаемости. На основании экспрессии менее 100 генов с помощью машинного обучения построили модель, предсказывающую вероятность выживания пациентов. Показали, что *GATA1*, *GATA2* и *TAL1* регулируют экспрессию ряда рецепторов факторов роста, которые служат перспективными мишенями для лечения злокачественных заболеваний. Обработка клеток 5-азациитидином, ингибитором ДНК-метил-трансферазы-1, приводила к индукции *GATA1* и *TAL1* и усилению чувствительности клеток к ряду ингибиторов рецепторных тирозинкиназ.

Заключение. Новый подход к стратификации риска пациентов с ОМЛ позволил не только сделать прогноз на основании экспрессии генов (<100), но и выявить препараты, эффективно блокирующие рост клеток лейкоза и усиливающие действие 5-азациитидина.

Изучение эффекта куркумина на эксцизионную репарацию ДНК в клетках мультиформной глиобластомы

В.Е. Шевченко¹, Т.И. Кушнир¹, Н.Е. Арноцкая¹,
И.А. Кудрявцев¹, В.Г. Згода²,

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

²ФГБУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»,
Москва

Введение. В значительной степени резистентность МГБ к генотоксической терапии связана с нарушением регуляции реакций на повреждение и репарацию ДНК. Таким образом, подавление механизмов репарации ДНК — приоритетный путь для увеличения выживаемости больных МГБ. Куркумин и куркуминоиды представляют собой природные полифенольные соединения, выделенные из куркумы (*Curcuma longa*). Куркумин модулирует различные сигнальные каскады,

которые обычно дисрегулируются при МГБ, однако его действие на процессы репарации ДНК изучены недостаточно.

Цель исследования — изучение молекулярных механизмов действия куркумина на эксцизионную репарацию ДНК в клетках U251 МГБ.

Материалы и методы. Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения исследовали действие куркумина на протеом линии клеток U-251 МГБ человека. Применяли GO-анализ.

Результаты. Выявлено существенное влияние куркумина на опухолевые клетки. Из 2 тыс. 757 идентифицированных белков протеома клеток U-251 выявлено 1 тыс. 80 дифференциально экспрессированных белков, из них 662 имели повышенную экспрессию, а 418 — пониженную в U-251 по сравнению с U-251⁺ККМ клетками МГБ. В результате GO-анализа определили, что дифференциально экспрессированные белки входили в состав почти всех категорий субклеточной локализации, участвовали во многих биологических процессах, обладали широким спектром молекулярных функций и включали различные виды белков. Обнаружены значительные изменения во многих сигнальных каскадах, играющих важную роль в канцерогенезе. В частности, под действием куркумина в клетках U-251 наблюдалось снижение эксцизионной репарации ДНК, на что указывало уменьшение (более чем в 2 раза) экспрессии детерминант этих сигнальных каскадов (APEX1, MSH6, PARP1, PCNA, POLD1, POLE3, REC2, RPA2).

Заключение. Показано, что куркумин супрессирует эксцизионную репарацию ДНК. Полученные данные могут учитываться в дальнейшем при разработке терапевтических схем с участием куркумина или его производных для повышения чувствительности к ХТ и лучевой терапии при лечении МГБ.

Ингибирование CDK8 для индукции гибели клеток острого миелоидного лейкоза

Е.А. Варламова¹, Н. Хаммуд², А.В. Брутер², В.В. Татарский²,
А.А. Штиль¹

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

²ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва

Введение. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — тяжелая форма гемобластозов. Частые осложнения терапии ОМЛ — кардио- и миелотоксичность. В патогенезе ОМЛ установлена роль суперэнхансеров — областей генома с повышенным содержанием комплексов Mediator и модуля циклинзависимой киназы 8 CDK8/циклин С, которые обуславливают высокий транскрипционный потенциал ОМЛ. Селективные ингибиторы CDK8 хорошо переносятся *in vivo* и могут быть перспективными в терапии ОМЛ.

Цель исследования — установление возможности индукции гибели клеток ОМЛ фармакологическим ингибитором CDK8.

Материалы и методы. Использованы линии ОМЛ MV-4-11, KG-1, Kasumi-1 и HL-60.

Результаты. Ингибитор CDK8 Senexin B вызывал гибель клеток MV-4-11 ($IC_{50} = 0,17 \pm 0,03$ мкМ) и KG-1 ($IC_{50} = 0,32 \pm 0,02$ мкМ). Линии Kasumi-1 и HL-60 показали себя менее чувствительными ($IC_{50} > 3$ мкМ). Ступенчатой селекцией получена устойчивая к Senexin B сублиния MV-4-11SenB ($IC_{50} > 10$ мкМ).

Закключение. Исследование подтверждает перспективность селективного воздействия на киназный модуль CDK8 в терапии ОМЛ и указывает на необходимость определения молекулярных критериев чувствительности к ингибированию CDK8.

GANT61, ингибирующий активность транскрипционных факторов GLI, повышает эффективность облучения γ -радиацией и протонами клеток злокачественных глиом

А.В. Волницкий^{1,2}, А.В. Гарина^{1,3}, В.С. Бурдаков^{1,2},
Д.А. Амерканов^{1,2}, Ф.А. Пак^{1,2}, Л.А. Гараева^{1,2},
Е.М. Иванов¹, Д.В. Лебедев^{1,2}, А.Л. Коневега^{1,2,3},
Т.А. Штам^{1,2}

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

²НИЦ «Курчатовский институт», Москва;

³ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Введение. Злокачественные глиомы — наиболее агрессивные опухоли головного мозга, которые не поддаются стандартному клиническому лечению и приводят к быстрой гибели пациентов. Один из новых перспективных подходов к лечению злокачественных глиом — облучение протонами на пике Брэгга, которое производит точное локальное воздействие на новообразования, почти не затрагивая окружающие нормальные ткани. Однако такое лечение осложняется высокой инвазией клеток глиом. Облучение протонами может устранить различимые на томографии очаги опухоли, но «спящие» раковые стволовые клетки, проникшие в окружающую нормальную ткань, дадут новые очаги, приводя к рецидиву. Решить данную проблему может сочетание облучения с адресными препаратами. GANT61 специфически ингибирует связывание с ДНК транскрипционных факторов GLI, которые участвуют как в формировании организма, так и в развитии злокачественных глиом. Ранее мы показали, что инкубация с GANT61 приводит к массовой гибели клеток глиом, не оказывая влияния на линии клеток,

в которых нет активности GLI (HeLa, нормальные кожные фибробласты).

Цель исследования — выяснить, как облучение γ -радиацией или протонами в сочетании с последующим добавлением GANT61 влияет на выживаемость клеток злокачественных глиом.

Материалы и методы. В исследовании использованы 2 клеточные линии МГБ, включая линию A-172 и вторичную культуру GI-Tr, полученную в Курчатовской институте. Суспензию, содержащую 104 клетки, облучали γ -радиацией («Исследователь») или протонами на пике Брэгга (синхроциклотрон СЦ-1000) в дозах 0; 2; 4; 6 Гр. Затем клетки высевали на 24-луночный планшет по 103 клетки на лунку. На следующий день добавляли GANT61 в концентрациях, при которых выживало около 50 % необлученных клеток. Выживаемость клеток оценивали с помощью MTS-теста и окрашивания кристаллическим фиолетовым через 7 сут после облучения.

Результаты. Инкубация с GANT61 значительно увеличивает гибель клеток обеих линий глиом при облучении γ -радиацией или протонами дозой 2 Гр и приводит к полной гибели клеток при дозе 4 Гр. Для исследуемых клеток глиом без добавления ингибитора доза 6 Гр летальна.

Закключение. Применение прецизионной лучевой терапии в сочетании с адресными препаратами, ингибирующими активность транскрипционных факторов GLI, может стать основой для эффективного лечения злокачественных глиом.

Работа выполнена при поддержке НИЦ «Курчатовский институт» (приказ № 1059).

Новые пиррол- и тиофен-конденсированные производные антрахинона: структура и противоопухолевые свойства

Ю.Л. Володина¹, А.С. Тихомиров², В.А. Литвинова²,
Д.В. Андреева², Л.Г. Деженкова², Д.Н. Калужный³,
И.Д. Трещалин², 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

Введение. Гетероарен-конденсированные производные антрахинона (прототип — антрафуранкарбоксамид ЛХТА-2034, антрафуран) — перспективный класс соединений для терапии опухолей. Оптимизация структуры производных антрахинона способна усилить противоопухолевый эффект.

Цель исследования — изучение механизмов гибели опухолевых клеток при действии новых пиррол- и тиофен-конденсированных производных антрахинона.

Материалы и методы. Производные нафтоиндол-3- и антрадиофен-3-карбоксамидов получали конденсацией соответствующих кислот с циклическими диаминами. Для исследования гибели опухолевых клеток использовали МТТ-тест, проточную цитометрию, иммуноблоттинг. Ингибирование топоизомеразы I (топо I) изучали в реакции релаксации суперскрученной ДНК. Аффинность к 2-цепочечной ДНК определяли флуоресцентным титрованием. Противоопухолевую эффективность *in vivo* оценивали на модели перевивного лейкоза мышей P388.

Результаты. Новые соединения в микромолярных и субмикромолярных концентрациях вызывали апоптоз опухолевых клеток разного видового и тканевого происхождения, включая линии с лекарственной устойчивостью. Наблюдались значительные различия свойств данных соединений: цитотоксичности, способностей к индукции АФК и повреждениям ДНК, аффинности к 2-цепочечной ДНК, влияний на клеточный цикл и функцию топо I. Нафтоиндолкарбоксамид ЛХТА-2640 продемонстрировал более высокую активность ингибирования топо I и аффинность к ДНК по сравнению с фурановыми и тиофеновыми аналогами. ЛХТА-2640 значительно увеличивал продолжительность жизни мышей с лейкозом P388.

Заключение. Новые пиррол- и тиофен-конденсированные производные антрахинона перспективны в качестве кандидатов для углубленного изучения противоопухолевых свойств, а также исследования связей «структура — активность» в ряду производных антрахинона.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых (МК-222.2021.1.3).

Основной белок миелина – гематологический маркер степени тяжести поражения нервной системы при проведении химиотерапии злокачественных новообразований (на примере лимфосаркомы Плисса)

Т.Д. Гаглоева¹, А.П. Трашков^{1,2}, Н.В. Цыган^{1,3},
Е.В. Сергеева¹, А.В. Рябцев¹, Н.А. Верлов¹, А.А. Ганчарова¹,
В.И. Максимов¹

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

²ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»;

³ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург

Цель исследования — изучить динамику содержания основного белка миелина в крови крыс при развитии злокачественного новообразования на фоне экспериментальной ХТ цисплатином.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 150 самцах аутбредных крыс в возрасте 10–12 нед. В качестве модели опухолевого процесса использована ЛСП, трансплантированная подкожно в дозе 5×10^4 кл/особь. В качестве препарата для ХТ внутривенно применяли цисплатин в дозе 7 мг/кг массы тела, вводили однократно через 48 ч после трансплантации опухоли. Животных разделили на 4 группы: «Контроль» — интактные крысы ($n = 6$); «Опухоль» — крысы с ЛСП без лечения ($n = 48$); «Опухоль + цисплатин» — крысы с ЛСП, получавшие лечение ($n = 48$); «Цисплатин» — крысы без опухоли, получавшие цисплатин ($n = 48$). Степень тяжести неврологических нарушений у животных оценивали на 5, 10, 15 и 20-е сутки по шкале J.N. Garcia и уровню основного белка миелина (ОБМ) в крови крыс, определяемому с помощью ИФА.

Результаты. Развитие ЛСП приводило к поражению нервной системы животных, характеризующемуся яркой неврологической картиной, коррелирующей с ростом уровня ОБМ в крови начиная с 15-х суток эксперимента ($p = 0,002$). Применение цисплатина, способствуя умеренному торможению развития опухоли, оказывало дополнительное токсическое действие на нервную систему крыс, что проявлялось в тяжелой неврологической симптоматике и высоком содержании ОБМ в крови уже на ранних этапах развития ЛСП по сравнению с показателями контрольной группы и группы крыс, не получавших лечение (5-е сутки, $p < 0,001$). При этом введение цисплатина интактным крысам приводило к транзиторному увеличению уровня ОБМ и ухудшению функций нервной системы, определяемому только на 5-е сутки эксперимента.

Заключение. Развитие ЛСП приводит к дистантно-му поражению нервной системы крыс, что позволяет рассматривать данную лимфосаркому в качестве тест-системы паранеопластического неврологического синдрома. Уровень ОБМ в крови животных тесно коррелирует со степенью тяжести неврологических нарушений и может применяться как независимый маркер поражения нервной системы у онкологических пациентов. Химиотерапия ЛСП цисплатином приводит к усилению опухолевой интоксикации.

Анализ взаимодействия трансглутаминазы II типа с онкосупрессором p53 в контексте опухолеобразования аденокарциномы легкого

Ю.А. Гненная, Е.Ю. Смирнов, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Трансглутаминаза TG2 — мультифункциональный фермент, опосредующий широкий спектр ковалентных модификаций белков. Работы R.L. Eckert (2019), K.C. Olsen и соавт. (2014) показали, что TG2 участвует в патогенезе ряда неопластических и фибропролиферативных заболеваний, включая злокачественные опухоли и фиброз легких, почек и сердца. Высокий уровень TG2 в клетках некоторых типов РЛ и ПКР коррелирует с низкой выживаемостью пациентов и повышенной устойчивостью к ХТ-препаратам. Ранее S.H. Lee и соавт. (2019) продемонстрировали, что ингибирование TG2 подавляет рост опухоли ПКР p53-опосредованной индукцией апоптоза. Однако роль TG2 в модуляции активности p53 в контексте РЛ остается невыясненной.

Цель исследования — изучить молекулярные механизмы взаимодействия TG2 и онкосупрессора p53 в опухолеобразовании на линии аденокарциноматических эпителиальных клеток A549.

Материалы и методы. На основе клеточной линии A549 (p53 дикого типа) при помощи геномного редактирования создана изогенная линия, несущая нокаут TG2. Уровень белка p53 и его мишеней определяли методом вестерн-блоттинга. Уровень мРНК изучаемых показателей оценивали методом ОТ-ПЦР. Белок-белковое взаимодействие TG2 и p53 определяли методом GST pull-down. Влияние TG2 на сенситизацию и выживаемость полученной клеточной линии к терапии генотоксическими препаратами (доксорубин, этопозид) определяли методами МТТ- и клоногенного тестов.

Результаты. Методом GST pull-down показано, что TG2 способен взаимодействовать с p53. Продemonстрировано, что для клеток A549, нокаутных по TG2, характерно повышение как тотального уровня p53, так

и его активной (фосфорилированной) формы. Так же зафиксировано изменение числа p53-ассоциированных белков как на белковом, так и на уровне мРНК. По результатам МТТ- и клоногенного тестов отмечено, что нокаутные клетки менее резистентны к обработке генотоксическими препаратами.

Заключение. В рамках данного исследования создана клеточная модель РЛ, позволяющая изучить молекулярные механизмы взаимодействия TG2 с онкосупрессором p53, выявить влияние TG2 на устойчивость раковых клеток к апоптозу. Полученные и литературные данные предполагают дальнейшее изучение TG2 в роли потенциальной мишени противоопухолевой терапии, направленной на регуляцию p53-опосредованного баланса аутофагии и апоптоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-75-10138).

Индивидуализация лечения рака прямой кишки на основании генетических данных пациентов

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

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

Цель исследования — оценить влияние полиморфных вариантов генов *MTHFR*, *XPB*, *XRCC1*, *XRCC1*, *P53*, *VEGF*, *EGFR*, *TNF*, *CHEK2*, *MMP1* на результат ХЛТ у больных РПК.

Материалы и методы. Проведена оценка полиморфизма генов у 47 пациентов, проходивших лечение на базе Областного клинического онкологического диспансера (Рязань) с 2016 по 2021 г. по поводу РПК. Всем больным в качестве неoadъювантного лечения проведена ХЛТ в соответствии с современными клиническими рекомендациями, в последующем дополненная оперативным вмешательством. Пациентов разделили на 2 группы в зависимости от результата лечебного патоморфоза: 25 больных — со слабым эффектом ХЛТ (лечебный патоморфоз 1–2-й степени) и 22 — с выраженным лечебным патоморфозом (3–4-й степени). На базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Рязанского государственного медицинского университета выполнялось генотипирование методом выделения ДНК из лейкоцитов венозной крови с последующей ПЦР и электрофоретической детекцией результата. При исследовании полиморфизма гена его состояние оценивалось как гетерозиготное, гомозиготное по доминантной аллели и гомозиготное по рецессивной аллели. Оценка лечебного патоморфоза проводилась в соответствии с классификацией Г.А. Лавниковой.

Результаты. У пациентов с 3–4-й степенью лечебного патоморфоза достоверно чаще встречался рецессивный

гомозиготный вариант гена *MMP1* (16071G >2G) по сравнению с больными с 1–2-й степенью патоморфоза ($p = 0,038$). Также у больных с выраженным лечебным патоморфозом значительно чаще встречалось совместное носительство рецессивного гомозиготного варианта гена *MMP1* (2G/2G) с гетерозиготным вариантом гена *TNF* (G/A) ($p = 0,011$). По остальным генам статистически значимых различий не получено ($p > 0,05$).

Заключение. Рецессивное гомозиготное состояние гена *MMP1* (16071G >2G) и его носительство совместно с гетерозиготным вариантом гена *TNF* G308A) — прогностически благоприятные факторы, указывающие на высокую вероятность развития лечебного патоморфоза 3–4-й степени.

Е3-убиквитинлигаза Pirh2 регулирует аутофагию в клетках рака легкого

А.И. Гудович, О.А. Федорова, А.А. Дакс, А.В. Петухов, Е.В. Байдюк, О.Ю. Шувалов, С.Е. Парфеньев, Н.А. Барлев
ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Аутофагия — высококонсервативный процесс, в ходе которого поврежденные белки и органеллы окружаются липидной мембраной и подвергаются последующей лизосомной деградации. Аутофагия возникает как ответ на клеточное голодание и служит механизмом поддержания гомеостаза в клетке. Показано, что аутофагия играет негативную роль в онкологических заболеваниях, поддерживая жизнедеятельность раковых клеток при воздействии противоопухолевой терапии. Большое значение в контроле процесса аутофагии имеют различные Е3-убиквитинлигазы.

Цель исследования — оценка влияния Pirh2 на уровень аутофагии в клетках РЛ. Мы предполагаем, что Pirh2 (Е3-убиквитинлигаза для важнейшего онкосупрессора человека p53) влияет на аутофагию в раковых клетках.

Материалы и методы. Использовались контрольные клеточные линии (H1975 scr, A549 scr, H460 scr) и линии с пониженной экспрессией Pirh2 (H1975 shPirh2, A549 shPirh2, H460 shPirh2). Один из основных маркеров аутофагии в клетках — уровень экспрессии LC3-II. С помощью вестерн-блот-анализа, а также иммуноцитохимии в клеточных линиях РЛ с подавленной экспрессией Pirh2 мы наблюдали уменьшение сигнала LC3-II. В подтверждении этих данных проведено окрашивание лизосом красителем LysoTracker: контрольные клеточные линии имели более интенсивное окрашивание. С помощью ПЦР в реальном времени мы определили уровень экспрессии маркеров, регулирующих различные стадии формирования аутофагосомы: LC3, beclin, VPS15, ATG5, ATG16, ATG4B, ATG3, LAMP2. В клетках с нокдауном Pirh2 наблюдается значительное снижение экспрессии данных генов, что говорит об общем снижении уровня аутофагии в данных линиях. Поскольку ингибирование аутофагии — перспективное

направление для преодоления резистентности опухолевых клеток, мы оценили чувствительность клеток с разным статусом экспрессии Pirh2 к ДНК-повреждающему агенту доксорубину.

Результаты. С помощью МТТ-теста показали, что линии H1975 и A549 с нокдауном Pirh2 имеют низкую выживаемость после обработки доксорубином по сравнению с контрольными линиями. Можно предположить, что Pirh2 увеличивает устойчивость клеток к доксорубину за счет активации аутофагии.

Заключение. Обобщая полученные данные, мы показали роль Е3-убиквитинлигазы Pirh2 в регуляции аутофагии в клетках РЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-75-10076).

Нулевой генотип генов *GSTT1* и *GSTM1* как возможный предиктор ответа на гормональную терапию при раке молочной железы

И.С. Гулян^{1,2}, Е.В. Елисеева¹, В.И. Апанасевич¹

¹ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток;

²ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток

Введение. Эндокринотерапия — один из основных и наиболее безопасных методов лечения гормонопозитивного РМЖ. Противоопухолевый эффект лекарственных препаратов реализуется не только через их взаимодействие с гормональными рецепторами и подавление выработки гормонов, но и посредством активации ряда механизмов (ингибирование протеинкиназы С, увеличение экспрессии металлопротеиназы-1, развитие окислительного стресса и др.). Однако на эффективность лечения может оказывать влияние генетический статус пациента, определяемый в том числе полиморфизмами генов системы биотрансформации ксенобиотиков.

Цель исследования — изучение влияния делеционных полиморфизмов *GSTT1* и *GSTM1* на риск развития рецидива у больных с гормонопозитивным РМЖ при лечении тамоксифеном.

Материалы и методы. Изучены образцы крови 102 женщин с диагнозом РМЖ, IIA — III стадиями, в возрасте от 23 до 79 лет (средний возраст 48 ± 13 лет), получивших эндокринную терапию. Пациентов разделили на 2 группы: с рецидивом заболевания и без рецидива, время наблюдения от 5 до 7 лет. Детекцию нулевых генотипов *GSTM1* и *GSTT1* осуществляли с помощью мультиплексной ПЦР с последующим анализом кривых плавления продуктов реакции.

Результаты. Из 102 женщин с диагнозом РМЖ рецидив заболевания наступил у 43 (42,2 %), без рецидива —

у 59 (57,8 %) пациенток. Частота нулевых генотипов GSTT1 и GSTM1 у больных без рецидива РМЖ оказалась выше (22,1 и 50,8 % соответственно), чем у пациенток с рецидивом (9,3 и 44,2 % соответственно). Относительный риск развития рецидива РМЖ для больных с нулевым генотипом GSTT1 составил 0,513 (95 % ДИ = 0,211–1,246; $\chi^2 = 2,909$; $p = 0,0890$), тогда как с нулевым генотипом GSTM1 – 0,856 (95 % ДИ = 0,541–1,356; $\chi^2 = 0,442$; $p = 0,507$). Встречаемость сочетанных нулевых генотипов GSTT1 и GSTM1 в группе пациенток без рецидива составила 15,2 %, а в группе с рецидивом – только 2,3 %. Относительный риск развития рецидива РМЖ составил 0,219 (95 % ДИ = 0,033–1,444; $\chi^2 = 4,377$; $p = 0,037$). Следовательно, отсутствие ферментов GSTT1 и (или) GSTM1 у носителей нулевых генотипов при гормональной терапии может приводить к снижению детоксикационной способности (глутатион-опосредованной трансформации), и, соответственно, к более длительной циркуляции АФК, в том числе метаболитов лекарственных препаратов.

Заключение. Носительство нулевых генотипов можно рассматривать в качестве предиктора ответа на эндокринную терапию. Сочетанное носительство нулевых генотипов GSTT1 и GSTM1 снижает риск развития рецидива гормонопозитивного РМЖ.

Оценка кардиотоксичности гибридных оловоорганических соединений с антиоксидантным фенольным фрагментом

М.А. Додохова¹, А.В. Сафроненко¹, И.М. Котиева¹,
М.С. Алхусейн-Кулягинова¹, Д.Б. Шпаковский²,
Е.Р. Милаева²

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

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

Введение. Для оловоорганических соединений установлена высокая противоопухолевая и антималярийная активность на различных моделях опухолевого роста. Установление выраженности возможных побочных эффектов при использовании данной группы соединений в терапии злокачественных новообразований, в том числе и кардиотоксических, – приоритетная задача экспериментальной фармакологии и онкологии.

