

Секция VI

НОВЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

Стресс-индуцированные молекулы МІСА в сыворотке крови онкологических больных

Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, И.А. Пасова, Г.С. Неприна
МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИРЦ
Минздрава России, Обнинск

Цель работы — сравнить субпопуляционный состав NK-клеток и рецептора NKG2D на NK-клетках, а также оценить уровень стресс-индуцированных молекул МІСА в сыворотке крови у больных со злокачественными новообразованиями кишечника и меланомой.

Материалы и методы. Оценен фенотип NK-клеток (CD16⁺CD56⁺CD3⁻) периферической крови и рецептор NKG2D (CD314) на всех лимфоцитах и на NK-клетках (CD314⁺CD16⁺) у 43 онкологических больных колоректальным раком и 26 больных меланомой. Контрольную группу составляли 20 здоровых доноров. Для определения sMICA в сыворотке крови использовали иммуноферментный анализ.

Результаты. Больные были разделены на 3 группы в зависимости от содержания sMICA: низкое — 0–1500 пг/мл (1-я группа), среднее — 1500–4000 пг/мл (2-я группа) и высокое — более 4000 пг/мл (3-я группа). В сыворотках крови здоровых доноров sMICA обнаруживались в минимальных количествах (менее 100 пг/мл). При меланоме среднее содержание sMICA составило 2436 пг/мл; в 1-ю группу были отнесены 34,6 % пациентов, во 2-ю — 42,3 % и в 3-ю — 23,1 %. При раке кишечника среднее содержание sMICA составило 790 пг/мл; в 1-ю группу вошли 90,7 % пациентов, в 3-ю — 9,3 %, группы со средним содержанием МІСА не выявлено. Показано, что у всех онкологических больных по сравнению с группой контроля повышено содержание рецептора NKG2D на NK-клетках, что говорит об их активации. Отмечается увеличение количества NK-клеток у больных раком кишечника

1-й группы, также у них повышено содержание рецептора NKG2D на всех лимфоцитах.

Выводы. Количество sMICA в сыворотке крови больных возрастает в несколько раз, что может служить одним из ранних диагностических маркеров наличия онкологического заболевания. С повышением sMICA в сыворотке крови больных меланомой в крови увеличивается количество NK-клеток. У больных раком кишечника наблюдается обратная тенденция: содержание рецептора NKG2D и количество NK-клеток уменьшаются с увеличением уровня sMICA, что, вероятно, свидетельствует о различном иммунопатогенезе данных заболеваний.

Изучение мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы с отягощенным семейным анамнезом в Узбекистане

А.Н. Абдихакимов, М.Т. Тухтабоева,
Б.Ш. Адылов, Ш.У. Турдикулова

Ташкентский областной онкологический диспансер,
Республика Узбекистан;
Центр медицинской генетики Института биохимии
АН Республики Узбекистан, Ташкент

В настоящее время рак молочной железы (РМЖ) во всем мире занимает лидирующее место. Население Узбекистана растет быстрыми темпами, и в связи с этим актуален вопрос ранней диагностики и профилактики РМЖ.

Наследственные факторы играют важную роль в развитии РМЖ. Значимым открытием онкологии последних 2 десятилетий явилось обнаружение генов наследственного РМЖ и рака яичника — *BRCA1* и *BRCA2*. *BRCA*-обусловленный РМЖ составляет 5–10 % всех случаев рака данной локализации. Вклад наследствен-

ных генных дефектов в заболеваемость РМЖ в Узбекистане практически не изучался. Настоящая работа направлена на изучение частоты и клинической значимости мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* у больных с отягощенным семейным анамнезом в Узбекистане.

В исследование была включена группа пациенток с РМЖ ($n = 24$), отобранных по наличию семейного анамнеза. Контрольная группа состояла из 103 практически здоровых женщин. Для выявления мутаций 5382insC, 4153delA, 185delAG и 300T>G в гене *BRCA1*, а также 6174delT в гене *BRCA2* использовалась аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. В результате генотипирования обнаружено, что 3 (12,5 %) пациентки имеют гетерозиготную мутацию *BRCA1* 5382insC. Мутации *BRCA1* 4153delA, 185delAG, 300T>G и *BRCA2* 6174delT не выявлены ни в одном из проанализированных случаев. Исследованные мутации не обнаружены и в контрольной группе.