Цель исследования – сравнительная оценка неспецифического кардиотоксического влияния бис-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Me3) и (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Me5) при однократном внутривенном введении крысам линии *Wistar* в максимально переносимой дозе.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 30 крысах линии *Wistar* (самки). В качестве маркера

токсического повреждения кардиомиоцитов определяли тропонин I в плазме крови с помощью ИФА (пкг/мл плазмы). Забор крови сделан через 6 ч после введения максимально переносимой дозы Me3 (2000 мг/кг) и Me5 (750 мг/кг). Контрольная группа раствор желатина (1 %) вводился в эквивалентных режимах и объемах.

Результаты. Установлено, что через 6 ч после введения у всех животных опытных групп увеличился уровень тропонина I. Субстанция Me5 оказала более выраженное токсическое действие на кардиомиоциты, прирост среднего значения концентрации в плазме составил 17,4 %. Соединение Me3 проявило меньшую кардиотоксичность (прирост 11,2 %).

Заключение. Оловоорганические соединения бис-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Me3) и (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Me5) обладают умеренной кардиотоксичностью. Представляется целесообразным дальнейшее изучение Me3 и Me5 в качестве кандидатов в лекарственные средства для лечения злокачественных новообразований.

Антиметастатическая эффективность органического соединения олова в классическом и метрономном режиме введения на модели меланомы B16

М.А. Додохова¹, А.В. Сафроненко¹, И.М. Котиева¹,
М.С. Алхусейн-Кулягинова¹, Д.Б. Шпаковский²,
Е.Р. Милаева²

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

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

Введение. Поиск новых ХТ-средств – одна из важнейших задач медицинской химии. Перспективные кандидаты в противоопухолевые лекарственные средства – органические соединения олова (IV). Оптимальным соотношением активности и токсичности обладают гибридные оловоорганические соединения, содержащие протекторный фрагмент 2,6-ди-трет-бутилфенола.

Цель исследования – сравнительная оценка антималярийной эффективности бис-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Me3) при 5-кратном внутривенном введении в максимально эффективной дозе и 10-кратном внутривенном введении в пороговой дозе (метрономный режим).

Материалы и методы. Исследование проведено на мышцах-самках линии *C57Bl/6* (36 животных). Поддержание и перевивку меланомы B16 осуществляли по известным методикам подкожно. Через 48 ч после перевивки внутривенно вводили Me3 в различных режимах. Животных рандомизировали на 3 группы: 1 (опытная) – введение в течение 10 дней, разовая

доза — 35 мг/кг; 2 (сравнения) — введение в течение 5 дней, разовая доза — 75 мг/кг; 3 (контрольная) — без лечения. Антиметастатическую эффективность Me3 оценивали на 18-е сутки после перевивки по значению индекса ингибирования метастазирования в легких (ИИМ, %).

Результаты. Установлено, что на 18-е сутки развития опухолевого процесса величина ИИМ стала сопоставима в опытной группе и группе сравнения. Снижение активности метастазирования в легкие составило 47 и 54 % соответственно.

Заключение. Антиметастатическая эффективность бис- (3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Me3) на модели меланомы B16 мышей линии C57Bl/6 при более продолжительном введении в пороговой дозе оказалась соизмерима с результатами при классическом введении, что открывает широкие перспективы для снижения вероятности и выраженности побочных эффектов при приеме Me3 в качестве противоопухолевого агента.

Разработка подхода к персонализированной терапии колоректального рака на основе прямой оценки химиочувствительности опухолевых клеток

И.Н. Дружкова¹, М.М. Лукина¹, Н.И. Игнатова¹,
А.Д. Комарова¹, Д.С. Кузнецова¹, Д.В. Комаров²,
М.В. Ширманова²

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

²ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России, Нижний Новгород

Цель исследования — разработка методики прямой оценки лекарственной чувствительности колоректальных опухолей пациентов для прогнозирования эффективности терапии.

Материалы и методы. Работа проводилась на клеточных линиях КРР человека, а также опухолевых клетках, выделенных из образцов опухолей пациентов и тканевых культурах опухолей (слайсах). Использовались препараты оксалиплатин, иринотекан, 5-фторурацил и цетуксимаб. Эффект терапии оценивали с помощью флуоресцентного время-разрешенного имиджинга (FLIM) метаболических кофакторов НАД(Ф)Н и ФАД, а также с помощью стандартных методов оценки жизнеспособности клеток и патоморфологического анализа. Анализ мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* проводили методом ПЦР.

Результаты. Предложены способы выделения и культивирования опухолевых клеток из опухолей

пациента в виде краткосрочных клеточных культур и слайсов. Анализ энергетического метаболизма клеточных линий при воздействии препаратов показал, что время жизни флуоресценции НАД(Ф)Н не меняется и составляет ~0,4 нс для свободной формы НАД(Ф)Н (t1) и ~2,5 нс для связанной (t2). Отношения вкладов свободного (a1) к связанному с белком (a2) НАД(Ф)Н a1/a2 после воздействия любым из препаратов статистически значимо снижалось, что говорит о сдвиге метаболического статуса клеток в сторону окислительного фосфорилирования. Изменений кофактора ФАД не выявлено. Определен наиболее чувствительный параметр терапевтического ответа клеток — отношение a1/a2 НАД(Ф)Н. Анализ опухолей пациентов (клеток и слайсов) показал исходную высокую метаболическую гетерогенность опухолей, однако воздействие терапии приводило к аналогичным изменениям. Мутационный анализ показал соответствие генотипов исходных опухолей пациентов и выделенных из них клеток.

Заключение. Показана возможность прямой оценки химиочувствительности опухолевых клеток, выделенных из опухолей пациентов, по изменению их метаболического статуса при оценке методом FLIM.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава РФ (рег. номер АААА-А20-120022590098-0).

Исследование механизма сенситизации клеток ингибиторами тирозил-ДНК- фосфодиэстеразы 1 человека к действию известных противораковых препаратов

Н.С. Дырхеева¹, А.Л. Захаренко¹, О.А. Лузина²,
А.С. Филимонов², И.В. Ильина², А.А. Малахова^{1,3},
С.П. Медведев^{1,3}, С.М. Закиян^{1,3}, К.П. Волчо²,
Н.Ф. Салахутдинов², О.И. Лаврик¹

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

²ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН»;

³ФГБНУ «ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск

Введение. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) играет существенную роль в развитии устойчивости раковых клеток к используемым противоопухолевым препаратам-ингибиторам ферментов, поскольку Tdp1 способна удалять повреждения ДНК, создаваемые этими препаратами. Ингибиторы Tdp1, которые могут повысить цитотоксичность клинически используемых препаратов, способны усилить таким образом их терапевтический эффект.

Цель исследования — уточнение клеточных белков-мишеней, активность которых подавляется в клеточной культуре под действием найденных нами соединений — ингибиторов Tdp1.

Материалы и методы. С использованием метода CRISPR-Cas9 создан набор клеточных линий HEK293, нокаутных по генам белков-участников системы репарации ДНК. Такой набор может служить инструментом для поиска клеточных ферментов-мишеней, активность которых подавляется в клеточной культуре под действием исследуемых соединений. С помощью колориметрического теста метаболической активности клеток в работах E.J. Brettrager и соавт. (2019) и N.S. Dyrkheeva и соавт. (2021) показано, что нокаутные по гену *Tdp1* клетки проявляют гиперчувствительность к топотекану. Клетки HEK293, нокаутные по гену *Tdp2*, проявляют гиперчувствительность к этопозиду. Мы изучили влияние обнаруженных нами ранее наиболее эффективных ингибиторов Tdp1 — производных уриновой кислоты и карена, на выживаемость перевиваемых клеток дикого типа и нокаутных по генам *Tdp1* и других белков репарации.

Результаты. Показано, что данные соединения не цитотоксичны или незначительно токсичны в диапазоне концентраций до 100 мкМ, что важно при рассмотрении исследуемых соединений как потенциальных компонентов лекарственных коктейлей для терапии раковых заболеваний. Для ряда исследованных ингибиторов Tdp1 выявлен сенсibiliзирующий эффект к действию топотекана на клетках дикого типа, т.е. цитотоксическое действие топотекана усиливалось в присутствии ингибитора Tdp1. Однако на нокаутных по гену *Tdp1* клетках такого эффекта не наблюдалось.

Закключение. Синергическое действие на раковые клетки комбинации известного лекарства и наших соединений, вероятно, связано с тем, что Tdp1 служит мишенью для этих соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-773).

Активация интерферонового сигналинга противоопухолевыми производными N-гликозидов индолакарбазолов ЛХС-1208 и ЛХС-1269

Р.Г. Зенков¹, О.А. Власова¹, П.А. Штомпель²,
Т.И. Фетисов¹, Н.Ю. Карпеченко¹, Л.В. Эктова¹,
В.А. Еремина¹, М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,3}

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

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

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Введение. Производные индолакарбазолов представляют интерес в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов. Новые вещества этого класса, ЛХС-1208 и ЛХС-1269, синтезированы нашей группой. Они показали высокую противоопухолевую активность и низкую токсичность *in vivo*. Литературные данные позволяют предположить, что молекулярные механизмы действия соединений включают активацию ИФН-сигналинга, опосредованного связыванием с ДНК и нарушением структуры хроматина.

Цель исследования — изучить влияние ЛХС-1208 и ЛХС-1269 на структуру хроматина и активацию ИФН-сигналинга.

Материалы и методы. Константу связывания соединений с ДНК определяли методом FID (Fluorescent intercalator displacement assay). Уровень двуцепочечных разрывов ДНК определяли по числу фокусов гистона γ -H2AX с помощью иммуноцитологического окрашивания антителами. Локализацию гистонов регистрировали методом прижизненной микроскопии в клетках HeLa с флуоресцентно мечеными гистонами H1 и H2B. Влияние на ИФН-сигналинг определяли методом ПЦР в реальном времени, а также проточной цитофлуориметрии в клетках HeLa, содержащих ген белка *mCherry* под контролем ИФН-чувствительного регулирующего элемента (ISRE).

Результаты. Константа связывания с ДНК для ЛХС-1208 и ЛХС-1269 составила $(12,4 \pm 0,07) \cdot 10^5$ М⁻¹ и $(2,52 \pm 0,4) \cdot 10^5$ М⁻¹ соответственно. ЛХС-1208 и ЛХС-1269 увеличивают число локусов гистона γ -H2AX в 2,5 и 4,9 раза соответственно. Таким образом, оба соединения индуцируют двуцепочечные разрывы ДНК. Оба вещества не вызывают релокализацию гистона H2B. В то же время ЛХС-1269 вытесняет гистон H1 из хроматина в концентрациях 20 и 10 мкМ в 25 и 19 % клеток соответственно. Оба соединения активируют ИФН-сигналинг. В клетках HeLa ЛХС-1208 вызывает дозозависимое повышение экспрессии таргетных генов сигнальных путей IFN- α /IFN- β — *OAS1*, *IFNB1* и *STING*. При этом ЛХС-1269 не изменяет экспрессию таргетных генов, однако вызывает 8-кратное

повышение сигнала в клетках HeLa-mCherry. Такое расхождение может быть обусловлено различием в механизмах активации ИФН-сигналинга. В случае ЛХС-1208 она, по всей видимости, осуществляется за счет индукции разрывов ДНК. В случае ЛХС-1269 — посредством вытеснения гистонов и активации экспрессии ретротранспозонов.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что соединения ЛХС-1208 и ЛХС-1269 активируют ИФН-сигналинг посредством действия на ДНК и структуру хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-315-70038).

Оптимизация структуры химических соединений: биологические сюрпризы

О.Н. Зефирова¹, Е.В. Нуриева¹, Н.А. Зефиров¹,
Е.Р. Милаева¹, С.А. Кузнецов²

¹ГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²Институт биологических наук, Ростокский университет, Росток, Германия

Цели исследования: синтез 5 новых серий модифицированных аналогов таксола, колхицина, подофиллотоксина, 2-метоксиэстрадиола и верубулина; изучение их действия на тубулин и сеть микротрубочек клеток карциномы легких человека A549; определение антимиотической активности полученных веществ по отношению к опухолевым и условно нормальным клеткам.

Материалы и методы. Все целевые соединения синтезированы по разработанным авторским коллективом синтетическим схемам. Действие на сеть микротрубочек изучено на культуре клеток карциномы легких человека A549 (CCL-185) методом иммунофлуоресцентной микроскопии с помощью первичных мышиных МА к α -тубулину (Sigma, США) и флуоресцентно меченных AlexaFluor488 вторичных козых антител против иммуноглобулинов мышей (Molecular Probes, США) на микроскопе Nikon Diaphot 300 (Nikon GmbH, Дюссельдорф, Германия). Определение цитотоксичности проведено в стандартном колориметрическом МТТ-тесте (Roth GmbH, Карлсруэ, Германия), а также методом прямого подсчета клеток с помощью камеры Горяева и микроскопа с фазовым контрастом. Компьютерное молекулярное моделирование проведено с помощью программы AutoDock Vina 1.1.2, а исследование — методом молекулярной динамики в силовом поле CHARMM36/CGenFF 4.4 с помощью программы GROMACS 2020.3.

Результаты. В 3 из 5 полученных серий неожиданно обнаружены соединения, проявляющие необычное действие (не характерное для лигандов колхицинового сайта) на микротрубочки опухолевых клеток. Некоторые вещества проявили очень высокую

антимиотическую активность (в субнанолярном интервале концентраций) и некоторую селективность по отношению к клеткам A549, а также заметную активность и селективность по отношению к клеткам аденокарциномы простаты человека LNCaP. На основе данных молекулярного моделирования предложены гипотезы, объясняющие необычное действие веществ 3 структурных типов на тубулин.

Заключение. Улучшенный токсикологический профиль 2 соединений делает их интересными для дальнейшего изучения в экспериментах *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 19-13-00084).

Цитотоксическое действие антибиотика митрамицина А сопровождается подавлением киназы ERK в клетках лейкоза человека

К.А. Иваненко, В.С. Прасолов, Э.Р. Вагапова

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

Введение. Лейкоз — заболевание кроветворной системы, возникающее в результате злокачественного перерождения незрелых клеток крови. Для лечения лейкозов применяют как цитотоксические, так и таргетные препараты: ингибитор киназ иматиниб — для ХМЛ, мидостаурин — для ОМЛ. Необходима разработка новых терапевтических подходов, направленных на предотвращение формирования лекарственной устойчивости клеток к ингибиторам киназ, для снижения частоты рецидивов. В научных работах и клинических испытаниях показано, что антибиотик митрамицин А обладает противоопухолевым эффектом в отношении твердотельных опухолей (его эффективность ограничена): он связывает GC-богатые участки промоторов генов, вовлеченных в развитие и прогрессию злокачественных заболеваний.

Цели исследования: изучить молекулярный механизм цитотоксического действия антибиотика митрамицина А и оценить его эффективность в сочетании с ингибиторами киназ.

Материалы и методы. Использовали перевиваемые клетки лейкоза человека — HL-60, K562, Kasumi-1, MV4, 11, THP-1, U937. Оценки токсичности митрамицина А и его способности индуцировать апоптоз проводили через 72 ч после добавления препарата. Долю апоптотических клеток в культуре определяли методом проточной цитометрии (BD, Fortessa) при добавлении к клеткам аннексина V и пропидия йодида. Анализ активности киназы ERK в клеточных лизатах проводили методом вестерн-блоттинга. Изменение мРНК генов определяли методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Митрамицин А вызывает гибель перерабатываемых клеток лейкоза человека в наномолярных концентрациях, при этом наиболее чувствительные клетки — U937, наименее чувствительные — THP-1. Митрамицин А индуцирует апоптоз во всех изученных клетках лейкоза человека, кроме клеток U937 и Kasumi-1. Обработка митрамицином А приводит к снижению активности киназ ERK во всех изученных клетках. Митрамицин А вызывает снижение мРНК генов, кодирующих рецептор фактора роста CSF1R, рецептор Wnt FZD6, ядерный фактор плюрипотентности DPPA4, в клетках K562. Иматиниб и митрамицин А индуцируют апоптоз и уменьшают активность ERK в клетках K562.

Заключение. Митрамицин А усиливает цитотоксическое действие ингибитора киназ в отношении клеток ХМЛ, что может быть использовано для разработки нового эффективного терапевтического подхода к лечению миелоидных лейкозов.

Комплексная характеристика химиорезистентных линий колоректального рака для задач экспериментальной онкологии

Н.И. Игнатова¹, И.Н. Дружкова¹, М.М. Лукина¹,
Л.Е. Шимолина¹, М.В. Ширманова²

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

²ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России, Нижний Новгород

Цель исследования — получение и комплексная характеристика химиорезистентных линий KPP на моделях *in vitro* и *in vivo* для изучения особенностей функционального состояния резистентных опухолевых клеток и ответа на лечение.

Материалы и методы. Химиорезистентные линии KPP человека HT29 и HCT116 получали путем многократного воздействия на клетки малыми дозами препаратов 5-фторурацил и оксалиплатин. Критерием формирования химиорезистентности к какому-либо препарату служило статистически значимое повышение его ингибирующей дозы IC50. На этапах формирования резистентности *in vitro* регистрировали морфологические изменения, скорость пролиферации, выживаемость. У резистентных опухолей оценивали функциональные показатели: метаболизм (методом FLIM *in vivo* с визуализацией автофлуоресценции), микровязкость (методом FLIM *in vivo* с флуоресцентным ротором). Данные показатели резистентных и нерезистентных опухолей, подверженных лечению оксалиплатином, сравнивали с показателями контрольных интактных опухолей.

Результаты. Получены резистентные линии KPP: HT29_OXO, HT29_5FU, HCT116_OXO и HCT116_5FU.

Процесс индуцирования химиорезистентности у клеточных линий занял 20 нед для HCT116 и 24 нед для HT29. Значение IC50 для HCT116_OXO увеличилось в 25,3 раза, для HCT116_5FU — в 14 раз. Для линий HT29 значение IC50 увеличилось в среднем в 3 раза. Наблюдалось снижение пролиферативной активности при повышении резистентности. Ростовые и патоморфологические характеристики химиорезистентных опухолей, полученных у иммунодефицитных мышей *Nude*, при воздействии на них оксалиплатином оказались приближены к контрольным нерезистентным опухолям без воздействия. То же относится к энергетическому метаболизму. В резистентных клетках и опухолях вязкость при лечении не изменялась, но отмечено ремоделирование липидного профиля.

Заключение. Резистентные линии — удобная модель для изучения функциональных параметров опухолевых клеток, которые могут служить индикаторами ответа на ХТ или показателем химиорезистентности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09054).

Создание базы данных опухолевых специфических Т-лимфоцитов к антигенам мышины меланомы B16F0 для анализа иммунных механизмов при иммунотерапии

А.В. Изосимова¹, Д.В. Южакова¹, В.Д. Скатова^{2,3},
Е.В. Загайнова^{1,4}, Г.В. Шаронов^{1,2,3}, Д.М. Чудаков^{1,2,3}

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;

³НИИ трансляционной медицины, ГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

⁴ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского» (Университет Лобачевского), Нижний Новгород

Введение. Все иммунотерапевтические подходы основаны на стимуляции или получении опухолевых специфических Т-лимфоцитов. При анти-CTLA4-терапии мышины меланомы B16F0 нами обнаружена активация и клональные экспансии лимфоцитов с похожими Т-клеточными рецепторами (ТКР), но их специфичность не ясна. Известно, что чек-пойнт терапия активирует не только опухолевый специфический ответ, но и реакцию к аутоантигенам и персистирующим инфекциям. Доля опухолевый специфического ответа на фоне системной активации иммунитета определяет эффективность чек-пойнт терапии, но установить ее эффективность пока практически невозможно, поэтому определение опухолевой специфичности активированных лимфоцитов — крайне актуальная задача. ее решение позволит детально проследить за формированием,

развитием и сохранением противоопухолевого иммунитета, а также выявить новые предиктивные маркеры эффективности иммунотерапии.

Цель исследования — создание базы данных ТКР, специфичных к антигенам мышшиной меланомы B16F0.

Материалы и методы. Эксперименты проводились на мышках линии C57BL/6FoxP3-EGFP, которых иммунизировали пулом 4 пептидных неоантигенов, ранее показавших высокую эффективность при вакцинации от меланомы в работах S. Kreiter и соавт. (2015). Иммунизацию проводили в подушечки задних лап (каждого пептида по 40 мкг на мышь) с адьювантом Фрейнда. Т-лимфоциты выделяли из подколенных лимфатических узлов с помощью ферментативной дезагрегации. Специфичность Т-лимфоцитов оценивали по их реактивации *in vitro* в присутствии дендритных клеток, нагруженных антигенами меланомы. В качестве маркеров реактивации приняли продукцию IFN γ или поверхностные маркеры CD25 и CD69 с помощью клеточного сортера FACSAria III. Реактивированные клетки сортировали и анализировали в них обогащение определенными ТКР.

Результаты. Лимфоциты из подколенных лимфатических узлов иммунизированных мышей селекционировали *in vitro* в течение 3 нед в присутствии дендритных клеток, нагруженных набором этих же пептидов или отдельными пептидами, после чего анализировали и выделяли активированные клетки. За 2 дня до анализа клетки дополнительно стимулировали набором или отдельными пептидами. В случае отдельных пептидов мы зарегистрировали до 40 % IFN γ ⁺- и до 75 % CD25⁺-, CD69⁺-активированных Т-клеток. Статистический анализ репертуаров активированных клеток показал достоверное обогащение 13, 8, 5 и 2 клонов в клетках, реактивированных на отдельные пептиды, по сравнению с контрольными (без пептидов) и клетками, активированными на остальные пептиды.

Закключение. Отработана методика, которая позволяет выявлять специфичность лимфоцитов к отдельным антигенам B16. С помощью отработанной методики ведется набор данных и пополнение базы данных B16-специфических ТКР, что дает возможность анализировать противоопухолевый иммунный ответ на новом уровне детализации.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Правительства Российской Федерации
(грант № 14. W03.31.0005).*

Взаимосвязь PD-L1 позитивности рака шейки матки с клинической стадией и объемом проведенной терапии

И.Ф. Солтанова кызы, Н.И. Мехдиева

Онкологическая клиника Азербайджанского медицинского университета, Баку, Азербайджанская Республика

Введение. Четвертым по распространенности онкологическим заболеванием среди женщин во всем мире считается РШМ. Он излечим при условии раннего обнаружения и надлежащего лечения. Вместе с тем он поддается профилактике. В современной онкологии определение рецептора PD-L1 в ткани опухоли, играет важнейшую роль, так как при помощи этого онкологии определяют наличие тех или иных факторов в опухоли, которые позволяют грамотно и адекватно составить дальнейшее лечение пациента и говорить о прогнозах заболевания. Оценка уровня экспрессии молекулы PD-L1 рассматривается как потенциальный биомаркер прогноза эффективности и продолжительности лечения злокачественных новообразований.

Цель исследования — изучить соотношение PD-L1 чувствительности и стадии РШМ.

Материалы и методы. исследование проводилось на операционных материалах 70 больных РШМ, подвергшихся хирургическому лечению в Онкологической клинике Азербайджанского медицинского университета за период с 2015 по 2019 г. На свежих срезах помимо стандартного гистологического исследования проводилось ИГХ-исследование (VENTANA Bench Mark Ultra) с помощью кроличьих МА к PD-L1 (VD21R) фирмы Medasys. Уровень экспрессии PD-L1 оценивался по числу клеток, тропных к антителам: при окрашивании менее 1,0 % от общей популяции клеток результат считался негативным, при окрашивании более 1,0 % — позитивным. Критерий достоверности — уровень $p < 0,05$.

Результаты. При PD-L1-позитивных вариантах РШМ IA и IIA стадии не выявлен, для IB стадии — 11 ($57,9 \pm 11,3$ %), IIIC — 8 ($42,1 \pm 11,3$ %) случаев РШМ. Обращает на себя внимание полное отсутствие среди PD-L1⁺-случаев больных в IA стадии, т. е. те варианты РШМ с минимальной (<5 мм) инвазией могут определяться только микроскопически. В обеих группах преобладает IB стадия, однако в основной группе доля этих пациенток достоверно ниже, чем в контрольной ($57,9 \pm 11,3$ и $74,5 \pm 6,1$ % соответственно). С нашей точки зрения, наиболее важный факт — явное преобладание среди PD-L1-позитивных больных случаев в IIIC стадии ($42,1 \pm 11,3$ %) по сравнению с таковой у PD-L1-негативных ($3,9 \pm 2,7$ %). Распределение по стадиям нашло свое отражение и в применяемых

методах лечения. Частота хирургического, комбинированного и комплексного лечения у PD-L1-позитивных пациенток следующая: 1 ($5,3 \pm 5,1$ %), 11 ($57,9 \pm 11,3$ %) и 7 ($36,8 \pm 11,1$ %) случаев соответственно. Так, частота применения хирургического лечения в основной группе была достоверно меньше, чем в контрольной: $5,3 \pm 5,1$ и $29,4 \pm 6,4$ % соответственно. Помимо этого, процент больных, получивших комплексное лечение, в основной группе был значительно выше, чем в контрольной: $36,8 \pm 11,1$ и $7,8 \pm 3,8$ % соответственно.

Закключение. В ходе исследования было установлено наличие корреляционных связей между PD-L1-экспрессией и определенными клинико-морфологическими параметрами, такими как размер и степень дифференциации опухоли, метастазирование в лимфатические узлы, стадия заболевания и вид лечения. В то же время выявлено отсутствие зависимости возрастных характеристик больных, глубины инвазии опухоли от PD-L1-статуса. С клинической точки зрения особую значимость имеет также соотношение PD-L1-чувствительности и стадии заболевания, так как данный критерий основополагающий в планировании адъювантного лечения и назначении системной терапии.

Усиленная термо- радиосенсибилизация опухолевых клеток HeLa при подавлении HSF1- зависимого транскрипционного стресс-ответа

А.Е. Кабаков, А.О. Якимова, А.В. Хохлова, В.А. Мосина
Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба,
филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России,
Обнинск

Введение. Гипертермия применяется в комбинации с лучевой терапией для усиления радиационного ответа опухоли-мишени. Однако прогревание злокачественных клеток активирует в них транскрипционный фактор HSF1 и стимулирует HSF1-зависимый стресс-ответ с индукцией белков теплового шока (БТШ), которые могут ослаблять противоопухолевые эффекты гипертермии и облучения. Актуальной задачей представляется разработка подходов к усилению радиосенсибилизирующего действия гипертермии на опухоли.

Цель исследования — проверить на модели *in vitro* возможность усиления радиосенсибилизирующего действия гипертермии на раковые клетки человека путем подавления в них HSF1-опосредованной индукции БТШ.

Материалы и методы. Объект исследования — клеточная линия HeLa, происходящая из опухоли шейки матки человека. Перед облучением (2–7 Гр

на установке с (60) Со) культуры клеток подвергали тепловому стрессу ($42–44$ °С в течение 20–60 мин) без или в присутствии ингибиторов HSF1 (кверцетин, триптолид, KRIBB11). В отдельных образцах клеток предварительно устраивался нокдаун HSF1 с использованием малых интерферирующих РНК. Динамику экспрессии стресс-индуцибельных БТШ90, БТШ70 и БТШ27 определяли методом ПЦР. Гибель и выживание обработанных клеток оценивали по уровню апоптоза или некроза, по клоногенности и в МТТ-тесте. Протеотоксичность воздействий и субклеточное перераспределение БТШ анализировали с помощью фракционирования клеток, электрофореза и иммуноблоттинга.

Результаты. Обнаружено, что по сравнению с эффектами применения только одной гипертермии сочетанное воздействие (прогрев + ингибирование или нокдаун HSF1) значительно усиливало термо-радиосенсибилизацию раковых клеток, что проявлялось в интенсификации их пострадиационной гибели (апоптоза и некроза), а также резком снижении их жизнеспособности (в МТТ-тесте) и клоногенности. Такое усиление термо-радиосенсибилизации наблюдалось на фоне блокады индукции БТШ, что сопровождалось повышенной протеотоксичностью теплового воздействия на клетки-мишени — относительным увеличением уровня агрегированного клеточного белка и истощением цитозольного пула конститутивных БТШ.

Закключение. Комбинация гипертермии с ингибиторами активности или экспрессии HSF1 может усиливать сенсибилизацию термо- и радиорезистентных опухолей к лучевой терапии.

Циклофилин А как фактор повышения эффективности адоптивной клеточной терапии

А.А. Калинина, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Одно из перспективных направлений в лечении онкологических заболеваний — АКТ на основе опухолеспецифических Т-лимфоцитов. Разработка стратегий, позволяющих поддерживать эффективность адоптивно перенесенных Т-лимфоцитов, остается актуальной практической задачей развития данного направления иммунотерапии рака. Циклофилин А (ЦфА, 18 кДа) — консервативный мультифункциональный белок, обладающий изомеразной активностью. Ранее в нашей лаборатории показано, что ЦфА служит фактором противоопухолевой защиты организма на ранних стадиях развития опухоли и стимулирует противоопухолевый иммунитет за счет активации врожденного и адаптивного иммунного ответа. Кроме того, ЦфА обладает костимуляторной и комитогенной активностью в отношении

В-лимфоцитов и активированных Т-лимфоцитов и участвует в регуляции эффекторной фазы иммунного ответа.

Цель исследования — изучить влияние ЦФА на эффективность АКТ.

Материалы и методы. Работу проводили на модели отторжения лимфомы EL4 мышами B10.D2 (R101) с использованием рекомбинантного ЦФА человека (рЧЦФА). В качестве источника опухолеспецифических Т-клеток для АКТ использовали Т-лимфоциты селезенки трансгенных мышей 1D1a (B10.D2 (R101) с врожденно сформированным пулом Т-клеток, способных специфически распознавать лимфому EL4. Спленциты мышей 1D1a одновременно с клетками EL4 переносили внутрибрюшинно (i. p.) сингенным мышам дикого типа в дозе $5,0 \times 10^6$ или $2,5 \times 10^6$ кл/мышь (соответственно в 2 и 4 раза меньше эффективной терапевтической дозы). РЧЦФА в дозе 100 мкг/мышь вводили i.p. 1 раз в течение 3 дней после adoptивного переноса. Влияние рЧЦФА на эффективность АКТ оценивали по анализу числа опухолевых клеток и эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺ ЦТЛ) в брюшной полости экспериментальных животных на 6-й день после adoptивного переноса.

Результаты. Показано, что введение рЧЦФА после переноса $2,5 \times 10^6$ трансгенных лимфоцитов снижает число клеток EL4 в 1,7 раза и стимулирует накопление ЦТЛ в 2,8 раза по сравнению с контрольной группой (adoptивный перенос без рЧЦФА). Введение рЧЦФА после переноса трансгенных спленцитов ($5,0 \times 10^6$ кл/мышь) привело к полной элиминации опухолевых клеток у мышей-реципиентов. Этот эффект не наблюдали в отсутствии рЧЦФА и в случае adoptивного переноса аналогичного числа спленцитов мышей дикого типа.

Заключение. Наше исследование показало, что рЧЦФА способен значительно усиливать эффективность АКТ за счет стимуляции эффекторных функций опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов.

Репликативный стресс в рибосомных генах в ядрышке

О.Л. Кантидзе

ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва

Введение. Репликативный стресс — один из основных источников нестабильности генома. Хотя клеточный ответ на репликативный стресс достаточно хорошо изучен, практически ничего не известно о механизмах репликативного стресса в ядрышке/рибосомных генах (рДНК). Хотя клеточный ответ на ядрышковый репликативный стресс имеет много общих черт с классическим ответом на такой стресс, возникающий в других областях генома, он, тем не менее, обладает и уникальными характеристиками. К наиболее важным из них стоит отнести зависимость клеточного ответа на ядрышковый репликативный стресс

от белка Treacle и образование крупных фокусов Treacle — TOPBP1.

Цель исследования — изучить молекулярные механизмы, участвующие в защите клетки от репликативного стресса, индуцированного в рДНК (ядрышке) высших эукариот.

Заключение. Наши данные демонстрируют важность макромолекулярных агрегатов Treacle — TOPBP1 в качестве платформы, которая обеспечивает рекрутирование в ядрышки факторов клеточного ответа на стресс, усиление активации ATR-зависимых сигнальных каскадов и, как следствие, ограничение нестабильности генома.

Воспалительный ответ на противоопухолевое лечение

Н.А. Кармакова, Н.С. Сергеева, И.И. Алентов, О.С. Слукникова, Л.В. Болотина, А.А. Пайчадзе

Московский научный исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России

Местные и системные реакции, лежащие в основе воспалительного ответа, играют существенную роль в возникновении и прогрессии злокачественных новообразований. Хорошо известна этиологическая связь хронических воспалительных заболеваний с повышенным риском развития злокачественных опухолей ряда локализаций. На молекулярном и клеточном уровнях описаны механизмы опухоль-промотирующего воспаления, которые могут приводить к накоплению мутаций и эпигенетических изменений, усилению пролиферации и подавлению апоптоза, активации неоангиогенеза, иммуносупрессии, стимуляции инвазии и метастазирования опухолевых клеток. По данным клинических исследований, наличие признаков системной воспалительной реакции у онкологических больных коррелирует с большей распространенностью опухолевого процесса, меньшей продолжительностью жизни пациентов и слабым ответом опухоли на лекарственное лечение.

В меньшей степени изучен феномен воспалительного ответа, индуцированного противоопухолевой терапией. Считается, что продукты деградации опухолевых клеток могут оказывать иммуностимулирующее действие («вакцинация *in situ*»), тем самым дополняя противоопухолевый эффект лечения. Однако в экспериментальных исследованиях показано, что цитотоксическая ХТ может активировать антиапоптотические гены и гены, отвечающие за лекарственную устойчивость, приводить к изменению микроокружения опухолевых клеток, что способствует их диссеминации. Выделение опухолевыми клетками экзосом, индуцированное действием цитостатиков, и выброс из поврежденной опухолевой ткани в системный кровоток

провоспалительных медиаторов могут способствовать формированию преметастатических ниш.

Клинические исследования системного воспалительного ответа у больных на фоне ХТ единичны, однако их результаты, в том числе предварительные данные нашего собственного исследования, свидетельствуют о корреляции между низким уровнем цитокинов в крови и полным ответом опухоли на НХТ у больных РМЖ.

Изучение механизмов взаимосвязи между эффективностью лекарственного лечения и системным воспалительным ответом, поиск предикторных маркеров возможного парадоксального ответа опухоли на ХТ, а также способов купирования нежелательных опухоль-прототирующих воспалительных реакций могут дать основу для разработки методов повышения эффективности консервативного противоопухолевого лечения.

Обоснование персонифицированной противоопухолевой терапии моноклональными антителами

Карпова О.А.

ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Барнаул»

Введение. При проведении МА-фармакотерапии в онкологии наиболее частые осложнения почти в 80 % случаев — различные дерматологические реакции. Кожная токсичность напрямую зависит от эффективности противоопухолевого лечения. Поражение кожи, особенно на открытых участках, существенно ухудшает качество жизни онкологических больных, и может стать причиной редукции доз противоопухолевых препаратов вплоть до полной их отмены, что и определило актуальность данного исследования.

Цель исследования — изучить кожные токсические реакции на применение МА в комплексной противоопухолевой терапии.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 10 пациенток с диагнозом РМЖ от T1cN1M0 IIA до T4bN3M0 IIIc стадии, без сопутствующей дерматологической патологии. Все пациентки получали комплексное лечение: ХТ, оперативную, а также биотерапию моноклональными антителами (трастузумаб, пертузумаб).

Результаты. Через 2–5 нед терапии у 9 (90 %) пациенток появились акнеподобные высыпания, представленные в 100 % случаев папулезными, а в 50 % — пустулезными элементами. Через 3–6 нед присоединился выраженный ксероз кожи у 8 (80 %), ограниченная кератодермия — у 5 (50 %) женщин. Ладонно-подошвенный синдром различной степени тяжести развился через 5–8 нед у 8 (80 %), из них с полной отслойкой эпидермиса на кистях у 5 (50 %) пациенток. Далее, на 12-й неделе у 6 (60 %) добавилось изменение ногтевых

пластинок кистей и стоп, у 2 (20 %) больных то же вплоть до полного онихолизиса.

Заключение. Исследование показало, что поражения кожи развиваются у 90 % больных РМЖ, получающих лечение МА. Это делает необходимым персонифицировать диагностику, терапию, профилактику и реабилитацию пациентов, получающих МА-терапию опухолей.

Сравнительная оценка активности противоопухолевых препаратов на клеточных культурах глиобластомы человека при культивировании в монослое (2D) и сфероиде (3D)

С.Ш. Каршиева¹, Е.В. Кудан¹, О.Ю. Сусова²,
Е.А. Буланова², Ю.Д. Хесуани¹, В.А. Миронов¹,
А.А. Митрофанов², Д.Р. Насхлеташвили², А.Х. Бекишев²

¹Лаборатория биотехнологических исследований
«ЗД Биопринтинг Соломенс», Москва;

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

Введение. Трехмерные модели опухолей *in vitro* позволяют лучше воспроизводить их пространственную организацию и реалистично отражать ответ на лекарственное воздействие. В отличие от стандартных протоколов тестирования на панели клеточных линий в тест-системе, включающей сфероиды из первичных культур опухолевых клеток, учитываются условия микроокружения опухоли, ее архитектура и гетерогенность клеточной популяции, что особенно важно при глиобластомах, характеризующихся высокой пластичностью и резистентностью к ХТ.

Цель исследования — сравнить противоопухолевую активность препаратов на первичных культурах глиобластомы человека в условиях 2D- и 3D-культивирования.

Материалы и методы. В исследовании использовали первичные культуры (Glb11p, Glb26p) и клеточную линию U251 глиобластомы человека. Первичные культуры получены из операционного материала пациентов с диагнозом «глиобластома» в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Для получения сфероидов готовили суспензию клеток в ростовой среде (концентрация — 10 тыс. клеток на 1 мл) и наносили по 100 мкл суспензии в каждую лунку 96-луночного планшета с низкодозивным покрытием. Через 72 ч к сфероидам добавляли доксорубин, цисплатин, этопозид, иринотекан, ломустин, темозоломид в концентрациях 10^{-3} – 10^{-8} М. Через 72 ч после инкубации в каждую лунку планшетов добавляли тест-систему на живые клетки CellTiter-Glo 3D в соотношении 1 : 1 по объему и инкубировали в течение

60 мин. Интенсивность люминесценции измеряли с помощью мультифункционального планшетного анализатора.

Результаты. Доксорубин имеет наиболее высокую цитотоксическую активность среди протестированных агентов, при этом его активность на порядок выше в клетках глиобластом, культивированных в монослое по сравнению со сфероидом. Чувствительность клеток к доксорубину возрастает в ряду Glb11p-Glb26p-U251, и эта тенденция сохраняется независимо от условий культивирования. Цисплатин слабоактивен в отношении первичных глиобластом, культивированных в 2D- и 3D-условиях ($IC_{50} > 10$ мкМ), наибольшую активность проявляет на клетках U251 (5,6 мкМ IC_{50} в монослое и 4,4 мкМ IC_{50} в сфероидах). Активность этопозиды выше на клетках Glb11p в монослое (IC_{50} 7,9 мкМ) и несколько ниже в сфероидах (IC_{50} 5,8 мкМ) по сравнению с U251 и Glb26p ($IC_{50} > 10$ мкМ). Темозоломид, ломустин и иринотекан обладают низкой цитотоксической активностью в отношении изученных культур глиобластомы человека.

Закключение. Первичные культуры глиобластом в целом менее чувствительны к цитотоксическому действию противоопухолевых препаратов, чем клеточная линия. В культуре сфероидов (3D) активность препаратов сопоставима или ниже, чем в монослое (2D).

Биологические свойства экидистерона в клеточных моделях карциномы легкого

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

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. 20-Hydroxyecdysone, известный как экидистерон, обладает целым спектром полезных фармакологических свойств. Он снижает концентрацию сахара в крови, проявляет антиоксидантную активность, обладает кардио- и нейропротекторными свойствами. Благодаря анаболической активности экидистерон часто используется спортсменами в виде БАДов для повышения физических качеств, включая силовые показатели и выносливость. Источники экидистерона на рынках — растения цианотис пауковидный (*Cyanotus arachnoidea*), а также легендарное сибирское растение *Leuzea carthamoides*, известное как маралий корень. Экидистерон получают из этих растений с различной степенью очистки. Во многих научных работах исследуется влияние экидистерона на множество биологических процессов. Однако во многих публикациях не указывается степень очистки экидистерона. Это может служить причиной противоречивых результатов научных работ, поскольку экидистерон-содержащие экстракты содержат и другие биологически активные вещества, в первую очередь флавоноиды и хлорогеновые кислоты.

В связи с этим встает вопрос оценки фармакологических эффектов и лежащих в их основе молекулярных механизмов, опосредованных «чистым» экидистероном.

Цель исследования — изучение биологических свойств экидистерона высокой степени очистки в клеточных моделях карциномы легкого.

Материалы и методы. В работе оценивали воздействие экидистерона на пролиферацию, клеточный цикл и устойчивость к доксорубину, цисплатину и γ -излучению клеточных моделей карциномы легкого.

Результаты. Экидистерон снижал пролиферацию опухолевых клеток, что также отражалось на клеточном цикле. В отличие от цисплатина и γ -излучения экидистерон сенсibilизировал опухолевые клетки к генотоксическому агенту доксорубину. Полученные данные обрабатывались методом расчета комбинационных индексов (CI) по алгоритмам Chou — Talalay. С использованием проточной цитометрии показано отсутствие влияния экидистерона на накопление доксорубина в клетках.

Закключение. Экидистерон *in vitro* обладает противоопухолевыми свойствами. Он повышает восприимчивость клеток карциномы легкого к доксорубину, не влияя при этом на его внутриклеточное накопление. Необходимы дополнительные эксперименты по изучению молекулярных механизмов, опосредующих экидистерон-зависимую сенсibilизацию к доксорубину, в отличие от цисплатина и γ -излучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 21-75-10138).

Прогностическая значимость экспрессии PD-L1 в хордомидах

О.В. Ковалева¹, Е.В. Козлова², А.Н. Грачев¹, Н.С. Бабкин¹,
Э.Р. Мусаев³, И.В. Булычева¹

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

²ГБУЗ «Ленинградский областной клинический онкологический диспансер им. Л.Д. Романа», Санкт-Петербург;

³ГБУЗ «Московская городская онкологическая больница №62 ДЗМ»

Введение. Хордомы — редкие злокачественные новообразования, характеризующиеся высокой частотой рецидивов и ограниченными способами лечения. Несмотря на редкую встречаемость данный тип опухолей составляет более 50 % всех первичных новообразований крестца. Инвазия в жизненно важные структуры нервной системы усложняет их терапию и повышает показатели смертности. Поиск новых методов лекарственной терапии, в частности иммунотерапии, данного типа опухолей — актуальная проблема.

Цели исследования: изучение экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках и в инфильтрирующих опухоли лимфоцитах в образцах хордом, а также ассоциация

экспрессии с клинико-морфологическими характеристиками опухолей.

Материалы и методы. Проведен анализ экспрессии PD-L1 в 30 первичных хордомиомах ИГХ-методом. Для определения статистически значимых различий в независимых группах использовали критерии Краскела — Уоллиса и χ -квадрат. Анализ выживаемости проводили путем построения кривых выживаемости по методу Каплана — Мейера. Сравнение достоверности различий проводили при помощи логарифмического рангового критерия. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты: Экспрессия PD-L1 обнаружена в опухолевых клетках (43 % образцов), а также в инфильтрирующих опухоль лимфоцитах (80 % образцов). Показано, что экспрессия PD-L1 практически не ассоциирована с клиническими характеристиками заболевания. Однако экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках во всех образцах положительно коррелирует с содержанием данного маркера в лимфоцитах ($r = 0,409$, $p = 0,028$). Показано, что различные гистологические варианты хордом отличаются по содержанию PD-L1 как в опухолевых клетках, так и в лимфоцитах. Экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках не служит прогностическим фактором заболевания, в то время как экспрессия данного белка в лимфоцитах имеет тенденцию к благоприятному прогнозу (HR = 0,1429; $p = 0,0570$).

Заключение. Проведенный анализ показал, что в дифференцированной хордоме обнаружен наименьший уровень экспрессии PD-L1 как в клетках опухоли, так и в лимфоцитах. Экспрессия PD-L1 в лимфоцитах ассоциирована с благоприятным прогнозом хордом и указывает на перспективы использования ингибиторов контрольных точек иммунитета в их терапии.

Молекулярно-генетическое тестирование мутаций в генах *BRCA* у пациентов со злокачественными новообразованиями яичника

Е.А. Колесникова¹, Д.А. Давыдова¹, Е.С. Никифорова¹,
С.В. Гамаюнов¹, М.Г. Гордиев²

¹ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер» Минздрава России;

²ООО «Национальный БиоСервис», Санкт-Петербург

Введение. Гены *BRCA1/2* играют ключевую роль в системе гомологичной репарации ДНК, это одни из наиболее часто мутирующих генов при серозной карциноме яичников (22–28 %).

Цель исследования — оценить распространенность и спектр мутаций в генах *BRCA1/2* в группе нижегородских пациенток со злокачественными новообразованиями яичника.

Материалы и методы. Материалом для молекулярно-генетического исследования мутационного статуса генов *BRCA1/2* служила ДНК, полученная из образцов цельной крови и опухолевой ткани (FFPE). В работе использованы 2 методики: на 1-м этапе проводилось ПЦР-тестирование ДНК (372 женщины) для выявления частых герминальных мутаций, на 2-м этапе — NGS-секвенирование (216 женщин) для поиска редких наследственных и соматических мутаций в полных последовательностях генов *BRCA1/2*. ПЦР-тестирование вели с использованием набора реагентов ОнкоГенетика BRCA (ДНК-Технология). Подготовка библиотек для секвенирования осуществлялась с помощью NimbleGen SepCapEZ Choice (Roche) и рекомендуемых производителем реагентов. Секвенирование проводилось на приборе MiSeq (Illumina).

Результаты. Установлено, что при использовании метода ПЦР частые герминальные мутации выявлены в 13,2 % (49 из 372 больных) случаев РЯ. Наиболее распространенные патогенные варианты гена *BRCA1*: мутации 5328insC, 2080delA и 3819delGTAAA составили 63,3 % (31 из 49), 12,2 % (6 из 49) и 10,2 % (5 из 49) случаев соответственно. По 2 пациентки имели мутации 300T>G (Cys61Gly), 185delAG и 4153delA, одна больная — мутацию 3875delGTCT. С использованием NGS-секвенирования редкие и соматические мутации в генах *BRCA1/2* выявлены у 25 (11,6 %) пациенток. Соотношение частоты мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* составило 1: 1 (13 пациенток с мутациями в гене *BRCA1*, 12 — в гене *BRCA2*). У 3 нижегородских пациенток в гене *BRCA1* выявлена замена с. 1687C>T. На долю этой замены приходится значительная часть случаев семейного рака в Австрии, Словении и Швеции. В гене *BRCA2* чаще остальных встречались замены с. 3296C>A (р. S1099X) и с. 5286T>G (р. Y1762X), приводящие к преждевременному появлению стоп-кодона.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что более 20 % случаев РЯ нижегородских пациенток обусловлено мутациями в генах *BRCA1/2*. Использование современных омиксных технологий, в частности NGS, позволяет определять весь спектр патогенных герминальных и соматических мутаций в генах *BRCA1/2*, что играет ключевую роль при выборе эффективной тактики лечения для данной категории больных.