Результаты исследования указывают на целесообразность включения генотипирования мутации *BRCA1* 5382insC в качестве предиктивного онкогенетического теста в массовое обследование здоровых женщин Узбекистана с отягощенным семейным анамнезом, что будет способствовать значительному увеличению выявляемости РМЖ на ранней стадии, а также проведению эффективных профилактических медицинских вмешательств.

Выявление мутаций в образцах меланомы с помощью биочипов и массового параллельного секвенирования

И.С. Абрамов^{1,2}, М.А. Емельянова^{1,2}, Л.Г. Гукасян¹,
Е.В. Степанова², О.О. Рябая², Н.С. Петрович²,
Л.Н. Любченко², Т.С. Бельшева², А.С. Заседателев^{1,2},
Т.В. Наседкина^{1,2}

¹ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

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

Меланома является наиболее агрессивной формой рака кожи. В настоящее время разработан ряд препаратов направленного действия, которые подавляют рост опухоли при определенном генотипе ее клеток. Для выявления клинически значимых соматических мутаций, определяющих выбор терапии, разрабатываются практические методы, способные значительно улучшить персонализированные подходы в лечении меланомы. Также необходимо осуществлять поиск новых мутаций, которые обуславливают устойчивость либо чувствительность опухоли к различным таргетным препаратам.

Проведен анализ мутационного статуса 6 клеточных линий меланомы, 6 меланоцитарных невусов и 15 клинических образцов меланомы с помощью

2 методов: массового параллельного секвенирования (NGS) и биологических микрочипов. Секвенирование выполняли на платформе GS Junior (454/Roche). Отбор кодирующих участков генов *NRAS*, *PDGFRA*, *KIT*, *RASA1*, *RAC1*, *MET*, *BRAF*, *PTEN*, *AKT1*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *CDKN2A* и *TP53* проводили с помощью технологии жидких чипов NimbleGen Sequence Capture (Roche). Параллельно были проанализированы 27 соматических мутаций в генах *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *MAP2K1* и *MAP2K2* методом мультиплексной LNA-блокирующей полимеразной цепной реакции и гибридизации на биочипе.

Выявлены соматические мутации в генах *NRAS*, *BRAF*, *MAP2K1*, *TP53*. Также с помощью секвенирования обнаружены редкие герминальные варианты нуклеотидных замен в генах *CDKN2A*, *KIT*, *PDGFRA*, *MAP2K1*. Герминальный статус миссенс-мутаций в гене *CDKN2A* подтвержден с помощью секвенирования по Сэнгеру геномной ДНК, выделенной из лимфоцитов крови соответствующих пациентов. В результате исследования биочипы показали себя надежной, простой и высокочувствительной системой для анализа известных мутаций в генах *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *MAP2K1* и *MAP2K2*, для более широкого исследования мутационного статуса опухолевых клеток меланомы высокую эффективность показало массовое параллельное секвенирование.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 14-35-00107).

Оценка генокорректирующей активности К-48, Дэкцина (К-18), К-42 как новых средств терапии

Н.А. Агзамова, З.М. Еникеева, А.Ч. Абдирова,
Н.Б. Юсупова, М.С. Гильдиев

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

Цель исследования — изучение изменений генетической информации в клетках костного мозга у мышей с разными генотипами (C57BL/6, BALB/c и беспородных) и с разными опухолями, как интактных, так и опухоленосителей; оценка генокорректирующей и иммуномодулирующей активности К-18, К-42, К-48 как новых средств терапии.

Материалы и методы. Использованы цитогенетический и иммунологические методы исследования с применением фитогемагглютинаина, питательной среды, эмбриональной телячьей сыворотки, моноклональных антител, антисывороток (фирмы «ПанЭКО», ДАКО, Санкт-Петербургский НИИ гематологии).