Экспрессия протеогликанов в клеточных линиях глиобластомы в зависимости от их культивирования в 2D- и 3D-условиях

Е.Ю. Кулагина, Э.В. Григорьева, А.Ю. Цидулко

ФГБНУ «Федеральный научный центр фундаментальной
и трансляционной медицины», Новосибирск

Введение. Глиобластома — наиболее агрессивная опухоль головного мозга, в развитии которой важную роль играет опухолевое микроокружение, включающее в себя незлокачественные клетки стромы и ВКМ. Основным компонент ВКМ в нервной ткани — протеогликан (ПГ). На данный момент большинство исследований проводится с использованием 2D-культур клеток глиобластомы *in vitro*, однако такая модель имеет ряд недостатков, в том числе отсутствие ВКМ. В качестве физиологически более корректной модели может быть использована 3D-культура клеток глиобластомы.

Цель исследования — сравнительный анализ экспрессии протеогликанов в 2D- и 3D-культурах разных клеточных линий глиобластомы человека.

Материалы и методы. В работе использованы клеточные линии глиобластомы человека U-87MG, LN18, HS683, U343. Клетки выращивали в виде 2D-культур и 3D-сфероидов с использованием планшетов с ультранизкой адгезией. Экспрессию коровьих белков ПГ (синдекан-1, синдекан-3, глипикан-1, перлекан, нейрокан, версикан, бревикан, агрекан, CD44, NG2, CSPG5, декорин, бигликан, люмикан и фосфакан) определяли при помощи ОТ-ПЦР в реальном времени.

Результаты. Показано, что в 2D-культурах разных клеточных линий экспрессия ПГ различна: в U-87MG в отличие от остальных клеточных линий экспрессируется фосфакан, но не экспрессируется бигликан; в LN18 преобладает экспрессия глипикана-1; во всех клеточных линиях наблюдается высокая экспрессия CD44. При культивировании в сфероиде во всех клеточных линиях возрастает общий уровень экспрессии ПГ (в U87 — в 2,8 раза, в LN18 — в 1,9 раза, в HS683 — в 1,9 раза), при этом паттерн экспрессии изменяется неодинаково. В U-87MG и LN18 в 3D-культуре снижается экспрессия CD44 (в 5,2 и 1,4 раза соответственно). В U-87MG также усиливается экспрессия перлекана (в 1,9 раза) и фосфакана (в 14,8 раза). В LN18 повышается экспрессия бигликана (в 5,3 раза) и снижается экспрессия глипикана-1 (в 1,8 раза) по сравнению с 2D-культурой. Паттерн экспрессии ПГ в клетках HS683 в 3D-культуре не отличается.

Заключение. Разные клеточные линии глиобластомы отличаются по уровню и паттерну экспрессии ПГ. В 3-мерных сфероиде экспрессия ПГ повышается относительно 2D-культуры во всех клеточных линиях, и эти изменения

происходят специфично для каждой клеточной линии. Полученные данные вносят вклад в понимание природы гетерогенности клеток глиобластомы и позволяют предложить 3D-сфероиды в качестве более оптимальной модели для изучения роли ВКМ в развитии глиобластомы.

Новые 3-аминоизохинолины — селективные ингибиторы PDE4B показали антипролиферативные свойства на моделях колоректального рака *in vitro* и *in vivo*

Г.Б. Лапа¹, Н.И. Моисеева², Т. Цунода³

¹ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»

Минздрава России, Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва;

³Департамент клеточной биологии медицинского факультета, Университет Фукуоки, Фукуока, Япония

Введение. Большинство опухолей желудочно-кишечного тракта имеют мутантные гены *KRAS* (*mtKRAS*), поэтому комбинированная терапия, подавляющая и *mtKRAS* белок, и другие компоненты сигнального пути *KRAS*, — рациональная стратегия лечения. На биопсийном материале KPP показали, что ген *mtKRAS* дезрегулирует и ген фосфодиэстеразы 4B (*PDE4B*), при этом *PDE4B* гиперэкспрессирована. Ранее мы уже разработали селективные синтетические аналоги папаверина, ингибиторы *PDE4B* с цитотоксическим эффектом на линиях HCT116, HKe3 и K562.

Цель исследования — поиск новых селективных ингибиторов (*PDE4B*).

Материалы и методы. Молекулярный докинг, МТТ-тест, фенотипический скрининг на сфероидных линиях, ксенографты на мышах линии *Nude*.

Результаты. Методом молекулярного докинга на 1хm4. pdb и фармакофорного моделирования разработали и синтезировали новую библиотеку соединений с гибкими линкерами между 3-амино-изохинолином и замещенными арилами. Цитотоксическая активность веществ на линиях HCT116 и K562 варьировалась в диапазоне IC50 от 0,8 до 50 мкМ. Лидерные соединения отобрали фенотипическим скринингом на 2 сфероидных (3DF) линиях HKe3-wtKRAS (normal model) и HKe3-mtKRAS (cancer model), отличавшихся гиперэкспрессией *PDE4B*, нарушенным сигналингом цАМФ и высокой скоростью пролиферации. Лидеры (LGB-089, LGB-096 и др.) оказались селективны для *PDE4B* из 3DF HKe3-mtKRAS (cancer model) с IC50 для *PDE4B* 1,6–8,0 мкМ. Рост ксенографта HCT116 подавлялся LGB-089 (концентрация — 40 мг/кг) на 61 % за 6 дней, при этом апремиласт (ингибитор *PDE4B*) тормозил рост на 83 % при концентрации — 30 мг/кг.

Закключение. Синтезированы новые перспективные селективные ингибиторы PDE4B, показывающие противоопухолевую активность как *in vitro*, так и *in vivo*.

Исследование цитотоксической и антиметастатической активности спиросочлененных триптантринов и пирролопирролизинов

Д.К. Латыпова¹, С.В. Шмаков¹, Н.А. Князев¹, В.М. Бойцов^{2,3}

¹ГБУЗ «Санкт-Петербургский КНЦ специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»;

²ФГБОУ ВО ИХ «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж.И. Алфёрова РАН»;

³ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Введение. Одна из основных причин смертности от опухолевых заболеваний — возникновение метастазов.

Цели исследования: проанализировать действие новых потенциально противоопухолевых антиметастатических веществ на основе спиросочлененных триптантринов и пирролопирролизинов; провести сравнение цитотоксичности пар диастереомеров; изучить влияние на клеточный цикл, митохондриальный потенциал и эффективность миграции.

Результаты. С помощью MTS-теста проведено сравнение цитотоксичности полученных пар диастереомеров на опухолевых культурах HeLa, K-562, выявлена существенная разница в активностях R- и S-изомера: значение IC₅₀ для клеток K-562 составило 1,9 ± 0,2 мкг/мл для R-изомера и 14,9 ± 0,5 для S-изомера (72 ч). Методом проточной цитофлуориметрии показано, что при воздействии на клетки HeLa более активным R-изомером в фазу G2/M переходит 38,5 ± 1,1 % от всей популяции клеток, при воздействии S-изомером 26,8 ± 1,2 %, в то время как в контрольных образцах в данной фазе находится 15,1 ± 1,5 %. На опухолевой культуре HeLa и нормальной культуре 3T3-B показано (метод проточной цитометрии) изменение митохондриального потенциала под действием веществ. В опухолевой линии детектировано уменьшение числа клеток с нормально функционирующими митохондриями на 22 % под действием препаратов по сравнению с контролем. Также получен менее существенный эффект на линии 3T3-B: число клеток с нормально функционирующими митохондриями уменьшилось на 3 % под действием R-изомера и на 8 % — под действием S-изомера. Методом Scratch-test на конфокальном микроскопе после 36 ч с момента добавления изомеров, когда в контроле произошло смыкание краев царапины, клетки в культуре HeLa, к которым добавлены препараты,

не продемонстрировали застывание исходной царапины, что свидетельствует о снижении эффективности миграции. При постановке аналогичного эксперимента на культуре 3T3-B существенных отличий от контроля при добавлении веществ не наблюдалось.

Закключение. Полученные результаты позволяют говорить, что существуют специфичное воздействие спиросочлененных триптантринов и пирролопирролизинов на клеточные культуры, зависимость эффективности от пространственной ориентации групп относительно спироатома, а также потенциальная возможность применения данных соединений в противоопухолевой терапии.

Ингибирование экспрессии гена REDD1 для снижения побочных эффектов глюкокортикоидов в клетках рака молочной железы

Е.С. Лылова¹, Д.В. Демина², Д.Д. Григорьева¹, Е.М. Жидкова¹, Е.А. Лесовая^{1,3}

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

²ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва;

³ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России

Введение. Глюкокортикоиды (ГК) используются в качестве адъювантов при терапии РМЖ, однако их длительное применение сопряжено с развитием серьезных побочных эффектов. Биологические эффекты ГК реализуются путем связывания с ГК-рецептором, димеризация которого опосредует побочные эффекты, в то время как связывание мономерной формы ГК-рецептора с транскрипционными факторами ассоциировано с терапевтическим действием ГК. Один из генов, ассоциированных с развитием побочных эффектов ГК, — *REDD1*, его экспрессия связана с развитием ГК-индуцированной атрофии и остеопороза, а также в ряде случаев с повышенной злокачественностью и агрессивностью опухолей. Данная работа посвящена исследованию возможности применения ингибиторов *REDD1* для устранения побочных эффектов ГК в отношении клеток РМЖ.

Цель исследования — экспериментальное выявление ингибиторов *REDD1* на клеточных линиях люминального и тройного негативного РМЖ *in vitro*.

Материалы и методы. В работе использовали клеточные линии тройного негативного РМЖ (MDA-MB-231) и люминального (MCF7) РМЖ и потенциальные ингибиторы *REDD1*: апигенин, ресвератрол, куркумин, эметин, CGP60474, рапамицин, вортманнин, LY294002 и глюкокортикоид дексаметазон. Клетки инкубировали с нетоксическими (10 нМ) дозами

веществ и (или) ГК (100 мкМ). Экспрессию гена *REDD1* и маркера димеризации FKBP51 оценивали количественной ПТ-ПЦР, а изменение количества белка *REDD1* и влияние веществ на количество фосфорилированной формы белка ГР при помощи вестерн-блоттинга.

Результаты. Показано, что все соединения, кроме эметина, подавляют ГК-индуцированный и базальный уровень экспрессии гена *REDD1* в клетках люминального и тройного негативного РМЖ. На уровне белка наиболее выраженный эффект в клетках РМЖ наблюдался для ресвератрола, CGP60474, вортманнина, рапамицина и апигенина. Также комбинация соединений с ГК подавляла димеризацию рецептора.

Заключение. Экспериментально доказана способность эффективно снижать базальный и ГК-индуцированный уровень экспрессии *REDD1* на уровне мРНК и белка в клетках РМЖ для CGP60474, рапамицина, вортманнина, ресвератрола, и апигенина. Все активные в отношении *REDD1* соединения при комбинированном применении с ГК препятствуют запуску димеризации ГК-рецептора и предотвращают развитие ГК-индуцированных побочных эффектов. Отобранные соединения могут быть рекомендованы для разработки более безопасных протоколов терапии РМЖ с использованием ГК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-75-20124).

Природные лиганды в составе CAR-T-рецепторов как эффективная замена scFv

В.Е. Майорова, М.Д. Моллаев, П.Н. Вихрева,
Е.А. Кулаковская, Д.Е. Першин, А.В. Кибардин,
М.А. Масчан, С.С. Ларин

ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дм. Рогачева» Минздрава России, Москва

Введение. В норме рецепторная тирозинкиназа Flt3 служит маркером ранних гемопоэтических клеток. Агонист данного рецептора — Flt3-ligand. В большинстве случаев ОМЛ патологические клетки несут на поверхности Flt3 в повышенном количестве. Flt3 считается перспективной молекулярной мишенью для иммунотерапевтического элиминирования опухолевых клеток при ОМЛ, включая CAR-T-терапию. Традиционно химерный рецептор включает последовательность одноцепочечного (scFv) антитела, распознающего опухолевый маркер.

Цель исследования — изучить возможность применения полноразмерной последовательности естественного лиганда Flt3-ligand для таргетирования рецепторной молекулы Flt3 на поверхности клеток-мишеней. Ожидается, что последовательность Flt3-ligand в составе химерной конструкции (в отличие от искусственно созданных антительных последовательностей)

будет в меньшей степени стимулировать спонтанную активацию Flt3-CAR-T-клеток, не связанную с узнаванием специфической мишени.

Материалы и методы. Спроектирована и получена генетическая конструкция химерного рецептора, содержащая полноразмерную последовательность Flt3-ligand для узнавания маркера ОМЛ Flt3.

Результаты. Полученные лентивирусной трансдукцией Flt3-CAR-T-клетки разрушают Flt3-позитивные клетки опухолевой линии ТНР-1, но не мешают пролиферации Flt3-негативных контрольных клеток опухолевой линии U937. Показано отсутствие прямой цитотоксичности конструкции Flt3-CAR. Можно сделать вывод, что для специфического киллинга клеток-мишеней необходима активация Т-клеточных механизмов цитотоксичности. Цитотоксичность Flt3-CAR-T-клеток дозозависимо ингибируется в присутствии рекомбинантного Flt3-ligand. Следовательно, Flt3-CAR взаимодействует с Flt3 через сайт связывания Flt3: Flt3-ligand. Таким образом, получены Flt3-CAR-T-клетки, несущие в составе химерного рецептора полноразмерную последовательность оригинального Flt3-ligand. Такие Flt3-CAR-T-клетки взаимодействуют с клетками-мишенями через сайт связывания Flt3-ligand: Flt3 рецептора Flt3 на поверхности клетки-мишени. Вследствие активации Т-клеточных механизмов киллинга Flt3-CAR-T-клетки специфически разрушают Flt3-позитивные клетки ТНР-1.

Заключение. В данной работе впервые предложено использовать для таргетирования рецепторной молекулы Flt3 на поверхности клеток-мишеней полноразмерную последовательность его естественного лиганда Flt3-ligand. Последовательность Flt3-ligand, в отличие от искусственно созданных антительных последовательностей, в составе химерной конструкции в меньшей степени стимулирует спонтанную активацию Flt3-CAR-T-клеток, не связанную с узнаванием специфической мишени. Можно предложить использовать природные лиганды в составе CAR-T-рецепторов как эффективную замену scFv.

Изучение противоопухолевой активности фармацитов на основе Т-лимфоцитов, модифицированных пептидами, ингибирующими функцию фактора роста эндотелия сосудов

А.М. Малкова, А.Л. Петрова, И.А. Гурьянов,
Т.Б. Тенникова, В.В. Шаройко

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Введение. Одно из новейших направлений в клеточной терапии — создание фармацитов (биогибридов) — Т-клеток, модифицированных наночастицами

и таргетирующими лигандами. Подобный подход может способствовать увеличению специфичности и снижению токсичности терапии. Один из факторов снижения эффективности противоопухолевой терапии — избыточная продукция фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A) как самими опухолевыми клетками, так и клетками микроокружения опухоли.

Цель исследования — провести сравнительный анализ противоопухолевой активности фармацитов на основе Т-лимфоцитов, модифицированных анти-VEGF-A пептидами.

Материалы и методы. В исследовании использованы immortalized клеточная линия Т-лимфоцитов (Jurkat), клеточная линия аденокарциномы базального эпителиального альвеолярного эпителия человека (A549), эмбриональной почки человека (HEK 293), пептиды, ингибирующие функцию VEGF-A: Aib2 (VUPNc [CDIHVnLWEWEC] FERL-NH₂), kv114 (KUKKc [CDIHVnLWEWEC] FERL-NH₂), v114 (VEPNc [CDIHVnLWEWEC] FERL-NH). С помощью реакции азид-алкинового циклоприсоединения, промотируемого напряжением цикла (SPAAC) получены фармациты-ингибиторы на основе Т-лимфоцитов Jurkat, поверхность которых функционализирована пептидами Aib2, kv114, v114. Оценка антипролиферативного действия фармацитов Jurkat-анти-VEGF-A-пептид на клетки A549 выполнена с использованием МТТ-реагента. В качестве контрольной клеточной линии использовалась клеточная линия HEK 293.

Результаты. С использованием МТТ-теста показано, что только при воздействии фармацита Jurkat-anti-VEGF-v144 наблюдалось выживаемости клеток линии A549 на 10–30 %, при этом антипролиферативный эффект на клетках линии HEK 293 (контроль) не обнаружен.

Заключение. Исследование выявило умеренную противоопухолевую активность для фармацитов на основе Т-лимфоцитов, модифицированных пептидом v114, блокирующим VEGF-A. Все полученные фармациты не вызвали антипролиферативного эффекта при действии на клетки линии HEK 293. Полученные результаты можно объяснить особенностью строения пептида v114, определяющей специфичность воздействия и эффективность ингибирования VEGF-A. Умеренное снижение выживаемости, видимо, объясняется активацией компенсаторных механизмов, в частности гиперпродукцией IL-1β.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Правительства Российской Федерации
(грант «Биогибридные технологии для современной
медицины» № 14. W03.31.0025).*

Исследование действия кураксина CBL0137 на комплексы PARP-1 с нуклеосомой

Н.В. Малюченко¹, Д.О. Кошкина¹, А.А. Лыс¹,
В.М. Студитский², А.В. Феофанов^{1,3}

¹ГБОУ 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

Введение. Противоопухолевый препарат CBL0137 относится к группе кураксинов — низкомолекулярных соединений, карбазольное ядро которых интрекалирует между парами оснований ДНК, а боковые заместители взаимодействуют с большой и малой бороздками ДНК. Кураксины отличаются от большинства используемых в настоящее время ДНК-тропных ХТ-препаратов тем, что они не вызывают химических повреждений ДНК, но при этом связываются с ней и способны предотвращать взаимодействие с ДНК многих ферментов (топоизомераз, ДНК-метилтрансфераз) и гистонов. Кроме того, в 2019 г. показано, что CBL0137 глобально изменяет топологию генома. Механизмы влияния CBL0137 на связывание хроматин-модулирующих белков с нуклеосомой до сих пор остаются предметом активного изучения. Особенный интерес вызывает фермент поли-АДФ-рибозо-полимераза 1 (PARP-1): он одним из первых белков привлекается к месту повреждений ДНК и за счет своей каталитической активности «разрыхляет» плотноупакованную ДНК в хроматине, тем самым, обеспечивая эффективное функционирование ферментов репарации. Повышенное содержание PARP-1 в опухолевых клетках поддерживает стабильность генома и защищает их от гибели, а ингибиторы PARP-1 служат перспективными противоопухолевыми агентами.

Цель исследования — изучение действия кураксина CBL0137 на комплексы PARP-1 с нуклеосомой.

Материалы и методы. В работе представлены данные исследований CBL0137 с использованием флуоресцентно-меченых нуклеосом, при связывании с которыми, происходит заякоривание (траппинг) PARP-1. С помощью spFRET микроскопии и анализа электрофоретической подвижности комплексов в геле изучены структурные изменения, происходящие в нуклеосоме при одновременном воздействии PARP-1 и CBL0137 на нуклеосомном уровне.

Заключение. Обнаружено, что эффективность связывания PARP-1 с нуклеосомой зависит от присутствия и концентрации CBL0137 в реакции.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ
(грант № 21-74-20018).*

Новая система доставки белков с протеолитической активностью в цитоплазму опухолевых клеток

В.А. Мисюрин¹, И.В. Ярош^{2,3}, А.А. Рудакова¹, Н.А. Лыжко¹,
А.Р. Газизова⁴, М.В. Дмитриева¹, А.А. Бармашов¹,
Н.В. Голубцова¹, М.А. Барышникова¹, И.И. Краснюк³

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

²АО «Р-Фарм», Москва;

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава
России (Сеченовский Университет), Москва;

⁴ООО «ТеноТехнология», Москва

Введение. В настоящее время CAR-T-клетки завоевывают рынок противоопухолевых вакцин. При несомненной эффективности CAR-T-клетки обладают рядом неустраняемых недостатков. В числе этих недостатков — высокая стоимость, длительный срок производства и очень короткий срок хранения, необходимость транспортировки в жидком азоте и высокий риск побочных эффектов во время применения. Необходимо отметить, что для выполнения своих функций CAR-T-клетки используют протеазу гранзим В (Гр В) — мощный белок-инициатор каспазного каскада и запуска апоптоза в клетках, в том числе опухолевых. Благодаря этому Гр В может использоваться как самостоятельное противоопухолевое средство.

Цель исследования — разработать контейнеры для доставки Гр В и других протеолитических белков в опухолевую клетку.

Материалы и методы. Использовали мышинный Гр В и трипсин, который обладает значительно меньшей стоимостью по сравнению с Гр В. Данные белки загружались в липосомы по протоколу, предложенному А. Бенгхемом. Липосомы, содержащие трипсин, добавлялись в культуральную среду с клетками меланомы mel Kog и A875, клеткам РМЖ SK-BR-3. Цитотоксический тест проводился МТТ-методом. Для статистического анализа применяли критерий Уилкоксона.

Результаты. Эффективность включения Гр В и трипсина в липосомы составила более 90 %. Размер полученных липосом составлял от 270 до 320 нм. Клетки линий mel Kog, A875 и SK-BR-3 погибали в присутствии липосом с трипсином ($p < 0,01$ для всех линий). Цитотоксичность 0,05 мг/мл липосомального трипсина на линии mel Kog составила 22 %, на линии A875—10 %, на линии SK-BR-3—9 %. Наблюдалось дозозависимое снижение цитотоксичности липосомального трипсина. IC50 определить не удалось, так как не наблюдалось гибели 50 % клеток. Ввиду малого количества Гр В мыши цитотоксичность его липосомальной формы исследована только на линии mel Kog и показала цитотоксическую реакцию на уровне 10 % при концентрации 25 пг/мл. При снижении концентрации липосомального Гр В также снижалась цитотоксичность ($p = 0,0325$).

Заключение. Эксперименты показали принципиальную возможность включения протеолитических белков в состав липосомы. Полученные липосомы обладали цитотоксической активностью против опухолевых линий. В будущем мы планируем использовать большую концентрацию мышинного Гр В для нахождения IC50 его липосомальной формы.

Уровень глюкозы модулирует ингибирующие эффекты метформина в клетках эпидермоидной карциномы A431

А.Л. Михайлова¹, А.А. Башарина¹, Д.В. Сорокин¹,
К.И. Чандрян¹, Г.И. Буравченко², Т.А. Богуш¹,
А.М. Щербаков¹

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

²ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе», Москва

Введение. Репозиционирование лекарств — одно из важных направлений в фармакологии и онкологии. Метформин, бигуанид, используемый в терапии сахарного диабета 2-го типа, обладает значительным противоопухолевым действием, механизмы которого исследованы недостаточно.

Цель исследования — исследование антипролиферативных эффектов метформина и его активности как ингибитора PD-L1 в клетках эпидермоидной карциномы A431.

Материалы и методы. Клетки A431 инкубировали с метформином в среде с высоким (4,5 г/л) и низким (1,0 г/л) уровнем глюкозы. Экспрессию PD-L1 оценивали методом иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии. Использовали первичные анти-PD-L1 (ARG65862) и вторичные (DyLight650, ab98729) антитела. Оценивали 2 показателя экспрессии PD-L1: уровень (%) — число специфических флуоресцирующих клеток относительно контроля (инкубация только с вторичными антителами); интенсивность (усл. ед.) — отношение средней интенсивности флуоресценции в окрашенном образце к контролю. Экспрессию сигнальных белков оценивали методом иммуноблоттинга.

Результаты. Метформин оказывал значительное антипролиферативное воздействие на рост клеток A431. В клетках A431 выявлен высокий уровень экспрессии активированной AMPK, основной мишени метформина, который не вызывал дополнительную активацию этой киназы. Инкубация с метформином приводила к снижению экспрессии регулятора клеточного цикла циклина D1 и экспрессии транспортера глюкозы GLUT1. В среде с высоким уровнем глюкозы метформин после 24-часовой инкубации не влиял на экспрессию PD-L1. Снижение уровня глюкозы

приводило к усилению действия метформина: обнаружено значительное ингибирование экспрессии PD-L1 и более выраженное ингибирование экспрессии GLUT1.

Закключение. Ингибируя экспрессию циклина D1 и GLUT1, метформин оказывает значительное антипролиферативное действие на клетки эпидермоидного рака A431. Снижение уровня глюкозы способствует усилению эффектов метформина как ингибитора PD-L1. Дальнейшие исследования будут направлены на раскрытие потенциала метформина как низкотоксичного адъюванта иммунотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (проект #АААА-А20-120020690077-0, проточная цитометрия) и РНФ (грант № 20-13-00402, эксперименты с клетками A431).

Исследование роли нерецепторной тирозинкиназы SYK в прогрессии злокачественных заболеваний

А.М. Михеева¹, Т.Д. Лебедев², Э.Р. Ваганова^{1,2},
В.С. Прасолов^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»,
Долгопрудный;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Введение. Нерецепторная тирозинкиназа SYK преимущественно экспрессируется в кроветворных клетках и участвует в передаче сигнала от иммунорецепторов для поддержания клеточных функций, таких как миграция и инвазия клеток. Различные типы рака характеризуются повышенным или пониженным уровнем экспрессии киназы SYK по сравнению со здоровыми клетками. Ингибитор SYK R406, который используется для лечения иммунной тромбоцитопении, блокирует рост лейкозных клеток, что указывает на возможность использования киназы SYK в качестве перспективной мишени.

Цель исследования — изучить малоизвестную роль SYK в выживании злокачественных клеток нелейкозной природы.

Материалы и методы. В анализ включены различные типы злокачественных клеток: линии KPP, РМЖ, НМРЛ, рака кожи, нейробластомы, глиобластомы, РШМ, рака почки, РЯ, рака печени и рабдомиосаркомы человека. Экспрессия SYK и ее изоформ SYK-S и SYK-L определены методом ПЦР в реальном времени. Выживаемость клеток под действием различных концентраций ингибиторов тирозинкиназы SYK R406 подсчитана в камере Нойбауэра. Так как у ингибитора R406 есть 2-я мишень — FLT3, то выживаемость клеток также определялась под действием ингибитора FLT3

Quizartinib. Клетки обрабатывались антителами к SYK методом флуоресцентной иммуоцитохимии для определения количества и локализации SYK.

Результаты. Среди изученных линий наиболее высокая экспрессия SYK наблюдалась у линий KPP (SW480, SW620, HT29) и рака кожи (A431). У линии SW620 экспрессия изоформы SYK-S в 6,4 раза превышает уровень экспрессии SYK-L, у линии A431 — в 2,5 раза, у линий SW480 и HT29 значения близки уровню экспрессии SYK-L. Линии KPP (HCT116, SW620) и НМРЛ (A549) чувствительны к ингибитору R406. Показано, что киназы SYK равномерно распределены внутри клетки, и их наибольшее количество зафиксировано в клетках KPP (SW480, SW620), а наименьшее — в клетках НМРЛ (H1299).

Закключение. Наиболее чувствительны к ингибитору SYK R406 клетки KPP. В клетках нелейкозной природы не выявлено корреляции между действием ингибитора R406 и экспрессией киназ SYK и FLT3. Среди изученных линий уровень экспрессии изоформы SYK-S выше, чем изоформы SYK-L. Иммуоцитохимический анализ показал, что количество киназ SYK в клетке соответствует уровню их относительной экспрессии.

Исследование прооксидантных свойств полимерных частиц, содержащих комплексы тетрафенилпорфиринов марганца и железа

М.Р. Моллаева, Н.Г. Яббаров, М.Б. Сокол,
М.В. Фомичева, Е.Д. Никольская

ФГБУН «Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва

Введение. Создание систем, повышающих уровень АФК, для лечения опухолевых заболеваний — одно из перспективных направлений в медицине.

Цель исследования: изучить прооксидантные свойства полимерных наночастиц, содержащих комплексы тетрафенилпорфиринов марганца и железа; разработать и предложить каталитические системы в качестве новых перспективных лекарственных форм для проведения терапии онкологических заболеваний.

Материалы и методы. В данной работе в качестве катализатора образования АФК выбраны тетрафенилпорфирин марганца (MnClTPP) и железа (FeClTPP), а аскорбиновая кислота (АК) — в качестве его субстрата. С целью понижения гидрофобности металлопорфиринов, увеличения специфичности действия и периода полувыведения решили включить MnClTPP и FeClTPP в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (ПЛГА), которая позволит обеспечить пассивное накопление в опухолевых тканях после их системного

введения благодаря эффекту повышенной проницаемости и удерживания. Полимерные наночастицы получены методом одинарного эмульгирования и проанализированы. Цитотоксическая активность полученных форм исследована *in vitro* в отношении линий клеток MCF7 (аденокарцинома молочной железы человека), HeLa (карцинома шейки матки человека) и K562 (хроническая миелогенная лейкемия человека) с помощью МТТ-теста. Исследование уровня АФК, индукции супероксид-аниона, апоптоза (некроза) и потенциала мембраны митохондрий проводили с использованием флуоресцентных зондов на проточном цитометре.

Результаты. Полученные наночастицы FeСiТФП-НЧ и MnСiТФП-НЧ обладали физико-химическими параметрами, удовлетворяющие таким условиям как средний диаметр частиц менее 500 нм, дзета потенциал в диапазоне от -15 до -5 мВ, высокое общее содержание и степень включения металлопорфиринов в частицах. FeСiТФП-НЧ и MnСiТФП-НЧ проявляли цитотоксическую активность в отношении всех исследуемых линий клеток, однако наиболее эффективными оказались частицы с MnСiТФП. Комбинация АК и MnСiТФП-НЧ эффективно образует АФК, которые индуцируют повреждение ДНК и стимулируют поздний апоптоз в клетках MCF7. Присутствие системы MnСiТФП-НЧ/АК способствовало снижению потенциала митохондриальной мембраны по сравнению с MnСiТФП/АК.

Закключение. Каталитическая система на основе MnСiТФП и FeСiТФП обладает противоопухолевой активностью. Включение MnСiТФП в ПЛГА способствует накоплению НЧ в клетках, вероятно в митохондриях. Добавление АК стимулирует избыточное образование АФК, в особенности, супероксид-аниона, которые приводят к повреждению ДНК и последующей гибели клеток. Разработанные каталитические системы можно рассматривать в качестве новых перспективных лекарственных форм для проведения терапии онкологических заболеваний.

Молекулярно-биохимические аспекты и менеджмент рецидивирующих и резистентных случаев хронического миелоидного лейкоза

В.Г. Мустаца, В.В. Томачинский

Государственный медицинский и фармацевтический университет им. Николае Тестемичану, Кишинев, Республика Молдова

Цель исследования — определение диагностической и прогностической значимости лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и мутации Т315I гена *ABL*, а также оценка эффективности менеджмента резистентных и рецидивирующих случаев ХМЛ.

Материалы и методы. Представленное аналитическое и когортное исследование включало 27 пациентов с различными фазами ХМЛ, которые находились на диспансеризации и лечении в Институте онкологии Молдовы в период 1995—2021 гг. Образцы венозной крови собраны для анализа на лактатдегидрогеназу (ЛДГ), молекулярного скрининга и обнаружения мутации Т315I гена *ABL*, чтобы определить биологическое значение этой мутации и повышенных показателей ЛДГ. Пациентам с ХМЛ проводилась ХТ антиметаболитами, алкилирующими противоопухолевыми препаратами и ингибиторами тирозинкиназы.

Результаты. Возраст пациентов от 20 до 68 лет (средний возраст $51,3 \pm 2,14$ года). Диагноз ХМЛ установлен в ранней хронической фазе в 1 (3,7 %), в поздней хронической фазе — в 25 (92,6 %), в фазе акселерации — в 1 (3,7 %) случае. Во всех случаях количественная ПЦР в режиме реального времени выявила транскрипт p210 химерного гена *BCR-ABL* с диапазоном 23,17—100 % и средним значением $74,73 \pm 3,21$ %. На момент постановки диагноза ЛДГ варьировала в пределах 169—1609,4 Ед/л, повышенную зафиксировали у 14 (63,6 %) пациентов, особенно у больных лейкоцитозом (≥ 100000 /мкл). Полные цитогенетические и полные (оптимальные) молекулярные ответы получены при лечении различными поколениями ингибиторов тирозинкиназы в 16 (59,3 %) случаях, в том числе в 3 случаях с мутацией Т315I. Рецидивы возникли у 10 (71,4 %) пациентов с изначально повышенными значениями ЛДГ и у 5 из 6 пациентов с мутацией Т315I. Один (3,7 %) пациент с мутацией Т315I перешел в острую фазу и достиг полного гематологического ответа после лечения понатинибом. Выживаемость пациентов от начала заболевания до последнего контрольного обследования у гематолога составляла 21—234,8 мес (медиана выживаемости $93,97 \pm 4,52$ мес).

Закключение. Повышенный уровень ЛДГ может характеризовать активность ХМЛ при первичной диагностике и рецидиве. В представленном исследовании мутация Т315I гена *ABL* и повышенный уровень ЛДГ коррелировали с более высокой частотой рецидивов и устойчивостью к ингибиторам тирозинкиназы 1-го поколения. Независимо от линии ХТ и при рецидивах ХМЛ данные ингибиторы значительно повышают частоту полных (оптимальных) ответов, выживаемость и функциональное состояние пациентов по шкале ECOG (ВОЗ).

Фотодинамически активная фторуглеродная эмульсия с фторированным фотосенсибилизатором для преодоления гипоксии

М.Т. Нгуен¹, А.А. Маркова^{1,2}, Е.В. Беляева¹,
Н.Д. Чкаников¹, А.А. Штиль³

¹ФГБУН «Институт элементоорганических соединений
им. А.Н. Несмеянова РАН», Москва;

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

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

Введение. Эффективность метода ФДТ зависит от содержания кислорода в растворе и сильно ограничена в период гипоксии. Использование эмульсий перфторуглеродов в качестве газотранспортных агентов с растворенным в них фторированным фотосенсибилизатором создает оптимальные условия для генерации АФК после фотовозбуждения и позволяет инициировать гибель опухолевых клеток в условиях гипоксии.

Цель исследования — получение и оптимизация фторуглеродной фотосенсибилизирующей композиции, исследование ее фотодинамической активности *in vitro* на опухолевых клетках в условиях нормоксии и гипоксии.

Материалы и методы. В качестве фотосенсибилизатора использовали фторалкилированный хлорин, растворимый в перфторуглеродах. Методом ультразвукового диспергирования получали перфторуглеродные наноземульсии. Исследование цитотоксичности проводили на клеточной линии карциномы толстой кишки человека НСТ116 при помощи МТТ-теста. Анализ фотоиндуцированной гибели клеток методами флуоресцентной и конфокальной микроскопии.

Результаты. На клетках НСТ116 обнаружена темновая цитотоксичность эмульсии, обусловленная поверхностно-активным веществом — проксанолом-268. Дальнейшая оптимизация состава эмульсии уменьшила темновую цитотоксичность. Возбуждение эмульсии со фторхлорином и в нормоксии, и в гипоксии (1 % кислорода) приводит к дозозависимой гибели клеток. В зависимости от дозы светового облучения возможна инициация гибели по механизму как некроза, так и апоптоза. Наличие фотоиндуцированного некроза после интенсивного освещения определяли окрашиванием клеток пропидия йодидом, не некротическая гибель развивалась в течение 72 ч после фотовозбуждения. Эмульсия накапливается в митохондриях и лизосомах, но не в ядре, исследуемый механизм гибели — апоптоз.

Заключение. Таким образом, фторуглеродные эмульсии с газотранспортной функцией способны

устранить гипоксию в момент фотовозбуждения фотосенсибилизатора и вызывать фотоиндуцированную гибель опухолевых клеток как в нормоксии, так и в гипоксии. В зависимости от интенсивности фотовозбуждения возможна инициация быстрого некроза или развитие гибели опухолевых клеток в течение нескольких суток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 21-73-00249).

Влияние транскрипционного фактора ZEB1 на уровень аутофагии в клетках рака молочной железы

С.Р. Нецветай, О.А. Федорова, А.А. Дакс, С.Е. Парфеньев,
А.И. Гудович, Ю.Д. Васильева, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Известно, что в регуляции развития и прогрессирования рака важную роль играет процесс аутофагии. Аутофагия — естественный внутриклеточный процесс деградации дефектных или избыточных белков, а также поврежденных органелл. Однако роль аутофагии в онкогенезе неоднозначна. В связи с тем, что многие современные исследования нацелены на разработку химиопрепаратов, направленных на ингибирование аутофагии, изучение факторов, регулирующих этот процесс, актуально для современной молекулярной онкологии. ZEB1 — транскрипционный фактор, главным образом отвечающий за активацию эпителиально-мезенхимального перехода, а значит, за способность к инвазии и метастазированию. Изучено, что экспрессия ZEB1 усиливает экспрессию фактора ATG7, что ведет к активации аутофагии. Несмотря на этот факт, данных о ZEB1-зависимой регуляции аутофагии недостаточно.

Цель исследования — изучить влияние ZEB1 на уровень аутофагии в раковых клетках молочной железы.

Материалы и методы. Для данной работы мы использовали клетки линии РМЖ MCF7 с индуцибельной экспрессией ZEB1, создаваемой при добавлении доксициклина. Применяли методы проточной цитофлуориметрии и окраски специфическим красителем LysoTracker, вестерн-блот-анализа и оценки уровня основного маркера аутофагии LC3-II.

Результаты. Показали, что при индукции экспрессии ZEB1 наблюдается повышение уровня аутофагии в клетках MCF7. Выявлено, что в клеточной линии MDA-MB-231, обладающей мезенхимальным фенотипом, при подавлении экспрессии ZEB1 уровень аутофагии снижается. С помощью МТТ-анализа оценили чувствительность клеток MCF7 и MDA-MB-231 с разным статусом экспрессии ZEB1 к ДНК-повреждающему агенту доксорубину.

Заключение. Повышение экспрессии ZEB1 приводило к резистентности клеток к доксорубину.

Предполагаем, что один из механизмов ZEB1-зависимого повышения резистентности раковых клеток к генотоксическим агентам — активация аутофагии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 19-45-02011).

Наночастицы PLGA с производными хлорина е6 для фотодинамической терапии

Е.Д. Никольская¹, М.Р. Моллаева¹, В.А. Бегановская^{1,2},
Д.В. Белых³, И.С. Худяева³, О.М. Старцева⁴, М.Б. Сокол¹,
М.В. Фомичева¹, Н.Г. Яббаров¹

¹ФГБУН «Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

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

³ФГБУН «Институт химии», ФИЦ «Коми научный центр
УрО РАН», Сыктывкар;

⁴ФГБОУ ВО «Сыктывкарский государственный университет
им. Питирима Сорокина», Сыктывкар

Введение. Метод ФДТ основан на применении фотосенсибилизаторов — веществ, чувствительных к свету, таких как хлорин е6 (XL), а также лазерного излучения с длинной волны, соответствующей максимуму поглощения фотосенсибилизаторов. Однако фотосенсибилизаторы обладают рядом недостатков: темновой токсичностью, гидрофобностью, низкой селективностью действия.

Цель исследования — для увеличения эффективности действия фотосенсибилизатора XL и снижения побочных эффектов получить наночастицы (NP) на основе сополимера молочной и гликолевой кислот и исследовать их эффективность *in vitro*.

Материалы и методы. Оригинальное производное XL — пиррофеофорбид а 17-диэтиленгликолевый эфир, его NP получали методом одинарного эмульгирования. Анализ морфологии NP проводили методом просвечивающей электронной и сканирующей электронной микроскопии. Цитотоксическую активность изучали на клетках аденокарциномы шейки матки человека (HeLa) с помощью МТТ-теста. Уровень внутриклеточных АФК и супероксида-аниона, а также клеточную гибель определяли с помощью проточной цитометрии.

Результаты. Полученные NP-XL (средний диаметр 182 нм, PDI 0,129) соответствуют критериям пассивного транспорта частиц в опухолевые ткани. С помощью просвечивающей электронной и сканирующей электронной микроскопии установлено, что полимерные частицы имеют сферическую форму (размер подтвержден). Результаты экспериментов *in vitro* показали, что XL и NP-XL практически не обладают темновой цитотоксичностью в отношении клеток линии HeLa. При облучении клеток (660 нм) IC50 для XL составило 145,65 нМ, а для NP-XL — 53,77 нМ, из чего следует,

что цитотоксическая фотоиндуцированная активность почти в 3 раза выше у NP. После проведения ФДТ образовались АФК, в том числе супероксид-анион, но при использовании NP-XL число АФК оказалось выше. При этом окислительный стресс, вызванный фотодинамической системой, приводил к митохондриальной дисфункции, а через 24 ч после проведения ФДТ клетки находились на стадии позднего апоптоза или некроза.

Заключение. Эксперименты *in vitro* доказали уменьшение темновой токсичности NP-XL, увеличение фотоиндуцированной активности, селективное накопление в клеточных компартментах и продукцию различных форм АФК, способствующих гибели опухолевых клеток, что говорит о перспективности данной системы доставки для проведения ФДТ.

Влияние накопления преламина А на миграционную и пролиферативную активность опухолевых клеток за счет действия лопинавира и батимастата

Н.Л. Овсянникова¹, А. Иванова², С.В. Лаврушкина^{1,2},
И.И. Киреев^{1,2}

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

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

Введение. Ядерная ламина — двумерная сеть промежуточных филаментов, расположенная на внутренней ядерной мембране — определяет механические свойства ядра. Основные компоненты ядерной ламины — белки ламины А и В типов, причем тип А вносит наибольший вклад в жесткость ядра. В отличие от ламины В, ламин А теряет фарнезилированный С-конец в процессе протеолиза Zn-металл-протеазой ZMPSTE24 и не заякоривается на ядерной мембране. Мутации, приводящие к накоплению преламина А, фарнезилированной формы белка, ассоциированы с прогероидными синдромами и увеличением жесткости ткани. Однако для некоторых опухолей характерно снижение экспрессии ламины А, что способствует пролиферации и большей эффективности инвазии. Недавно показана активность лопинавира как ингибитора ZMPSTE24 — его действие приводит к накоплению преламина А, кроме того, более высокая ингибиторная активность предсказана для батимастата.

Цель исследования — исследование действия на миграционную и пролиферативную активность при накоплении преламина А за счет действия батимастата и лопинавира.

Материалы и методы. Культура фибросаркомы человека HT1080 выбрана как одна из популярных моделей для оценки подвижности клеток. В качестве модельной системы для оценки эффективности

миграции использовали камеры Бойдена. Лопинавир применяли в качестве контроля.

Результаты. Метод вестерн-блоттинга показал, что 2-дневная инкубация с ингибиторами увеличивает долю преламина А в клетках. Выявлено, что лопинавир приводит к остановке клеток на границе G2/M и увеличивает чувствительность к отсутствию сыворотки, что выражается остановкой в G1. При этом при добавлении лопинавира в диапазоне концентраций 10–90 мкМ жизнеспособность клеток оставалась сравнимой с контрольной группой. Однако добавление уже 50 мкМ батимастата значительно снижало клеточную жизнеспособность. Обнаружено, что 2-дневная инкубация с лопинавиром и батимастатом снижает эффективность миграции через малые поры (3 мкм), в то время как скорость миграции через большие поры сравнима с контрольной группой.

Закключение. Показано потенциальное действие лопинавира и батимастата как веществ, потенциально снижающих пролиферативную активность и подвижность мигрирующих опухолевых клеток за счет накопления преламина А.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-15-01290) и РФФИ (проект № 19-315-90069).

Селективные ингибиторы гистондеацетилазы изоформы 6

В.Н. Осипов¹, Д.А. Хоченков¹, А.А. Вартамян¹,
А.В. Громыко², А.В. Колотаев³, Д.С. Хачатрян³

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

Минздрава России, Москва;

²АО «Фарм-Синтез», Москва;

³НИЦ «Курчатовский институт», ИРЕА, Москва

Введение. Гистондеацетилаза 6 (HDAC6) — уникальный изофермент семейства HDAC с различными характерными признаками. HDAC6 преимущественно локализуется в цитоплазме и помимо модификации гистона имеет несколько специфических негистоновых субстратов, таких как α -тубулин, кортактин, Hsp90, тау-белок и пероксиредоксины. Накопленная информация показывает: нацеливание на HDAC6 может стать многообещающей терапевтической стратегией для лечения рака, неврологических расстройств и иммунных заболеваний, что делает разработку ингибиторов HDAC6 особенно привлекательной.

Цель исследования — синтез новых гидроксамовых кислот, производных 4-аминохиназолин-7-карбоновой кислоты и биологическая оценка их в качестве селективных ингибиторов HDAC6.

Материалы и методы. Для синтеза использовали классические методы органической химии и модифицированные методики для данных соединений. Цитотоксическую активность заявленных соединений

определяли с помощью МТТ-теста на линиях клеток HTC-116, A549, PC-3, MCF-7, SN-12. Оценку влияния производных гидроксамовых кислот на активность фермента HDAC I и II класса проводили люминесцентным методом с использованием коммерческого скринингового набора HDAC-Glo.

Результаты. Синтезировано 17 новых производных гидроксамовых кислот на основе 4-аминохиназолин-7-карбоновой кислоты. Ряд соединений обладает цитотоксической активностью в микромолярном диапазоне на различных линиях опухолевых клеток. Активность ряда соединений по отношению ферменту HDAC6 превышает или сравнима с активностью известного ингибитора гистондеацетилазы — вориностата (SANA), при этом отмечается высокая селективность всех соединений в ингибировании фермента HDAC6 по сравнению с HDAC1.

Закключение. Предполагаем, что данный класс соединений может рассматриваться в качестве перспективных селективных ингибиторов HDAC6.

Модель исследования эффективности CD3-дефицитных лимфоцитов с химерным антигенным рецептором (alloCAR-T) для терапии аденокарцином

А.В. Петухов

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Адоптивная клеточная терапия модифицированными Т-лимфоцитами (в частности CAR-T) насчитывает 5 препаратов, одобренных Управлением по контролю продуктами и лекарствами США (FDA). Дальнейшее развитие CAR-T-терапии требует исследований эффективности препаратов против солидных опухолей и изучения аллогенных продуктов, полученных от здоровых доноров.

Цель исследования — получение модели для изучения персистенции и противоопухолевой активности аллогенных CAR-T с подавленной экспрессией CD3.

Материалы и методы. Для получения CD3-дефицитных CAR-T-клеток провели 2 последовательные лентивирусные трансдукции. Перед инъекцией экспрессирующему человеческий ИЛ-2 иммунодефицитному мышинному штамму (Taconic, США) выполнялось истощение (деплеция) остаточных клеток TCR α / β ⁺ или CD3⁺. В качестве модельной линии аденокарциномы использовалась модифицированная лентивирусной трансдукцией линия HELA экспрессирующая мишень для CAR и фермент Renilla luc. Опухоли визуализировали на оборудовании IVIS Spectrum путем внутривенных инъекций (50 мкг на животное) субстрата ViviRen (Promega, США).

Результаты. Получены CD3- и HLA-дефицитные CAR-T-клетки. По данным проточной цитометрии, на 7-й день культивирования CAR присутствовал на 60 % клеток; на 12-й день — экспрессия TCR и MHC1 оказалась подавлена у 20 % CAR-T. Опухоли показали приживаемость в 100 % случаев и быстрый рост *in vivo*. Достигнута персистенция и цитокиновый ответ CAR-T-клеток *in vivo*, получено снижение персистенции CD3-дефицитных CAR-T.