Результаты. Анализ результатов изучения фенотипа иммунокомпетентных клеток у мышей линий BALB/c, C57BL/6 и беспородных и создание модельной тест-системы для изучения коррекции иммунного и генетического статусов позволили констатировать наличие у К-48 при внутрибрюшинном (в дозах

100 и 1 мг/кг) и К-42 при пероральном применении в терапевтических дозах после проведенного лечения животных с опухолями АКАТОЛ и меланомы В-16 иммуномодуляции (активации и совершенствования функциональной активности клеток иммунной системы) и индукции апоптоза. При использовании К-18 наблюдалось снижение уровня иммунологических показателей по сравнению с группой нелеченых животных, однако он способствовал сохранению активности клеток иммунной системы, что проявляется в реакциях как с митогеном конканавалином А, так и с АгМ, в усилении апоптоза (CD95⁺). Цитогенетический анализ показал, что структурные изменения хромосом увеличиваются вне зависимости от линии животных и от трансплантируемой опухоли. При воздействии на животных с опухолями меланомы В-16 и АКАТОЛ К-48 в дозах 100 и 1 мг/кг снижает уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга опухоленосителей с меланомой В-16 до 60 %, с АКАТОЛ — до 54 % по сравнению с нелечеными животными. При воздействии К-18 и К-42 наблюдалось снижение aberrаций хромосом опухоленосителей с меланомой В-16 на 54 и 23 %, с АКАТОЛ — на 26 (недостаточно) и 44 % соответственно.

Выводы. К-48 обладает наиболее выраженным иммуно- и генокорректирующим действием в дозе 1 мг/кг, Дэкоцин и К-42 — в меньшей степени. Следовательно, применение К-48 может быть перспективным для коррекции онкологических заболеваний.

Работа поддержана грантом Республики Узбекистан ФДСС 12.7.

Исследование цитотоксической активности нового комплекса биологически активных веществ эриксина в отношении клеток рака молочной железы

У.С. Акбаров, А.А. Абдувалиев, А.Х. Рахманов

Межвузовская научно-исследовательская лаборатория Ташкентской медицинской академии, Республика Узбекистан

Эриксин — водный раствор комплекса биологически активных веществ (полипептидов и свободных аминокислот), а также микроэлементов, получаемых из биомассы змей *Eryx*. Нами определена цитотоксическая активность препарата эриксин в отношении временной культуры опухолевых клеток.

Временную культуру опухолевых клеток рака молочной железы получали из биопсийного материала пациентов, проходивших лечение в Республиканском онкологическом научном центре (Ташкент). Воздействие на опухолевые клетки препаратом эриксин проводили в дозах 200, 100, 50, 10 мкг/10 × 10⁶ клеток в течение 60 мин с последующим определением коли-

чества живых, погибших и апоптозных клеток в сравнении с контрольной группой клеток, не подвергшихся воздействию препарата.

Проведенные исследования показали, что препарат эриксин обладает цитотоксическим эффектом в отношении клеток рака молочной железы во всех исследованных дозах. Наибольшую эффективность подавления жизнедеятельности раковых клеток (48 %) мы наблюдали при воздействии препарата в дозе 100 мкг/10 × 10⁶ клеток, количество апоптозных клеток составило 1,0 ± 0,31 %. С учетом фоновой гибели клеток в контроле, препарат эриксин ингибирует рост раковых клеток на 23,0 % в дозе воздействия 100 мкг/10 × 10⁶ клеток.

Обращает на себя внимание отсутствие у препарата дозозависимого эффекта цитотоксических свойств: с повышением дозы гибель раковых клеток увеличивается незначительно. По-видимому, это связано с механизмом действия препарата на метаболизм опухолевых клеток: взаимодействие активных веществ, входящих в его состав, с опухолевыми клетками происходит на уровне рецепторов, отсюда и отсутствие эффекта «высокой дозы». Соединяясь с рецепторами на поверхности опухолевых клеток, активные вещества в составе препарата вызывают нарушение пролиферирующего сигнального раковых клеток, что приводит к их гибели и индукции апоптоза.

Молекулярная патология гена *MGMT* при глиобластоме

Е.А. Алексеева, А.С. Танас, В.В. Стрельников, Д.В. Залетаев

ФГБНУ МГНЦ, Москва

Наиболее изученным молекулярным изменением при глиобластоме является аномальное метилирование промоторной области гена *MGMT*, расположенного на хромосоме 10q26.3. В настоящее время метилирование промоторной области этого гена считается основным клиническим маркером чувствительности опухоли к терапии темозоломидом. Другим событием, приводящим к инактивации гена *MGMT*, может быть потеря гетерозиготности (ПГ) области его расположения. **Целью работы** явилась комплексная характеристика молекулярной патологии гена *MGMT* при глиобластоме.