Закключение. Модифицированная линия HELA служит идеальной моделью для CAR-T-исследований терапии аденокарцином и других солидных опухолей. Элиминация CD3 для аллогенного Т-клеточного продукта приводит к существенной потере препарата в виду его низкой пролиферирующей способности в отсутствие сильного антигенного стимула, что может рассматриваться с одной стороны как признак безопасности и с другой — как признак низкой персистенции. Мышиный штамм от Taconic демонстрирует высокую персистенцию CAR-T-клеток, что может быть использовано в исследованиях по безопасности CAR-T, так как на сегодняшний день большинство животных моделей дают косвенное представление об эффективности изучаемых CAR-T и крайне низкое — об их безопасности.

Иммунофенотип клеток селезенки мышей под воздействием опухолевой нагрузки и (или) агониста TLR-3 Poly (I:C)

А.В. Пономарев, А.А. Рудакова, З.А. Соколова,
М.А. Барышникова

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

Введение. Известно, что агонист TLR-3 Poly (I:C) вызывает торможение роста опухолей. Оценка иммунофенотипа клеток селезенки мышей во время этого процесса может дать новую информацию об иммунологических аспектах действия Poly (I:C).

Цель исследования — оценить влияние Poly (I:C) и меланомы B16-F10 на иммунофенотип клеток селезенки мышей C57Bl/6.

Материалы и методы. Исследование проводили на мышах C57Bl/6: 1-я группа — контроль (интактные животные); 2-я группа — мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10; 3-я группа — мыши без опухоли, получавшие Poly (I:C) 6-кратно с интервалом в 3 сут; 4-я группа — мыши с подкожно перевитой меланомой B16-F10, получавшие Poly (I:C) 6-кратно с интервалом в 3 сут, 1-е введение Poly (I:C) — на 1-е сутки после перевивки опухоли. На 19-й день после начала эксперимента исследовали иммунофенотип спленоцитов мышей с помощью проточной цитометрии.

Результаты. В группе мышей с меланомой, получавших Poly (I:C), медианы таких параметров, как иммунорегуляторный индекс CD4/CD8, субпопуляция CD69⁺ Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, числа В- и NK-клеток, находятся между значениями в контрольной группе и в группе мышей с B16-F10. Можно предположить, что опухоль меньших размеров оказывает более слабое влияние на иммунологические параметры. В тоже время в группе мышей с меланомой, получавших Poly (I:C), медианы чисел В- и NK-клеток, а также медиана числа CD69⁺ Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ оказались ближе к контролю, чем к значениям, полученным в группе B16-F10 и в группе здоровых мышей, получавшей Poly (I:C). Возможно, что иммуноактивирующее влияние Poly (I:C) ослабевает под воздействием опухоли, за счет чего, например, становится меньше CD69-положительных Т-клеток. Но так как опухолевая нагрузка слабее, то и показатели становятся ближе к нормальным.

Обнаружен необычный результат: в группе мышей с меланомой, получавших Poly (I:C), общее число CD3⁺ клеток и число наивных Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺ выше по сравнению со всеми остальными группами.

Закключение. Многократное введение Poly (I:C) во время роста опухоли оказывает влияние на иммунофенотип спленоцитов, но основные изменения иммунофенотипа спленоцитов мышей связаны с наличием опухоли и ее размерами. Выявлены параметры иммунофенотипа клеток селезенки мышей (CD4/CD8, число CD69⁺ Т-клеток CD4⁺ и CD8⁺, В- и NK-клеток), на которые влияет опухолевая нагрузка и (или) введение адьюванта Poly (I:C).

Распределение субпопуляций опухолеассоциированных макрофагов в зависимости от противоопухолевого лечения у больных колоректальным раком

М.А. Ракина¹, Е.О. Казакова¹, И.В. Ларионова^{1,2},
А.С. Тарасова², С.Г. Афанасев², Ю.Г. Кжышковска¹

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Томский государственный университет»;

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Введение. Одно из наиболее распространенных и летальных злокачественных новообразований в мире — КРР. Основные клетки врожденного иммунитета в опухолевом микроокружении — опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ), которые в большинстве случаев способствуют росту опухоли, ангиогенезу, метастазированию. Накопленные для КРР данные указывают на то, что макрофаги могут быть связаны с благоприятным исходом и снижением метастазирования (R. Braster и соавт., 2017). Также ОАМ могут взаимодействовать с противоопухолевым лечением, способствуя или препятствуя его эффекту.

Цель исследования — выяснить, как противоопухолевое лечение влияет на распределение ОАМ при КРР.

Материалы и методы. Проводилось ИГХ-исследование белковой экспрессии общего маркера макрофагов CD68 и маркеров M2-поляризации CD163, CD206 и стабилина-1: 68 пациентов — диагноз РПК, 92 пациента — диагноз «рак ободочной кишки». Из них 126 пациентов не получали неадьювантного лечения, 16 — получали НХТ, 13 — неoadьювантную ХЛТ. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено местным комитетом по медицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Результаты. Обнаружено, что в группе пациентов с КРР, получавших неoadьювантное лечение общее число CD68⁺ ОАМ и число CD163⁺ и CD206⁺ субпопуляций ОАМ статистически значимо ниже, чем у не-леченых пациентов. При сравнении групп с НХТ и с ХЛТ отмечено статистически значимое повышение экспрессии CD206 в группе с ХЛТ. В группе РПК общее число CD68⁺ ОАМ статистически значимо выше у пациентов без лечения, чем в группе леченых пациентов. Экспрессия CD206 при сравнении групп пациентов без лечения с пациентами, получавшими НХТ, статистически значимо выше у пациентов, не получавших предоперационного лечения. Статистически значимое понижение экспрессии CD206 отмечено в группах без лечения и с НХТ при сравнении с группой с ХЛТ.

Заключение. Показано, что противоопухолевое неoadьювантное лечение может влиять как на число, так и на распределение субпопуляций ОАМ при КРР.

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

CAR-T-терапия против трехмерных солидных моделей опухолей

А.Р. Рахматуллина¹, А.Х. Валиуллина¹, А.В. Петухов²,
М.А. Золотых¹, А.А. Ризванов¹, Р.Р. Мифтахова¹,
Э.Р. Булатов¹

¹ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»;

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

Введение. Клеточная терапия с использованием химерного антигенного рецептора Т (CAR-T) — новый вид терапии, демонстрирующий высокую эффективность в лечении злокачественных новообразований кроветворной и лимфоидной системы (В. Titov и соавт., 2020). CAR-T-терапия солидных опухолей пока не достигла значительного успеха, во многом из-за отсутствия экспериментальных данных о том, как CAR-T-клетки будут действовать в гетерогенной многоклеточной среде опухоли (А. Ando и соавт., 2019). Опухолевые сфероиды — самоорганизованные структуры, происходящие

из стволовых опухолевых клеток, демонстрируют гистологическое сходство с первичными опухолями и представляют удобную и эффективную модель для оценки действия CAR-T.

Цель исследования — оценить противоопухолевую эффективность CAR-T-клеток на сфероиде, образованных клеточными линиями РПЖ РСЗМ и РМЖ MCF7.

Материалы и методы. Мононуклеарная фракция клеток периферической крови выделена из образца крови здорового добровольца. Селекция и активация Т-лимфоцитов из мононуклеарной фракции проведена с помощью частиц Dynabeads Human T-activator CD3/CD28. Путем лентивирусной трансдукции Т-лимфоцитов вектором CD19-CAR-T-RIAD получены CAR-T-клетки. Опухолевые клетки и клетки, несущие CD19, культивировали в среде для сферообразования в течение 5 дней, затем к сфероидам добавляли 1×10^6 клеток анти-CD19 CAR-T. Через 3, 6 и 24 ч совместного культивирования клеток подсчитывали число сфероидов, определяли соотношение между опухолевыми и CAR-T-клетками, жизнеспособность опухолевых клеток методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Известно, что взаимодействие CAR-T-клеток с опухолевыми мишенями приводит к образованию иммунных синапсов, что приводит к контактно-зависимой цитотоксичности (Р. Wei, 2019). Через 24 ч совместного культивирования клеток наблюдалась значительная деградация сфероидов, образованных опухолевыми клетками, несущими CD19. Число некротических опухолевых клеток в модели РСЗМ-CD19 и MCF7-CD19 составило $28,32 \pm 3,3$ и $28,5 \pm 3,5$ % соответственно, в то же время этот показатель для РСЗМ и MCF7 составил $1,2 \pm 0,32$ и $4,28 \pm 2,4$ % соответственно при совместном культивировании с CAR-T. При этом пролиферация CAR-T-клеток при совместном культивировании с РСЗМ-CD19 и MCF7-CD19: $234,33 \pm 12,44$ и $310,00 \pm 62,8$ % соответственно.

Заключение. Пролиферация лимфоидных клеток одновременно с увеличением числа некротических опухолевых клеток через 24 ч совместного культивирования свидетельствует об активности анти-CD19 CAR-T-клеток против сфероидов, образованных опухолевыми клетками MCF7-CD19 и РСЗМ-CD19.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-74-20026) в рамках Программы стратегического академического лидерства ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Полиионные нанореакторы инкапсулированной метионин-γ-лиазы для ферментной пролекарственной терапии рака

С.В. Ревтович

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

Цель исследования — исследование на культуре клеток РМЖ SKBR3 цитотоксичности тиосульфидов, образуемых в ферментативной реакции метионин-γ-лиазы (C115H-PICsomes70МГЛ) инкапсулированной мутантной формы *Citrobacter freundii* с сульфоксидами S-алкил/алкенил-L-цистеина (аллином, метином, этином, пропином).

Материалы и методы. С использованием полимеров полилизина и пэгированной полиаспарагиновой кислоты с длинами цепей в 70 аминокислот получена C115H-PICsomes70МГЛ. Цитотоксичность нанореакторов и их отдельных компонентов оценивалась при помощи МТТ-теста после коинкубирования каждого образца с клетками линии SKBR3 в течение 24, 48 и 72 ч. Инкапсулированный фермент и сульфоксиды применялись в диапазоне прогрессивно уменьшающихся концентраций.

Результаты. Установлено, что тиосульфиды, образующиеся при последовательном добавлении к клеткам инкапсулированного фермента и пролекарств — сульфоксидов, оказывают цитотоксическое действие. Определены минимальные концентрации тиосульфидов, вызывающие гибель 50 % клеток.

Закключение. Выявлено, что отдельные компоненты нанореактора (полимеры оболочки наноканалов, наноканалы без включения фермента, инкапсулированный фермент, сульфоксиды) для клеток нетоксичны. Показана перспективность дальнейшего использования в терапии рака полиионных нанореакторов, состоящих из инкапсулированной метионин-γ-лиазы и сульфоксидов S-алкил/алкенил-L-цистеина. Модификация нанореакторов для направленной доставки к опухолевым клеткам позволит получать тиосульфиды *in situ*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-14-00258).

Цитотоксическая активность конъюгатов доксорубина с сесквитерпеновыми лактонами девясила и их полусинтетическими производными

А.В. Семаков, С.Г. Ключков, Л.В. Аникина

ФГБУН «Институт физиологически активных
веществ РАН», Черноголовка

Введение. Использование антрациклиновых антибиотиков в противоопухолевой терапии обычно ограничивается 2 факторами: во-первых, изначальной или приобретенной резистентностью опухоли к антрациклам, что часто связано работой MDR-транспортеров; во-вторых, риском развития кумулятивной дозозависимой антрациклиновой кардиомиопатии. Как известно, N-ацильные производные антрациклинов имеют резко сниженную цитотоксичность, а N-алкильные производные обычно сохраняют ее.

Цель исследования — синтез N-алкильных производных доксорубина (DOX) и изучение цитотоксической активности конъюгатов доксорубина с сесквитерпеновыми лактонами девясила и их полусинтетическими производными.

Материалы и методы. В качестве источников сесквитерпеновых лактонов использовали алантолактон и изоалантолактон, извлеченные в препаративных количествах из корней девясила высокого (*Inula helenium L.*), а также некоторые их полусинтетические производные. Синтез N-алкильных производных DOX вели через реакцию присоединения аза-Михаэля к аминогруппе DOX сесквитерпеновых лактонов. Конъюгаты протестированы на панели из 4 опухолевых и 1 псевдонормальной клеточных линиях на предмет цитотоксической активности.

Результаты. Наиболее чувствительной к полученным N-алкильным конъюгатам DOX оказалась клеточная линия HCT116 (рак толстой кишки), менее чувствительной — линия MCF7 (аденокарцинома молочной железы). Цитотоксичность конъюгатов на линии RD (рабдомиосаркома) мало зависит от типа сесквитерпенового лактона в заместителе. Более активным в среднем показал себя конъюгат DOX с сесквитерпеновым лактоном эпокси-аллоалантолактоном, чуть менее активным — конъюгат с лактоном алантодиеном.

Закключение. Предполагается, что подобная модификация поможет решить сразу несколько проблем, связанных с использованием антрациклинов: введение N-алкильного заместителя приведет к лишению возможности быть субстратом для P-gp и других MDR-транспортеров, а также иных off-target мишеней; большая липофильность конъюгата облегчит преодоление клеточной мембраны; действие лактонного цикла в алкильном заместителе снизит способность вызывать образование нежелательных АФК доксорубином.

Характеристика цитотоксических свойств 4-гексилрезорцина в 2D- и 3D-клеточной моделях карциномы легкого

Е.Ю. Скорова¹, В.А. Аникин², Ю.А. Николаев³,
Г.И. Эль-Регистан³, А.В. Тутельян⁴, Е.В. Петерсен¹

¹ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный;

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

³ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва;

⁴ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва

Введение. 4-Гексилрезорцин (4ГР) известен как бактерицидное и антисептическое средство, которое широко используется в косметологии для борьбы с нежелательной пигментацией. Однако в последнее время появились публикации, указывающие на его участие в процессах угнетения раковой прогрессии и влияние на ангиогенез.

Цель исследования — оценка воздействия 4ГР клетки A549 и характеристика его цитотоксических свойств в 2D- и 3D-клеточной моделях карциномы легкого.

Материалы и методы. Клетки A549 культивировались при стандартных условиях (2D). Сфероиды для 3D-исследований (200 кл./шт.) агрегировали в течение 6 дней и высаживали на пластик (3D). Анализ воздействия 4ГР проводили через 18 и 24 ч с помощью МТТ-тестов по стандартному протоколу. Динамический анализ клеточной пролиферации шел в режиме реального времени на приборе xCelligence DP, Agilent, RTCA (США). Цитотоксичность 4ГР для 2D- и 3D-клеточных систем на основе клеток A549 подтверждена с помощью МТТ-теста (LD50 25 и 33 мкг/мл соответственно).

Результаты. Динамический анализ уровней клеточной пролиферации с помощью RTCA показал незначительное увеличение скорости пролиферации клеток карциномы как в 2D-, так и 3D-клеточных системах на интервале 10–15 ч, после чего наблюдалось критическое падение числа жизнеспособных клеток: до 20,4 % на интервале 18–24 ч для 2D-модели (МТТ), на 30 % для 3D (RTCA). При концентрациях, превышающих LD50 (45 мкг/мл), 4ГР останавливал пролиферацию A549 в 2D-, и 3D-моделях менее чем за 4 ч, что делает его потенциальным кандидатом для антираковой терапии. Однако RTCA анализ показал наличие способных к делению клеток и после длительного (более 48 ч) инкубации с 4ГР (33 мкг/мл). Наличие живых клеток через 24 ч после инкубации с LD50 и более высокими концентрациями 4ГР подтверждено

нами с помощью микроскопии, при этом часть клеток увеличивалась в размерах и приобретала секреторный фенотип.

Заключение. Показано, что 4ГР эффективно и быстро проявляет цитостатические свойства как в 2D, так и в 3D-клеточных моделях карциномы легкого, при этом существует пул клеток (5–8 %), устойчивых к высоким концентрациям 4ГР. В целом это свидетельствует о высоком потенциале 4ГР в качестве компонента (в сочетании с цитостатиками или препаратами платины) комплексного средства, который может рассматриваться как перспективный неoadъювант.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 21-15-00411 и № 18-15-0039).

Перспективы диагностики PD-L1- и COX-2-рецепции при дисплазиях шейки матки

И.Ф. Солтанова, Н.И. Мехдиева

Онкологическая клиника Азербайджанского медицинского университета, Баку, Азербайджанская Республика

Введение. Своевременное выявление предраковых заболеваний — ДШМ — залог снижения смертности от РШМ. Однако отсутствие четкого терапевтического алгоритма ДШМ, в частности средней и тяжелой степени, требует поиска достоверных диагностических и прогностических маркеров, позволяющих выделить группу женщин повышенного риска прогрессирования.

Цель исследования — изучить закономерности экспрессии PD-L1- и COX-2-рецепторов при ДШМ I, II и III стадий.

Материалы и методы. Проведено ИГХ-исследование экспрессии PD-L1 и COX-2 в биоптатах шейки матки 35 больных с ДШМ I, II и III стадий. Использован стандартный режим обработки (VENTANA Bench Mark Ultra) с помощью кроличьих МА к COX-2 (SP21) и PD-L1 (VD21R) фирмы Medaysis. Уровень экспрессии PD-L1 оценивался по числу клеток — при окрашивании менее 1,0 % от общей популяции результат считался негативным, при окрашивании более 1,0 % — положительным. По уровню экспрессии COX-2 выделены 4 группы с цитоплазматическим окрашиванием: 0 (негативная реакция), 1+ (слабая степень экспрессии), 2+ (средняя) и 3+ (выраженная). Статистическая обработка полученных результатов велась на базе программы SPSS-26, разница считалась достоверной при уровне $p < 0,05$.

Результаты. Среди 35 больных: ДШМ I диагностирована в 7 (20,0 ± 6,8 %), ДШМ II — в 13 (37,1 ± 8,2 %), ДШМ III — в 15 (42,9 ± 8,4 %) случаях. Возраст больных колебался в пределах от 30 до 68 лет, средний возраст составил 40,7 ± 1,5 года. Активно менструирующих — 30 (85,7 %), в пременопаузе — 2 (5,7 %),

в менопаузе — 3 (8,6 %) женщины. Из 7 случаев с ДШМ I: уровень экспрессии COX-21+ наблюдался у 5 (71,4 ± 17,1 %), COX-22+ отмечен у 2 (28,6 ± 17,1 %) женщин, экспрессия COX-2 уровня 3+ не зафиксирована. У 13 женщин с ДШМ II: COX-21+ встречалась у 2 (15,4 ± 10,0 %), COX-22+ отмечена у 9 (69,2 ± 12,8 %), COX-23+ проявилась у 2 (15,4 ± 10,0 %) женщин. Среди 15 (42,9 ± 8,4 %) больных с ДШМ III: экспрессии уровня 1+ не обнаружено, 2+ выявлена в 5 (33,3 ± 12,2 %) и 3+ отмечена в 10 (66,7 ± 12,2 %) случаях ($P < 0,001$, $P_n < 0,001$). Из 35 больных: позитивные по PD-L1 — 15 (42,9 ± 8,4 %), негативные — 20 (57,1 ± 8,4 %) женщин. В подгруппе с ДШМ I (7 больных) все случаи отрицательны по PD-L1. В подгруппе с ДШМ II (13 случаев) PD-L1-позитивность выявлена в 4 (30,8 ± 12,8 %) случаях, остальные 9 (69,2 ± 12,8 %) — PD-L1-негативны. У женщин с ДШМ III (15 случаев) преобладали PD-L1-позитивные варианты опухоли — 11 (73,3 ± 11,4 %), экспрессии PD-L1 не отмечалось — 4 (26,7 ± 11,4 %) случая ($P = 0,003$, $P_n = 0,003$).

Обсуждение. Таким образом, ДШМ I характеризуется слабой экспрессией (1+) COX-2 (71,4 %) и полной PD-L1-негативностью, а ДШМ III — выраженной (3+) экспрессией COX-2 (66,7 %) и PD-L1-позитивностью (73,3 %).

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о наличии достоверных корреляционных связей между степенью дисплазии и экспрессией COX-2 и PD-L1, что позволит индивидуализировать алгоритм ведения больных ДШМ с учетом данных маркеров.

Новые гетероциклические производные антрахинона: преодоление множественной лекарственной устойчивости

А.С. Тихомиров¹, Ю.Л. Володина², В.А. Литвинова¹,
Д.В. Андреева¹, В.Б. Цветков³, Л.Г. Деженкова¹,
И.Д. Трещалин¹, А.Е. Щекотихин¹, А.А. Штиль²

¹ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

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

³ФГБУ «ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА»
России, Москва

Введение. Гетероциклические производные антрахинонов перспективны для создания противоопухолевых лекарств. Пирролоантрахинон ЛХТА-2640 демонстрирует активность *in vivo*, но малоэффективен для резистентных опухолевых клеток с МЛУ. Данный вид устойчивости обусловлен транспортом лекарств посредством Р-гликопротеина (Pgp). Варьирование структуры производных антрахинона позволяет оптимизировать противоопухолевые свойства.

Цель исследования — выявить механизмы преодоления МЛУ и гибели опухолевых клеток под действием нового пиридиноантрахинона ЛХТА-3034.

Материалы и методы. Для получения ЛХТА-3034 разработана оригинальная схема синтеза. Анализ антипролиферативной активности (МТТ-тест) проводили на клетках лейкоза K562 и субклинах K562/4 и K562i-S9 с Pgp-опосредованной МЛУ. Оценка внутриклеточного накопления, апоптоза и клеточного цикла выполнена в проточной цитометрии. Реакцию релаксации суперскрученной ДНК топоизомеразой I проводили в бесклеточной системе. Комплексообразование с Pgp оценено методами молекулярного докинга. Противоопухолевую эффективность *in vivo* оценивали на модели перевивного лейкоза мышей P388.

Результаты. В отличие от ЛХТА-2640 накопление пиридиноантрахинона ЛХТА-3034 в клетках K562/4 и K562i-S9 практически не зависело от Pgp. Липофильность обоих соединений близка и сопоставима с таковой у доксорубина и даунорубина — препаратов, транспортируемых Pgp. Докинг показал, что пиридиноантрахинон ЛХТА-3034 преимущественно связывается с М-сайтом (сайт связывания модуляторов) Pgp, в то время как пирролоантрахинон ЛХТА-2640 — с R-сайтом (сайт связывания родамина-123), с которым взаимодействует большинство веществ, переносимых Pgp. Соединение ЛХТА-3034 вызывало апоптоз родительских клеток K562 и клеток K562/4 и K562i-S9, устойчивых к пирролоантрахинону ЛХТА-2640. Пиридиноантрахинон ЛХТА-3034, как и ЛХТА-2640, ингибировал топоизомеразу I и достоверно увеличивал продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом P388.

Заключение. Устойчивость опухолевых клеток к антрациклам, обусловленная Pgp, может быть преодолена не только за счет повышения липофильности веществ, но и модулированием их связывания с различными сайтами Pgp. В ряду гетероциклических производных антрахинона замена пиррола, связанного с антрахиноном, на пиридин приводит к усилению гибели клеток с МЛУ при сохранении других механизмов цитотоксичности, известных для антрахинонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых (МК222.2021.1.3).