Образцы опухолевой ткани и образцы периферической крови получены от 163 пациентов с глиобластомой. Для исследования метилирования промотора гена *MGMT* разработаны системы мультилокусных метилчувствительных полимеразных цепных реакций (ПЦР) с использованием рестриктаз HpaII и HhaI. Частота метилирования промотора *MGMT* составила 39,3 % (64 из 163). Исследование ПГ в локусе 10q26.3 осуществляли с помощью микросателлитного анализа. Система микросателлитных маркеров включала 10 ми-

кросателлитных повторов. Доля образцов с ПГ области расположения гена *MGMT* составила 60,2 % (74 из 123).

С помощью нового подхода для определения изменения копийности геномных локусов — количественного микросателлитного анализа (КМА) — в образцах с выявленной ПГ исследован характер аллельного дисбаланса. Принцип КМА основан на TaqMan-ПЦР в реальном времени. В этом подходе в качестве зонда для детекции продукта используется олигомер, состоящий из 21 нуклеотида, комплементарный к (CA)_n-повтору. Эндогенным контролем служила одновременная амплификация в одной лунке набора пар праймеров к 6 геномным локусам, содержащим (CA)_n-повторы и расположенным на различных хромосомах, нарушения копийности которых не характерны для глиобластомы. С помощью КМА были проанализированы 63 образца глиобластомы с выявленной ПГ *MGMT*. В 46,0 % (29 из 63) образцов выявлена только 1 копия исследованной области (делеция), в 49,2 % (31 из 63) — 2 копии (однородительская дисомия) и в 4,8 % (3 из 63) образцов присутствовали как участки делеции, так и участки однородительской дисомии.

С помощью двустороннего теста Фишера не выявлено ассоциации между метилированием промотора гена *MGMT* и ПГ области его расположения.

Таким образом, ПГ области расположения гена *MGMT* может рассматриваться как потенциальный дополнительный маркер прогноза течения заболевания и ответа на терапию.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-31832 мол_а.

Провоспалительные цитокины и миелоидные супрессорные клетки как мишени терапии рака

К.-С.Н. Атретханы, М.А. Носенко, Р.В. Зварцев, А.А. Круглов, Г.А. Ефимов, С.А. Недоспасов, М.С. Друцкая
ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Миелоидные супрессорные клетки (myeloid derived suppressor cells, MDSC) представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из незрелых миелоидных клеток. В нормальных условиях они благополучно проходят все стадии дифференцировки и образуют макрофаги, гранулоциты и дендритные клетки. При патологических состояниях, таких как воспаление, рак или инфекции, происходит ингибирование дифференцировки незрелых миелоидных клеток, что приводит к их накоплению в крови и поврежденной ткани. MDSC осуществляют супрессорную функцию за счет экспрессии аргиназы 1 (ARG1) и индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS). Эти подавляющие иммунную систему факторы способствуют росту опухоли,

ингибируя противоопухолевый Т-клеточный ответ. Интерлейкин-6 (IL-6) и GM-CSF необходимы для получения MDSC *in vitro* из клеток костного мозга (Marigo I. et al., 2010). Недавно было показано, что сигнальный каскад TNF и его рецептора TNFR11 обеспечивает выживание MDSC, регулируя клеточный белок — ингибитор FLICE (с-FLIP) и активность каспазы-8 (Xueqiang Zhao et al., 2012).

Разработана экспериментальная модель для изучения влияния системной противовоспалительной терапии на индуцированное опухолевым ростом накопление MDSC в крови. Для блокировки TNF мышам линии C57BL/6, трансплантированным клетками фибросаркомы MCA205, вводили этанерцепт, слитный белок растворимого рецептора TNFR11 и константного участка иммуноглобулина G1 человека. Контрольная группа мышей получала контрольное антитело, не связывающее мышинный TNF (Knight D. et al., 1993). Антитела вводили внутривентрально из расчета 10 мкг/г каждые 3 дня. Опухолевые клетки инъецировали через неделю после начала анти-TNF-терапии. Рост опухоли и накопление MDSC в крови оценивали регулярно на протяжении 3 нед. Анализ MDSC проводили методом проточной цитометрии с использованием эпитоп-специфических антител против CD11b и GR-1 мыши.

Показано, что системная антицитокиновая терапия приводит к значительному замедлению роста фибросаркомы MCA205 *in vivo*. Мыши, леченные этанерцептом, имели существенно меньший объем опухоли и пониженное содержание MDSC в крови через 3 нед после инокуляции опухолевых клеток. Наши данные свидетельствуют о том, что терапия, основанная на блокировке одного из ключевых провоспалительных цитокинов, способствует уменьшению опухолевого роста и накоплению MDSC у мышей с фибросаркомой MCA205. В будущем такие же эксперименты будут проведены с анти-IL-6-антителами.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-25-00160).