Анализ цитотоксичности ряда новых аналогов полиаминов

Е.С. Трапезникова¹, В.П. Максимова², А.И. Ничуговский³,
К.И. Кирсанов^{2,4}, М.Г. Якубовская², Д.А. Чешков⁵,
Д.Ч. Трон⁶, М.А. Маслов³

¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России, Москва;

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

³ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический
университет», Москва;

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
Москва;

⁵ФГБУН «Институт элементоорганических соединений
им. А.Н. Несмеянова РАН», Москва;

⁶Университет Восточного Пьемонта «Амедео Авогадро»,
Новара, Италия

Введение. Полиамины — повсеместно распространенные внутриклеточные молекулы, которые играют важную роль в регуляции роста, дифференцировки, пролиферации и процесса гибели клеток. Полиамины способны взаимодействовать с высокомолекулярными макромолекулами и мембранными структурами, стабилизируя их, а также защищать клетку от продуктов перекисного окисления липидов и свободных радикалов. Ряд соединений из группы синтетических полиаминов в настоящее время проходит клинические испытания для терапии гепатоцеллюлярной карциномы, РМЖ, нейроblastомы и других злокачественных новообразований, и это одно из актуальных направлений онкофармакологии — создание и внедрение синтетических полиаминов в противоопухолевую терапию.

Цель исследования — изучение цитотоксического эффекта синтетических полиаминов *in vitro*.

Материалы и методы. Объекты исследования — 6 новых соединений из группы полиаминов: 4A-12, 5A-10, 5A-56, 5A-58, 5A-42, 5A-76. Оценка цитотоксичности соединений проводили с помощью МТТ-теста на 3 опухолевых клеточных культурах (MCF-7 — аденокарцинома молочной железы, A549 — карцинома легкого, HCT116 — карцинома толстой кишки) и иммortalизованных кератиноцитах человека (HaCaT). Клетки высевали в 96-луночные планшеты (5000 клеток на лунку), обрабатывали веществами в следующих концентрациях: 4A-12, 5A-10 и 5A-58 — от 25 до 1,5 мкМ, 5A-56 — от 20 до 1,2 мкМ, 5A-42 — от 100 до 0,78 мкМ, 5A-76 — от 138 до 1,08 мкМ, конечная концентрация реагента ДМСО в культуральной среде составляла не более 0,0025 %. Через 72 ч проводили МТТ-тест. Цитотоксичность соединений относительно интактных клеток оценивали с помощью индекса IC50. Статистический обсчет полученных данных вели методом нелинейной регрессии с помощью программы GraphPad Prism.

Результаты. Соединения 4A-12, 5A-10, 5A-56, 5A-58 проявили цитотоксичность в отношении клеточных

культур A-549, MCF7, HCT-116, HaCaT в диапазоне концентраций до 10 мкМ, а соединение 5A-42 — при концентрациях более 10 мкМ. У вещества 5A-76 цитотоксический эффект не проявился (IC50 более 100 мкМ). Все исследуемые полиамины не обладали специфичностью в отношении опухолевых клеток. Наиболее сильный токсический эффект на клетках HCT116 показан для вещества 5A-10 (IC503 ± 0,8 мкМ), на клетках MCF-7, A-549 и HaCaT — для вещества 5A-56 (IC501 ± 0,14; 3 ± 0,4; 1,2 ± 0,5 мкМ соответственно). Цитотоксичность агентов для клеток HCT116, A-549 и MCF-7 соотносится с данными IC50 для соединений других аналогов полиаминов DENSPM и SL-11144.

Заключение. Синтезированные полиамины обладают выраженными цитотоксическими свойствами. На основе проведенного анализа выбраны наиболее перспективные соединения для дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (проект № 19-33-90301).

Цитотоксические свойства и комбинационные эффекты производных N-гидроксibuтанамидов с цисплатином на клетках гепатоцеллюлярной карциномы

Б.А. Третьяков¹, В.А. Мумятова¹, Н.В. Филова¹,
С.А. Джоусе-Иванина², С.Я. Гадомирский¹, А.А. Терентьев¹

¹ФГБУН «Институт проблем химической физики РАН»,
Черноголовка;

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

Введение. Одна из проблем ХТ — низкая селективность препаратов по отношению к опухолевым клеткам. Уменьшение доз традиционных препаратов может быть достигнуто путем хемосенсибилизации с другими веществами. В данной работе использован ряд N-гидроксibuтанамидов, содержащих потенциальные ингибиторы гистондеацетилаз (HDACi).

Цель исследования — изучение цитотоксических свойств ряда N-гидроксibuтанамидов и их комбинаций с цисплатином.

Материалы и методы. С помощью МТТ-теста на клетках гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 исследовали цитотоксическое действие соединений. Определение концентрации IC50 проводили через 24 ч после нанесения соединений. Комбинацию производных N-гидроксibuтанамидов и цисплатина наносили на клетки совместно и с предварительной инкубацией в присутствии N-гидроксibuтанамидов в течение 8 ч с последующим введением цисплатина.

Результаты. При действии цисплатина наблюдается устойчивость клеток HepG2, что проявляется в сохранении 50–60 % жизнеспособности клеток. Исследуемые N-гидроксibuтанамиды оказались малотоксичными

для клеток HerG2. В комбинации с большинством N-гидроксibuтанамидов цисплатин вызывал полное подавление жизнеспособности клеток, что позволяет судить о преодолении резистентности клеток HerG2 к действию цисплатина. В большинстве случаев время предварительной инкубации с N-гидроксibuтанамидами не влияло на цитотоксичность их комбинации с цисплатином. Для 2 соединений наблюдалось заметное усиление цитотоксического действия после предварительной инкубации, что может быть обусловлено запуском механизмов дерепрессии генов клеточной гибели в присутствии N-гидроксibuтанамидов.

Заключение. Совместное использование цисплатина и N-гидроксibuтанамидов позволяет повысить чувствительность клеток HerG2 к цисплатину. Возможный механизм действия заключается в ингибировании гистондеацетилаз и других металлоферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 20-03-00950a).

Фотоиндуцированный противоопухолевый иммунный ответ при экспериментальной глиоме *in vivo*

В.Д. Турубанова¹, М.О. Савюк¹, Ю.В. Ефимова^{2,3},
Д.М. Бондаренко¹, Т.А. Мищенко¹, М.В. Ведунова¹,
Д.В. Крысько^{1,2,3}

¹ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского»
(Университет Лобачевского), Нижний Новгород;

²Лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT),
Гентский университет, Гент, Бельгия;

³Институт исследований рака, Гент, Бельгия

Введение. Одна из концепций иммунотерапии рака — активация иммуногенной клеточной смерти (ICD, immunogenic cell death). Это индукция регулируемой гибели опухолевых клеток, вследствие которой происходит испускание молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждениями, DAMPs. Они играют ключевую роль в созревании антигенпрезентирующих клеток и активации Т-клеточного ответа на специфический опухолевый антиген. Золотой стандарт для проверки ICD *in vivo* у мышей основан на превентивной вакцинации: раковые клетки обрабатывают индукторами иммуногенной гибели *in vitro*, а затем вводят подкожно в качестве вакцины иммунокомпетентным мышам. В таком случае отсутствие роста привитой опухоли интерпретируется как признак иммунного ответа, вызванного иммуногенно-умершими раковыми клетками. Проблема данной модели заключается в том, что в месте введения вакцины может начаться развитие опухоли, так как клеточная суспензия, используемая в качестве вакцины, содержит до 30 % живых опухолевых клеток. Указанную проблему обходят путем создания

дендритных вакцин, ассоциированных с ICD. Один из методов, вызывающих иммуногенную клеточную смерть в раковых клетках, — ФДТ. Этот метод предполагает введение фотосенсибилизирующего агента в клетки с последующей фотоактивацией светом определенной длины волны, что приводит к запуску свободнорадикальных процессов и образованию синглетного кислорода, который оказывает цитотоксический эффект.

Цель исследования — разработка эффективной дендритноклеточной вакцины на основе фотоактивированных клеток глиомы против опухолевого очага в головном мозге.

Материалы и методы. В работе использовалась клеточная линия глиомы мыши GL261, фотосенсибилизатор фотосенс (Ниопик, Россия), *in vivo* эксперименты проводились с использованием мышей линии C57BL/6, из них же изолировались дендритные клетки костного мозга.

Результаты. Показано, что введение суспензии фотоактивированных фотосенсом опухолевых клеток оказывает защитный противоопухолевый эффект. Также использование привентивно дендритноклеточной вакцины на основе фотоиндуцированных клеток глиомы значительно увеличивает выживаемость животных, приводит к замедленному развитию опухолевого очага и улучшает неврологическое состояние животных в эксперименте.

Заключение. При иммунизации мышей разными типами вакцин (умирающими опухолевыми клетками и дендритной вакциной) на основе фотоиндуцированных опухолевых клеток, активируются адаптивные иммунные реакции, подавляющие опухолевый рост.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-15-00279).

Протоонкоген MDM2 влияет на стабильность важнейшего ингибитора PI3K-сигнального пути, вызывая устойчивость раковых клеток к ингибиторам тирозинкиназ

О.А. Федорова, А.И. Гудович, А.А. Дакс, А.В. Петухов,
О.Ю. Шувалов, С.Е. Парфеньев, С.Р. Нецветай,
Е.К. Тананыкина, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. MDM2 — главная E3-убиквитинлигаза важнейшего онкосупрессора человека — белка p53, маркирующая данный белок для последующей деградации в протеасомах. Помимо p53, MDM2 взаимодействует по меньшей мере с 200 различными белками и служит точкой конвергенции различных сигнальных путей онкогенеза. Белок PTEN служит фосфатазой и ключевой молекулой сигнального пути PI3K/AKT. Повышение экспрессии PTEN приводит к подавлению

роста опухолей и повышению уровня апоптоза в опухолевых клетках.

Цель исследования — изучить протоонкоген *MDM2*, вызывающий устойчивость раковых клеток к ингибиторам тирозинкиназ, и его влияние на стабильность важнейшего ингибитора PI3K-сигнального пути.

Материалы и методы. В нашем исследовании показано, что *MDM2* взаимодействует с белком PTEN. Проведен стандартный эксперимент по определению периода полужизни белков с ингибитором трансляции циклогексимидом. Так, в клеточных линиях с гиперэкспрессией *MDM2* после добавления циклогексимида наблюдалось достоверно более быстрое снижение уровня белка PTEN. С помощью метода убиквитинирования *in vivo* показано, что *MDM2* способен модифицировать PTEN. Продemonстрировано, что сигнальный путь HER2 (EGFR) — АКТ активирован в клеточной линии с гиперэкспрессией *MDM2*. Анти-HER2-терапия в настоящее время одобрена для лечения HER2-позитивного РМЖ, желудка и пищевода. Для наших экспериментов выбраны одобренные Управлением по контролю продуктами и лекарствами США (FDA) ингибиторы тирозинкиназ (TKI). В работе создана клеточная линия с гиперэкспрессией *MDM2* дикого типа, *MDM2mut* с мутацией в 462 положении C462A. Мутация *MDM2* в 462 положении RING-домена приводит к тому, что *MDM2* может взаимодействовать с белками-мишенями, но не влияет на их деградацию.

Результаты. Показано, что при повышенной экспрессии *MDM2* дикого типа (но не его каталитического мутанта) наблюдается резистентность к TKI. Биоинформатический анализ выживаемости пациентов с HER2-позитивным РМЖ, выявил, что у пациентов с повышенной экспрессией *MDM2* продолжительность жизни достоверно ниже. Можно связать это с тем, что при повышенной экспрессии *MDM2* наблюдается снижение ответа на HER2-направленную таргетную терапию.

Закключение. Полученные данные показывают белок-белковое взаимодействие PTEN-MDM2 и влияние *MDM2* на стабильность PTEN. Продemonстрировано, что *MDM2* влияет на активацию HER2-AKT пути, и это предположительно происходит из-за подавления важнейшего ингибитора PI3K пути — PTEN. Показано, что активация PI3K каскада при повышенной экспрессии *MDM2* приводит к резистентности к ингибиторам HER2.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ(договор № 18-75-10076).

Применение теста на хемочувствительность *ex vivo* для персонализации лечения сарком мягких тканей

Т.И. Фетисов¹, А.М. Щербаков¹, Д.В. Сорокин¹,
В.Ю. Зиновьева¹, Н.И. Моисеева¹, Л.А. Лалетина¹,
Е.М. Кирилин², А.Е. Маникайло¹, А.Ю. Бохан¹, Д.А. Буров¹,
Н.А. Козлов¹, О.П. Близиных¹, А.С. Вилкова¹,
К.И. Кирсанов^{1,3}, М.Г. Якубовская¹

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

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

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
Москва

Введение. Ежегодно в России регистрируется 3,5 тыс. новых случаев СМТ, а его распространенность превышает 20 случаев на 100 тыс. населения. В качестве одного из основных методов лечения СМТ и метастазов активно используют комбинации ДНК-повреждающих химиопрепаратов. Эффективность каждого из препаратов варьирует от 30 до 50 %, что в первую очередь связано с молекулярными особенностями опухолевых клеток конкретных пациентов, и обуславливает резистентность опухоли к определенным схемам терапии и развитие МЛУ. Тест на хемочувствительность — это метод тестирования лекарственной чувствительности *in vitro*, который в последние годы широко используется для определения показателей лекарственной чувствительности солидных опухолей.

Цель исследования — анализ перспективности метода определения хемочувствительности опухолевых клеток пациента для прогнозирования ответа СМТ на проводимую ХТ.

Материалы и методы. Из 69 образцов СМТ получены переживающие культуры опухолевых клеток. Чувствительность клеток к доксорубину, ифосфамиду, доцетакселу, гемцитабину и их комбинациям определяли с помощью теста на цитотоксичность с использованием резазурина при культивировании клеток с препаратами в течение 7 дней. Для препаратов и их комбинаций рассчитан индекс чувствительности.

Результаты. При сравнении клинических данных течения заболевания и индекса чувствительности у группы пациентов, получавших в период лечения доксорубин и ифосфамид, выявлена статистически значимая разница в безрецидивной выживаемости между чувствительными и резистентными пациентами к доксорубину и ифосфамиду ($p = 0,0198$ и $p = 0,0158$ соответственно). Наблюдалась статистически значимая разница в числе пациентов без рецидивов среди резистентных и чувствительных к доксорубину ($p = 0,004$). Проанализирована связь между уровнем чувствительности опухолевых клеток к данным препаратам и сроком безрецидивной выживаемости у общей группы

пациентов: группа, чувствительная к комбинации доцетаксела и гемцитабина, имела преимущество в безрецидивной выживаемости по сравнению с резистентной группой ($p = 0,0088$).

Заключение. Исследование резистентности опухоли к химиопрепаратам *in vitro* позволяет выявить резистентность опухоли к определенным препаратам и провести выбор наиболее эффективной комбинации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09095).

Роль CDK8/19 в чувствительности клеток хронического миелоидного лейкоза к ингибиторам Vcr-Abl

А.И. Хамидуллина¹, М.А. Ястребова¹, А.В. Брутер^{1,2},
А.М. Хрусталева¹, Ю.В. Нужина¹, М.А. Замкова^{1,2},
И. Ронинсон³, А.А. Штиль², В.В. Татарский¹

¹ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

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

³Университет штата Южная Каролина, Коламбия, США

Введение. Патогенез ХМЛ обусловлен активностью химерной тирозинкиназы Vcr-Abl. Селективные ингибиторы Vcr-Abl (прототип — иматиниб) вызывают терапевтический эффект при лечении первичного процесса. Однако впоследствии часто развивается устойчивость, обусловленная, в частности адаптивными изменениями транскрипции генов и активацией механизмов выживания в опухолевых клетках. Перепрограммирование транскрипции опосредует циклинзависимая протеинкиназа CDK8 (или ее паралог CDK19) в комплексах с циклином С и компонентами Mediator. Ингибирование CDK8/19-опосредованного перепрограммирования транскрипции направлено на предотвращение защиты клеток ХМЛ от действия ингибиторов Vcr-Abl.

Цель исследования — изучить возможность повышения чувствительности клеток ХМЛ к ингибиторам Vcr-Abl при ингибировании CDK8/19.

Материалы и методы. Работа проведена на Vcr-Abl-положительных линиях ХМЛ K562 и KU812. Распределение фаз клеточного цикла и параметры гибели клеток исследованы в проточной цитофлуориметрии. Для изучения экспрессии генов проведены количественная ПЦР в реальном времени и РНК-секвенирование. Нокаут целевых генов проводился с помощью системы CRISPR/Cas9. Изменения белков (тотальных и фосфорилированных) исследовали в иммуноблоттинге. Для селективного ингибирования CDK8/19 использовали сенексин Б, для подавления Vcr-Abl — иматиниб.

Результаты. Установлено, что сенексин Б в монодействии не оказывает антипролиферативный эффект на клетки ХМЛ. В линии K562 сенексин Б предотвращает вызываемую иматинибом и другими

ингибиторами Vcr-Abl задержку в фазе G1 и увеличивает гибель клеток. Механизмы сенситизации включают снижение уровней ингибиторов клеточного цикла p27 и p18, увеличение расщепления поли (АДФрибозо) полимеразы и активацию каспаз 3 и 9, а также понижение фосфорилирования STAT3 Ser727 и увеличение с-Мус. Сравнение транскриптомов выявило отдельные гены и их кластеры (сигнальные пути), дифференциально регулируемые сенексином Б, иматинибом и комбинацией. В гиперчувствительной к иматинибу линии KU812 сенситизация сенексином Б не выявлена.

Заключение. Ингибирование CDK8/19 способствует преодолению блока клеточного цикла, вызываемого антагонистом Vcr-Abl в клетках ХМЛ, и усилению гибели опухолевых клеток. Отсутствие общерезорбтивной токсичности ингибиторов CDK8/19 при длительном применении в экспериментальных условиях позволяет рекомендовать данные блокаторы для сочетания с таргетной терапией Vcr-Abl-положительных опухолей.

Обращение устойчивости опухолевых клеток к цисплатину при действии куркумина и кверцетина и модуляция экспрессии генов ферментов, контролирующих редокс-статус

А.А. Хасан¹, Е.В. Калинина¹, В.В. Татарский², Д.Д. Жданов³,
А.С. Петрова¹, М.Д. Новичкова¹, А.А. Штиль⁴

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва;

²ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

³ФГБУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва;

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

Введение. Жизнеспособность опухолевых клеток в значительной степени зависит от клеточного редокс-статуса, определяемого балансом АФК и антиоксидантов. Важную роль в регуляции тиол-дисульфидных связей играет тиоредоксин-зависимая система, включающая тиоредоксин (Trx), тиоредоксинредуктазу (TrxR), пероксиредоксины (Prxs).

Цели исследования: оценить влияние куркумина и кверцетина, обладающих антиоксидантным действием, на устойчивость клеток аденокарциномы SKOV-3 к цисплатину; рассмотреть экспрессию генов ферментов системы Trx/TrxR/Prxs и ключевых антиоксидантных ферментов.

Материалы и методы. В работе использована клеточная линия аденокарциномы яичника SKOV-3 и сублиния SKOV-3/CDDP, устойчивая к цисплатину. Проведены оценка экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени (RT-qPCR), оценка статуса

клеточного цикла с использованием проточной цитометрии и определение цитотоксичности с помощью МТТ-теста.

Результаты. Выявлено, что формирование устойчивости к цисплатину у клеток SKOV3 сопровождается повышением экспрессии генов ферментов системы Trx/TrxR/Prxs (*TRX1*, *TRX2*, *TXRD1*, *TXRD2*, *PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX3*, *PRDX6*), ключевых антиоксидантных ферментов (SOD-1, SOD-2, GPX-1, HO-1, CAT) и транскрипционного фактора Nrf2. Однако действие как куркумина, так и кверцетина приводит к значительному снижению их экспрессии наряду с повышением чувствительности резистентных клеток к цисплатину. Куркумин более эффективно (в большей степени и при более низких концентрациях), чем кверцетин, снижает резистентность клеток SKOV3/CDDP, вызывая арест клеточного цикла в G2/M фазе.

Заключение. Действие куркумина и кверцетина приводит к эффекту «обращения» лекарственной устойчивости резистентных клеток SKOV3/CDDP к цисплатину, что сопровождается подавлением экспрессии генов ферментов системы Trx/TrxR/Prx и ключевых антиоксидантных ферментов, контролирующих клеточный редокс-статус.

Роль рецептора глиобластомы IL13α2 в прогрессии и резистентности опухолевых клеток к терапии темозоломидом

С.А. Цховребова¹, А.А. Лаевская¹, С.В. Цибульников¹,
И.С. Карлина¹, С.И. Якушов¹, Д.Р. Файзуллина¹,
А.А. Митрофанов², П.С. Тимашев¹, И.В. Уласов¹

¹НЦМУ «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение», Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва;
²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Глиобластома — наиболее распространенная и агрессивная форма опухоли головного мозга. Средняя выживаемость пациентов составляет примерно 14,5 мес, а 2-летняя выживаемость — всего 26,5 %. Считается, что высокий уровень резистентности клеток к ХТ негативно влияет на общую выживаемость пациентов с диагнозом ГБМ. Выявлено, что примерно 90 % клеток глиобластомы экспрессируют рецептор IL-13α2, что может быть связано с резистентностью клеток к терапии.

Цель исследования — изучить влияние экспрессии IL-13Rα2 на устойчивость глиобластомы к темозоломиду.

Материалы и методы. Использованы: перевиваемая клеточная линия U87, мПНК к мПНК катепсина человека типа В, темозоломид (Schering-Plough, США), пуромидин (Sigma, США). Методы: биоинформатический

анализ баз данных, ИГХ-исследование, культивирование клеток, лентивирусная трансфекция клеток, получение стабильно экспрессирующих клеток глиобластомы человека, гель-электрофорез в ПААГ, МТТ, иммунофлуоресцентный анализ.

Результаты. При анализе клинических данных, имеющихся в базах данных TCGA и CGGA, мы наблюдали значительную ассоциацию экспрессии мПНК IL-13Rα2 с прогрессированием глиобластомы и низкой выживаемостью пациентов (логарифмическое значение p , $p < 0,0001$). В образцах пациентов с рецидивирующей глиобластомой уровень IL-13Rα2 оказался выше, чем в образцах первичной опухоли. Корреляционный анализ Спирмена выявил прямую связь между мПНК IL-13Rα2 и экспрессией мПНК белков, связанных с аутофагией, таких как изоформа ATG4A ($r^2 = 0,36-0,48$; $p < 0,001$) и катепсин В ($r^2 = 0,17-0,43$; $p < 0,001$). Иммунофлуоресцентный анализ установил связь между экспрессией клетками IL-13Rα2 и индукцией аутофагии (детекция изоформы LC3). Последующий белковый анализ в клеточных лизатах обнаружил высокую экспрессию катепсина В в экспрессирующих IL-13Rα2 клетках. Выживаемость клеток U87, экспрессирующих IL-13Rα2, на 44,03 % выше на 5-й день терапии темозоломидом по сравнению с контролем (U87). Ингибирование мПНК катепсина человека типа В или белка Beclin1 в клетках глиобластомы, экспрессирующих IL-13Rα2, увеличивало чувствительность клеток к действию темозоломида.

Заключение. Показано, что IL-13Rα2 — один из белков опухолевой адаптации к стрессу, в том числе к терапии темозоломидом.

BRCA-подобные опухоли молочной железы: связь с эффектом химиотерапии и прогнозом заболевания

М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, К.А. Гаптулбарова,
И.А. Цыденова, Д.С. Долгашева, Е.Ю. Гарбуков,
Н.В. Литвяков

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН»

Цель исследования — изучение эффективности ХТ у BRCA-дефицитных больных РМЖ без герминальных мутаций.

Материалы и методы. В работу включены 130 больных РМЖ IА — IIIВ стадий. В ретроспективную группу вошли 90 пациенток. Все больные получали 2–8 курсов НХТ по схемам AC, CAH или монотерапию таксотером. В проспективную группу включено 40 женщин, которым в зависимости от статуса гена *BRCA1* назначалась персонализированная схема НХТ: либо по схеме СР (карбоплатин/паклитаксел), либо монотерапия таксотером. Для анализа aberrаций числа копий (CNA)

проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах. Уровень экспрессии гена *BRCA1* оценивали при помощи ОТ-ПЦР.