Интерлейкин-6 и другие провоспалительные цитокины в модели спонтанной В-клеточной лимфомы

К.-С.Н. Атретханы¹, М.А. Носенко¹, Р.В. Зварцев¹, Д. Хозер², Г. Вильямский², Т. Бланкенштайн², С.А. Недоспасов¹, М.С. Друцкая¹

¹ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;
²Центр молекулярной медицины им. Макса Дельбрюка, Берлин, Германия

Хроническое воспаление может играть важную роль в процессах канцерогенеза. Показано, что в усло-

виях хронического воспаления происходит запуск сигнальных каскадов и транскрипционных факторов, которые могут дать селективное преимущество опухолевым клеткам. Интерлейкин-6 (IL-6) является одним из главных провоспалительных цитокинов, экспрессия которого повышается на фоне инфекций, повреждения ткани, аутоиммунных патологий и развития опухолей. TNF — многофункциональный цитокин, физиологические функции которого связаны с защитой организма от инфекций, контролем воспаления и иммунорегуляцией. LTα — родственный TNF цитокин, ответственный за формирование вторичных лимфоидных органов и поддержание микроокружения лимфоидных ниш, для которого недавно была показана проонкогенная роль в нескольких экспериментальных моделях канцерогенеза (рак простаты, гепатоклеточная карцинома) при передаче сигнала через LTβR. Основная цель настоящей работы — изучить экспрессию генов провоспалительных цитокинов IL-6, TNF и LTα опухолевыми клетками на модели В-клеточной лимфомы.

В качестве экспериментальной модели были выбраны генетически модифицированные мыши, у которых происходила активация онкогена *Tag* вируса SV40 в В-клетках (за счет вырезания ингибирующей транскрипцию *Tag* последовательности при активации Cre-рекомбиназы), что приводило к спонтанному возникновению В-клеточных лимфом у этих животных в возрасте 5–8 месяцев. Клетки первичной лимфомы от таких мышей пересаживали RAG-дефицитным мышам, у которых развивались вторичные лимфомы в течение 2–3 нед. В полученных образцах лимфом экспрессию генов *IL6*, *TNF* и *LTA* оценивали методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. При этом анализировали как исходный образец спленоцитов, так и обогащенную опухолевыми клетками фракцию В-лимфоцитов, полученную методом магнитной сепарации.

В ходе работы проанализировано 18 образцов В-клеточных лимфом и показано, что уровень экспрессии *TNF* и *LTA* в них более чем на порядок снижен по сравнению с контрольными образцами, в качестве которых были выбраны наивные или активированные спленоциты и В-клетки. Полученные данные показывают, что в клетках лимфомы происходит значительное снижение уровня экспрессии цитокинов TNF и LTα, при этом опухолевые образцы имеют дифференциальный профиль экспрессии IL-6. В некоторых образцах лимфом происходит повышение уровня экспрессии IL-6, тогда как другие образцы имеют неактивированный статус и экспрессия IL-6 в них соответствует экспрессии в В-клетках и спленоцитах здоровых мышей. При этом известно, что IL-6 необходим для развития и пролиферации В-клеток. Кроме того, для него показана проонкогенная роль в развитии различных видов лимфом как на мышинных моделях, так и в клинике, а также начаты клинические испытания с при-

менением блокаторов IL-6 у людей с В-клеточной и неходжкинской лимфомами. Снижение уровня экспрессии TNF и LTα в опухолевых образцах свидетельствует о том, что, несмотря на их значимую роль в формировании воспалительного микроокружения при развитии солидных опухолей, по-видимому, роль этих цитокинов в развитии опухолей гематологического происхождения незначительна.

Работа осуществлена при поддержке РНФ (грант № 14-25-00160).

Возможности иммуноцитохимии в диагностике узловых образований щитовидной железы

И.С. Березкина¹, Т.В. Саприна¹, А.П. Зима¹, А.В. Исаева¹,
В.Н. Латыпова¹, И.Н. Ворожцова¹, М.Р. Мухамедов^{1,2},
Л.Р. Базилевич³, О.С. Попов¹

¹ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск;

²ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

³ОГАУЗ «Томская областная клиническая больница»

Распространенность рака щитовидной железы (РЩЖ) увеличилась с 2003 до 2014 г. почти в 2 раза — с 55,0 до 97,1 на 100 тыс. населения. Проблема дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы (ЩЖ) остается актуальной и является причиной выполнения большого количества «лишних» оперативных вмешательств, доходящего до 71 %.

Цель исследования — изучение возможности использования иммуноцитохимического определения экспрессии маркеров галектина-3, нуклеофозмина, Ki-67 в пунктате из узлов ЩЖ для дифференциальной диагностики злокачественного и доброкачественного процессов. Клиническая группа представлена 28 пациентами с узловым зобом. На этапе гистологического исследования представлены следующие заключения: коллоидный зоб — 12 случаев, аутоиммунный тиреоидит — 7 (из них 4 случая являлись фоном узлового коллоидного зоба), фолликулярная аденома — 2, папиллярный рак — 11 (из них 1 случай папиллярного рака с фокусами фолликулярного). Мы определяли связь Histochemical score (HS) экспрессии маркеров Ki-67, нуклеофозмина, галектина-3 с наличием РЩЖ. HS рассчитывали по формуле:

$$HS = \sum P(i) \times i,$$

где *i* — интенсивность окрашивания в баллах (от 0 до 3); *P(i)* — процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

HS Ki-67 продемонстрировал сильную положительную корреляцию ($r = 0,8$; $p < 0,001$) со злокачественным потенциалом образования ЩЖ. С помощью бинарной логистической регрессии была выведена

формула, которая на основании HS Ki-67 позволяет предположить злокачественный процесс:

$$P = \frac{1}{1 + 2,718^{(-2,737 + 0,084 \times \text{HS Ki-67})}}$$

При $P > 0,5$ наиболее вероятно, что образование является злокачественным. Таким образом, при HS Ki-67 $> 32,6$ вероятность того, что образование щитовидной железы будет злокачественным, $> 50\%$. Чувствительность данного метода — $81,8\%$, специфичность — $93,8\%$; положительная предсказательная ценность — 90% , отрицательная — 88% . Чувствительность и специфичность экспрессии остальных маркеров, как по отдельности, так и в совокупности, была ниже, чем определение только HS Ki-67. При совместном же проведении жидкостной цитологии и определении HS Ki-67 чувствительность и специфичность метода достигают 100% . Выведена формула для расчета принадлежности к группе злокачественной или доброкачественной патологии методом бинарной логистической регрессии:

$$P = \frac{1}{1 + 2,718^{(-177,6 + 0,366 \times \text{HS Ki-67} + 37,5) \times \text{ЖЦ по классиф. Бетесда}}}$$

В случае постановки заключения фолликулярной аденомы узел с наибольшей вероятностью является злокачественным при HS Ki-67 $> 82,4$. Однако наше исследование имеет ограничение, так как среди пациентов с подозрением на фолликулярный рак диагноз не подтвердился гистологически ни в одном из случаев.

*Исследования выполнены при поддержке
Гранта совета при Президенте РФ для поддержки
ведущих научных школ (№ НШ-4184.2014.7),
Гранта совета при Президенте РФ для поддержки
молодых докторов наук (№ 16.120.11.1233-МД).*

Использование технологии CPP (cell penetrating peptides) для создания таргетных противоопухолевых пептидов. Исследование противоопухолевой активности химерного пептида – ингибитора Ras-киназы

**В.К. Боженко, Т.М. Кулинич, А.М. Шишкин,
Е.А. Кудинова, А.В. Иванов**

*ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»
Минздрава России, Москва*

Введение. Разрабатываемый нами подход к созданию новых противоопухолевых препаратов основан на использовании инновационной технологии внутриклеточной доставки высокомолекулярных соединений на основе CPP (cell penetrating peptides), или ин-

тернализуемых пептидов. В рамках этой технологии нами исследован спектр химерных пептидных конструкций, включающих в составе одной полипептидной цепи транспортные последовательности и функциональные последовательности, таргетно ингибирующие целевые внутриклеточные мишени, такие как cyclin D/CDK4, Ras/Raf и др.