Результаты. В ретроспективной группе установлено, что частота делеций у пациенток с частичной регрессией статистически значимо выше (27 из 51) по сравнению с группой больных со стабилизацией (4 из 25) и прогрессированием (1 из 9 больных) ($p = 0,0001$). Анализ безметастатической выживаемости показал, что наличие делеции обуславливает более высокие показатели выживаемости (log rank-test, $p = 0,009$). Далее, если у пациенток наблюдалась либо делеция, либо гипоэкспрессия (экспрессия менее 1) *BRCA1*, то данных больных относили к группе с HRD (BRCAness), остальные составили группу с нормальной функциональной активностью гена *BRCA1* (non BRCAness). Пациентки с BRCAness в общей группе имели более высокие показатели 5-летней безметастатической выживаемости (75 %) (log rank-test, $p = 0,007$), по сравнению с пациентками non BRCAness (53 %). Далее проводилось проспективное исследование значения статуса *BRCA1* для персонализированного выбора схемы НХТ. Пациентки с BRCAness получали схему НХТ с включением препаратов платины, остальная группа получала таксотер в монорежиме. В группе женщин, пролеченных по схеме СР, у 78,6 % больных наблюдался объективный ответ на лечение (11 из 14 пациенток). Среди женщин 2-й группы (монотерапия таксотером) ответ опухоли регистрировался у 88,5 % (23 из 26 больных). Медиана наблюдения среди пациенток 1-й группы составила 49 мес (диапазон 41–72 мес). У всех пациенток наблюдалась полная безметастатическая выживаемость (100 %). У 3 больных, пролеченных таксотером, зафиксировано развитие метастатической болезни в сроки 11, 15 и 64 мес.

Заключение. Полученные данные указывают на высокую предиктивную и прогностическую значимость определения делеции и уровня экспрессии *BRCA1* в опухолевой ткани для персонализированного назначения препаратов платины и таксанов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-15-00243).

Ингибиторы тирозил-ДНК фосфодиэстеразы 1 как сенситизаторы топотекана

И.А. Чернышова¹, Н.С. Дырхеева¹, А.Л. Захаренко¹,
М.С. Дреничев², В.Е. Ословский², Г.А. Иванов²,
Н.Н. Курочкин², С.Н. Михайлов², О.И. Лаврик¹

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

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Введение. Топотекан — цитостатический препарат, зарекомендовавший себя при лечении РШМ, РЯ

и МРЛ. Его противоопухолевая активность основана на способности стабилизировать ковалентные комплексы топоизомеразы I (Top1) — ДНК, возникающие в ходе каталитической реакции фермента, и тем самым приводить к накоплению разрывов ДНК и гибели опухолевых клеток. Однако в клетке существуют механизмы удаления таких аддуктов, например, фермент тирозил-ДНК фосфодиэстераза 1 (Tdp1) гидролизует ковалентную связь Top1-ДНК, что приводит к снижению эффективности ингибиторов Top1. Поэтому дополнительное использование в ХТ-коктейлях ингибиторов Tdp1 — многообещающая стратегия для повышения чувствительности опухолевых клеток к топотекану.

Цель исследования — изучение серии липофильных производных нуклеозидов в качестве ингибиторов Tdp1 для дальнейшей разработки препаратов, способных сенситизировать опухолевые клетки к действию топотекана.

Материалы и методы. Скрининг соединений проводился флуоресцентным методом, основанным на способности Tdp1 удалять тушитель флуоресценции BNQ1 с 3'-конца олигонуклеотида. Жизнеспособность клеток HeLa оценивали с помощью колориметрического теста метаболической активности клеток. Уровень повреждения ДНК исследовали методом Alkaline Comet assay. Исследования *in vivo* вели на модели мышиной карциномы Krebs-2.

Результаты. Среди липофильных нуклеозидов выявлен ряд соединений, ингибирующих Tdp1 со значением IC50 от 0,18 до 6 мкМ. Показано, что исследуемые соединения не цитотоксичны в диапазоне концентраций до 100 мкМ, а 5 из них способны усиливать цитотоксическое действие топотекана на клетки HeLa. Выявлено, что обработка клеток HeLa комбинацией топотекана и соединения-лидера приводит к увеличению уровня повреждений ДНК (в отличие от использования только топотекана). При лечении мышей с асцитной карциномой Krebs-2 топотеканом в комбинации с соединением-лидером наблюдалось значительное снижение массы асцита и числа опухолевых клеток в нем по сравнению с контрольной группой мышей, не получавших терапию.

Заключение. Очевидно, что липофильные производные нуклеозидов — перспективный класс ингибиторов Tdp1. Среди них найдено нецитотоксичное соединение-лидер, которое способно сенситизировать опухолевые клетки к действию топотекана как *in vitro*, так и *in vivo*. Это делает его многообещающим кандидатом для проведения дальнейших клинических исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-29-09037).

Повышение противоопухолевой активности карбоплатина путем синтеза его новых структурных аналогов

М.В. Чиркина¹, Т.С. Подругина², И.А. Лихачев²,
М.Р. Моллаева¹, М.Б. Сокол¹, Н.Г. Яббаров¹,
Е.Д. Никольская¹

¹ФГБУН «Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

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

Введение. На протяжении десятков лет в ХТ для лечения злокачественных новообразований применяют препараты платины (II), такие как цисплатин или карбоплатин (Крт). К сожалению, высокая неспецифическая токсичность и развитие МЛУ в значительной степени ограничивают их применение.

Цель исследования — создание новых препаратов платины, которые структурно подобны утвержденным производным платины и способны увеличивать противоопухолевую активность по сравнению с исходными соединениями.

Материалы и методы. Проведен синтез новых структурных модификаций на основе 3-гидроксикарбоплатина, исследована зависимость цитотоксической активности *in vitro* комплексов от структуры лигандов с помощью метода МТТ.

Результаты. Варьирование структурных фрагментов в базовом соединении — Крт, обладающим известной противоопухолевой активностью, и проведение испытаний *in vitro* позволило выявить соединение-лидер (Крт5), а также обозначить некоторые закономерности в зависимости структура — свойство. Проведен анализ цитотоксической активности синтезированных соединений в отношении клеток немелкоклеточной карциномы легкого человека — линий А549 и Н69. Анализ проводили с помощью МТТ-теста, который показал, что соединение Крт7 обладало большей активностью (в 4–5 раз), чем у Крт. Соединения Крт6 и Крт3 проявили активность на одном уровне с Крт. Наибольшей активностью обладало соединение Крт5: в 12 раз эффективнее в отношении А549 и в 22,5 раза — в отношении Н69 по сравнению с Крт. Следовательно, увеличение длины алкильного заместителя способствует значительному повышению активности аналога.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о высокой цитотоксической активности новых синтезированных аналогов платины (II) по сравнению с коммерчески доступными препаратами сравнения — Крт, и дают основание для дальнейшего изучения их противоопухолевой эффективности в экспериментах *in vivo*.

Оценка внеклеточного матрикса как регуляторного маркера поведения клеток в модели 3D-сфероидов

Е.Ю. Шабалина, Е.Ю. Скорова, Е.С. Анчакова,
Е.В. Петерсен

ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»,
Долгопрудный

Введение. В зависимости от возраста клеток модели почки демонстрируют различное поведение, что показали Н.М. Kang и соавт. (2019), а М. J. Randles и соавт. (2021) представили данные, что ВКМ может влиять на клетки.

Цель исследования — оценить вклад ДЦЛ-матрикса различного возраста в микроокружение клеток и его влияние на их поведение в составе 3D-клеточной модели.

Материалы и методы. Многоклеточные сфероиды (МКС) из клеток Phoenix-ЕСО культивировались 2 сут при стандартных условиях (2 тыс. клеток на 1 МКС, диаметр $130,5 \pm 12,5$ мкм). В качестве подложки для высадки МКС взяты лабораторный пластик (П), коллаген (К), коллаген с добавленным ДЦЛ-ВКМ 3 типов: почки старой крысы (С), почки молодой крысы (М) и гликированные почки молодой крысы (Г) (100 мг/мл глюкозы в PBS, 37°C, 1 нед. инкубации). Методом микроскопии отслеживалась миграция клеток из МКС путем регулярного измерения площади МКС. Анализ фотографий и результатов проведен в ImageJ и Prism8.

Результаты. На точке 6 ч средние значения площадей П- и К-МКС достоверно не отличались, в отличие от 12 и 24 ч. Средняя площадь П-МКС на момент 24 ч в 4,91 раза превышала аналогичную у К-МКС. Разброс значений площадей П-МКС говорит о гетерогенности внутри линии клеток. Средние значения площадей экспансии С-МКС достоверно не отличаются от средних значений К-МКС. Величины средней площади экспансии для К- и М-МКС достоверно различимы ($p < 0,05$). Средняя площадь М-МКС на момент 24 ч на 24 % меньше, чем у К-МКС. Разброс значений площадей Г-МКС: дисперсия больше, чем в случае высадки МКС на другие типы коллагеновых подложек. По активности миграции Г-МКС можно разделить на 2 статистически различимые группы ($p < 0,05$).

Заключение. Показано, что ДЦЛ-ВКМ разного возраста приводит к увеличению гетерогенности клеток в 3D-моделях, а также к изменению их поведения уже на момент 12 и 24 ч. Таким образом, использование 3D-клеточных моделей с включением аутологичного ВКМ позволит создать более точные тест-системы для подбора персонализированных методов терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-15-00391) на оборудовании ЦКП «Прикладная Генетика», ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (соглашение № 075-15-2021-684).

Новые мультикиназные ингибиторы на основе производных имидазола: роль CDK2 в гибели опухолевых клеток

М.В. Шестовская¹, П.В. Русина^{2,3}, А.С. Петрова⁴,
Э.Р. Гандалипов¹, Я.Р. Абдюшева^{2,3}, В.В. Татарский⁵,
М.М. Ерохин⁵, А.А. Штиль^{2,6}

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург;

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

³ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН», Москва;

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва;

⁵ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

⁶ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Отдельные молекулярные механизмы регуляции пролиферации и выживания имеют неодинаковое значение в опухолях того или иного тканевого происхождения.

Цель исследования — выявление роли индивидуальных механизмов, существенных для биологических особенностей конкретных опухолей, что позволит обосновать персонифицированный подход к терапии.

Материалы и методы. Молекулярное моделирование, синтез химической библиотеки, профилирование энзиматического ингибирования, биоинформатический анализ, изучение гибели клеток.

Результаты. Молекулярный докинг с использованием модели циклинзависимой киназы 7 (CDK7) выявил новый хемотип на основе производных триазола. Синтезирована серия соединений. Исследования в бесклеточных системах установили, что циклин-зависимая киназа 2 (CDK2) в комплексах с циклином А или Е служит молекулярной мишенью для новых соединений. Лидерные производные ингибировали энзиматическую активность CDK2 в наномолярных концентрациях, для подавления CDK5, 7 и 9 требуются более высокие концентрации. Линии рака толстой кишки и РЯ, а также нейробластома с амплификацией онкогена N-Мус чувствительны к новым ингибиторам. Важно, что новый хемотип практически нетоксичен для неопухолевых клеток. Выявлены молекулярные особенности ответа клеток на лидерные соединения.

Заключение. Рациональный дизайн позволил выявить новый класс низкомолекулярных мультикиназных ингибиторов для преимущественного подавления CDK2. Новые соединения вызывают гибель клеток, для жизнеспособности которых данная протеинкиназа существенна, а также малоактивны в отношении нетрансформированных клеток. Дальнейшие исследования нового хемотипа направлены на создание доклинических кандидатов для терапии опухолей конкретного гистогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-74-10099).

Метилтрансфераза SMYD3 и жизнеспособность клеток нейробластомы: новая молекулярная мишень и низкомолекулярные ингибиторы

А.А. Штиль¹, Е.В. Манасова², А.В. Трубников², Ф.А. Зенов²,
В.А. Василичин², Е.А. Варламова^{1,3}, М.М. Ерохин³,
Д.Н. Казюлкин², А. дель Рио⁴, А. Алтиери², А.В. Куркин²

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

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

³ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

⁴Институт органического синтеза и фотореактивности, Болонья, Италия

Введение. Эпигенетическая регуляция экспрессии генов, в частности метилирование ДНК и белков хроматина, важна для баланса выживания и гибели нормальных и опухолевых клеток. Метилтрансферазы семейства SMYD (от названий доменов SET и MYND) переносят метильную группу на остатки лизина в положениях 3 и 9 гистонов H3 и H4.

Цели исследования — изучение SMYD3 в качестве новой терапевтической молекулярной мишени; синтез ковалентных ингибиторов SMYD3 на основе производных изоксазола.

Материалы и методы. Биоинформатический анализ баз данных, дизайн и синтез низкомолекулярных соединений, изучение гибели опухолевых клеток.

Результаты. Исследование жизнеспособности клеток различного тканевого происхождения при инактивации генов отдельных белков семейства установило значимость изоформы SMYD3 для нейробластомы — злокачественной опухоли у пациентов 2–3 года жизни, характеризующейся амплификацией онкогена N-Мус. Разработаны молекулярный дизайн и схемы химического синтеза ковалентных ингибиторов SMYD3 на основе производных изоксазола. Соединения-лидеры в микромолярных концентрациях вызвали гибель N-Мус-положительной линии IMR32. Близкие аналоги лидерных соединений неактивны, что позволяет определить требования к структуре ингибиторов SMYD3. По основным свойствам соединения нового химического класса сопоставимы с представленными в международной литературе патентованными блокаторами SMYD3. Синтезированы первые конъюгаты на основе лидерных ингибиторов для протеолитической деградации SMYD3 (proteolysis targeting chimeras).

Заключение. Мишень-направленная терапия при нейробластоме — актуальная проблема, так как на сегодняшний день результаты лечения больных неудовлетворительны. Для клеток с амплификацией N-Мус цитотоксичность ингибиторов SMYD3 показана впервые. Выявление новой молекулярной мишени углубляет представления

о механизмах жизнеспособности клеток нейробластомы, а новые производные изоксазола служат прототипами соединений, перспективных для терапии нейробластомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (договор № 20-53-7808 Итал_т) и РНФ (грант № 20-74-10099).

Влияние антиканцерогенных полифенолов на активность систем репарации ДНК

П.А. Штомпель¹, Т.И. Фетисов², К.И. Кирсанов^{2,3},
М.Г. Якубовская²

¹ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва;

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

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

ХТ зависит от множества внутриклеточных факторов, среди которых одну из ключевых ролей играет активация механизмов репарации ДНК. Полифенолы представляют обширную группу вторичных метаболитов растений, обладающих антиканцерогенной и противоопухолевой активностью. В основе молекулярного механизма действия этих ксенобиотиков лежит их способность интеркалировать в ДНК или взаимодействовать с макромолекулой нековалентно, что приводит к модулированию активности ферментов репарации в клетках. Таким образом, применение полифенолов рассматривается в качестве нового подхода к увеличению чувствительности опухолевых клеток к проводимой ХТ.

Цель исследования — изучить влияние антиканцерогенных полифенолов (генистеин, ресвератрол, кемпферол, эпигаллокатехин-3-галлат, кумарин, кверцетин) на активность систем репарации повреждений ДНК, индуцируемых ифосфамидом.

Материалы и методы. Влияние фитонутриентов на уровень повреждения ДНК, индуцированный ифосфамидом, выявляли с помощью метода ДНК-комет. Число гистонов γ -H2AX, т.е. контрольных точек репарации, определяли через иммуноцитологическое окрашивание клеток с применением антител к гистону γ -H2AX. Уровень цитотоксичности ифосфамида при добавлении полифенолов оценивали с помощью резазуринового теста.

Результаты. Выявлено, что сами полифенолы не вызывали повышение уровня повреждения ДНК, однако кемпферол, генистеин, кумарин и ресвератрол значительно снижали уровень повреждения ДНК, индуцированный ифосфамидом в тесте ДНК-комет. При исследовании числа фокусов гистона γ -H2AX генистеин вызывал увеличение числа фокусов по сравнению

с интактным контролем. Обработка клеток эпигаллокатехин-3-галлатом и кемпферолом после экспозиции с ифосфамидом приводила к достоверному снижению числа фокусов гистона γ -H2AX. При анализе влияния полифенолов на цитотоксический эффект ифосфамида показано, что генистеин вызывал увеличение цитотоксического эффекта ифосфамида как через 48, так и через 72 ч инкубации, в то время как обработка клеток эпигаллокатехин-3-галлатом и кемпферолом в комбинации с ифосфамидом приводила к ослаблению цитотоксического эффекта ифосфамида через 72 ч инкубации.

Заключение. Продemonстрировано, что кемпферол и генистеин активируют механизмы репарации, в то время как эпигаллокатехин-3-галлат ингибирует данный процесс.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-15-01526).

Противоопухолевые свойства экдистерона в клеточных моделях карциномы молочной железы и немелкоклеточного рака легкого

О.Ю. Шувалов, Ю.Н. Кирдеева, Е.К. Тананыкина,
О.А. Федорова, А.А. Дакс, А.В. Петухов, Н.А. Барлев
ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Экдистерон (20-Нидрохидроксидионе) известен как гормон членистоногих, контролирующий их рост и развитие. В организме человека он проявляет анаболические, гипогликемические, антиоксидантные, кардио- и нейропротекторные свойства, благодаря чему используется в медицине как общетонизирующее и адаптогенное средство при астенических и астенодепрессивных состояниях, интоксикации, неврастении, гипотензии и т.п. Экдистерон низкотоксичен для млекопитающих и не служит гормоном для человека. Благодаря своим анаболическим свойствам он широко применяется спортсменами для повышения силы и выносливости, благодаря чему находится в поле зрения Всемирного антидопингового агентства (ВАДА). Несколько групп исследователей, включая нашу, выявили противоопухолевые свойства экдистерона. В настоящее время не известны точные молекулярные механизмы, обуславливающие палитру его фармакологических эффектов, в частности противоопухолевые свойства.

Цель исследования — оценка биологических свойств экдистерона в клеточных моделях РМЖ и РЛ человека, а также в неопухолевых клетках.

Материалы и методы. Проведена оценка влияния экдистерона и экстрактов экдистерон-содержащих растений на пролиферацию, клеточный цикл, энергетический метаболизм и аутофагию. Исследовано их сочетанное влияние на восприимчивость к доксорубину клеточных

моделей РМЖ различных молекулярных подтипов и НМРЛ.

Результаты. В отличие от экстрактов экистерон-содержащих растений сам по себе экистерон не вызывает значительного снижения пролиферации. При этом он вызывает снижение энергетического метаболизма, индуцирует аутофагию и значительно сенсибилизирует опухолевые клетки к доксорубину, что показано в результате расчета комбинационных индексов (CI) по алгоритмам Chou—Talalay. Эффекты после воздействия чистого экистерона оказались гораздо ниже, чем после экстрактов растений, которые служат его промышленным источником.

Заключение. Экистерон проявляет противоопухолевые свойства в клеточных моделях РМЖ и РЛ. При этом его активность гораздо ниже, чем у экстрактов содержащих его растений, что теоретически может объясняться наличием в растительных экстрактах других веществ, обладающих схожими фармакологическими свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-75-10138).

Связь экспрессии белков CA9 и VEGF-A, индуцированных гипоксией, с развитием лекарственной устойчивости в клетках сарком мягких тканей

А.М. Щербаков¹, Т.И. Фетисов¹, Д.В. Сорокин¹,
В.Ю. Зиновьева¹, Н.И. Моисеева¹, Л.А. Лалетина¹,
Е.М. Кирилин², А.Е. Маникайло¹, А.Ю. Бохан¹, Д.А. Буров¹,
Н.А. Козлов¹, О.П. Близиюков¹, А.С. Вилкова¹,
М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,3}

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

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

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Введение. Наряду с хирургическим вмешательством и радиотерапией в лечении данного вида сарком (мягких тканей) активно применяют ХТ. Эффективность каждого из химиопрепаратов составляет 20–50 %, что в первую очередь обуславливается резистентностью клеток опухоли к лекарственным средствам. Один из основных факторов развития МЛУ — активация сигнальных путей в ответ на гипоксию.

Цель исследования — изучение взаимосвязи между резистентностью опухолевых клеток и уровнем экспрессии белков гипоксии CA9 и VEGF-A в гистокультурах сарком мягких тканей.

Материалы и методы. Из 46 образцов СМТ полученные переживающие культуры опухолевых клеток. Чувствительность клеток к доксорубину, ифосфамиду

и их комбинации определялась с помощью резазуринового теста на цитотоксичность. В этих же клетках, культивируемых в условиях нормоксии и гипоксии, определяли уровни белка CA9 методом вестерн-блоттинга, а также уровень VEGF-A в культуральной среде с помощью ИФА.

Результаты. Определен индекс чувствительности переживающих культур к доксорубину, ифосфамиду и их комбинации. Обнаружена корреляция между уровнем экспрессии белка карбоангидразы 9 (CA9) и резистентностью клеток к ифосфамиду и комбинации ифосфамида и доксорубина ($p = 0,0129$, $r = 0,36$ и $p = 0,039$, $r = 0,3$ соответственно). Во всех полученных культурах продемонстрировано, что гипоксия индуцирует экспрессию VEGF-A. Выявлено, что клетки с высоким уровнем экспрессии VEGF-A имеют более высокий индекс резистентности к ифосфамиду и комбинации ифосфамида и доксорубина по сравнению с клетками, обладающими низким уровнем экспрессии VEGF-A ($p = 0,0186$ и $p = 0,0717$ соответственно).

Заключение. Результаты свидетельствуют о значительной роли гипоксии в развитии резистентности СМТ к ХТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-29-09095).

Биораспределение ²¹¹At

О.А. Юминов^{1,2}, Д.А. Бондаренко³, В.А. Дроздов¹,
Д.О. Еременко^{1,2}, А.Н. Мурашев³, С.Ю. Платонов^{1,2},
О.В. Фотина¹

¹НИИЯФ имени Д.В. Скобельцына,
ГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

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

³ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»,
Филиал (ФИБХ РАН), Пушкино

Цель исследования — изучение биораспределения ²¹¹At при нормальных условиях и в условиях 3-дневной безйодовой диеты.

Материалы и методы. Исследования проводились на 2 группах животных (самцы крыс SD (Sprague Dawley). Первая группа получала нормальное питание, 2-я находилась на 3-дневной безйодовой диете. Тестируемый радиофармпрепарат вводили животным однократно, внутривенно (в хвостовую вену) в объеме 10 мл/кг, в дозе 100 мКи на 1 животное. В ходе исследования животные подвергались некропии в определенные временные точки (30 мин., 1, 3, 6, 12, 16 и 24 ч) с забором органов (кровь, мочевой пузырь, семенники, селезенка, сердце, легкие, головной мозг, глаза, кожа, мышца бедра с седалищным нервом левая, кость бедренная с коленным суставом, почки, надпочечники, щитовидная железа, тимус, поджелудочная железа, печень, желудок, отделы кишки — прямая, ободочная, слепая, подвздошная, тощая, двенадцатиперстная) для дальнейшего подсчета накопленной в них

активности с помощью колодезного сцинтилляционного γ -спектрометра. Для каждой временной точки использовалось 6 животных. Активность в органах определялась в процентах как доля от введенной активности, так и доля от введенной активности, деленной на массу органа.

Результаты. Выявлено, что из всех органов наиболее тропна к ^{211}At щитовидная железа. Максимальное накопление ^{211}At в щитовидной железе достигается спустя 16 ч после введения. При этом безйодовая

диета усиливает накопление радионуклида ^{211}At во всех органах, но наибольшее увеличение концентрации ^{211}At наблюдается в щитовидной железе.

Заключение. Определено, что ^{211}At тропен к щитовидной железе в обоих случаях, однако безйодовая диета повышает концентрацию радионуклида ^{211}At в щитовидной железе в несколько раз, что может свидетельствовать о важности соблюдения безйодовой диеты при лечении ^{211}At .