Материалы и методы. Синтезирована библиотека пептидов, отличающихся транспортной и функциональной последовательностью. Синтезированы флуоресцентные аналоги. Флуоресцентная и конфокальная микроскопия использовались для изучения внутриклеточной локализации вариантов синтезированных пептидов. Цитотоксические и цитостатические свойства изучались на различных клеточных линиях: SCOV, A549, HT29, HCT116, MCF-7 и др., как в экспериментах *in vitro* с применением стандартных тестов (МТТ, проточная цитофлуориметрия), так и с использованием технологии online-мониторинга iCelligence. *In vivo* эксперименты проводили на моделях ксенографтов.

Результаты. Показано, что применение технологии CPP позволяет эффективно доставлять пептиды различной молекулярной массы как в цитоплазму клетки, так и в ядро. Короткие пептидные последовательности могут реализовать отдельные функции полноразмерных белков. Последовательность из белка p16INK4a ингибировала комплекс cyclin D/CDK4 и останавливала клеточную пролиферацию на этапе перехода G1–S при концентрации $5–10\text{ мкМ}$ для различных клеточных линий. Последовательность, ингибирующая взаимодействие Ras/Raf, также подавляла активацию клеточной пролиферации. Обе последовательности активировали клеточную гибель по механизму апоптоза при повышении концентрации в 2 и более раза по сравнению с концентрацией, вызывающей торможение деления. Показано также, что возможно получение последовательностей, ингибирующих активность транскрипционных факторов, таких как E2F и Мус. В экспериментах *in vivo* на моделях ксенографтов показано, что внутривенное введение малотоксично и вызывает торможение роста опухоли на $50–70\%$ для разных линий.

*Работа поддержана Минобрнауки России
(грант № 14. N08.11.0057) и Минпромнауки России
(грант № 11411.1008700.13.131).*

Исследование противоопухолевой активности лимфоцитов, генномодифицированных искусственным Т-клеточным рецептором (CAR), специфичным к раково-эмбриональному антигену

В.К. Боженко, А.М. Шишкин,
А.В. Иванов, Т.М. Кулинич

ФГБУ РНЦРР Минздрава России, Москва

Цель исследования — разработка генетических конструкций искусственного Т-клеточного рецептора, специфичного к раково-эмбриональному антигену (РЭА); отработка технологии получения генномодифицированных лимфоцитов и доклиническая проверка их противоопухолевой активности.

Материалы и методы. Создана панель генетических конструкций Т-клеточного рецептора, включающая различные варианты внутриклеточной последовательности на основе генов *CD8*, *CD28*, *CD137* и *CD247* и внеклеточную распознающую часть — мономолекулярные scFv моноклональных антител мыши к РЭА человека. Цитотоксичность лимфоцитов, трансформированных плазмидами, содержащими гены химерных рецепторов, проверялась *in vitro* на клеточных линиях опухолей человека A549, HT29 и *in vivo* на модели ксенографтов. Фармакокинетика исследовалась на 2 видах животных.

Результаты. Трансфекция *in vitro* лимфоцитов человека плазмидами, содержащими химерный Т-клеточный рецептор, приводит к стойкой экспрессии на их поверхности соответствующей белковой конструкции, что подтверждается исследованием с антителами к ζ -цепи химерного рецептора и связыванием ФИТЦ-меченного РЭА. В экспериментах *in vitro* цитотоксическая активность трансформированных лимфоцитов составила 50 % и более, что превышает соответствующие показатели для аналогичных конструкций, описанных в литературе. Показано, что цитотоксические свойства лимфоцитов, экспрессирующих искусственный Т-клеточный рецептор, *in vitro* проявляются только в отношении РЭА-позитивных клеток и минимальны в отношении РЭА-негативных. На модели ксенографтов колоректального РЭА-позитивного рака человека (HCT116) показано, что адоптивная иммунотерапия с использованием генномодифицированных плазмидой pCI/3C1-3g лимфоцитов имеет высокую противоопухолевую активность. При введении генномодифицированных лимфоцитов в режиме 1 млн клеток в неделю внутрибрюшинно на момент гибели 100 % контрольных животных ($n = 10$) в экспериментальной группе остались живы 80 % ($n = 8$). Исследована фармакокинетика генномодифицированных лимфоцитов и пока-

зана длительная персистенция их в кровотоке *in vivo* (более 2 нед).

Работа поддержана Минобрнауки России (грант № 14. N08.11.0018).

Модулирование функциональной активности глюкокортикоидного рецептора с избирательной активацией транскрепрессии с помощью иммуносупрессора рапамицина

О.И. Борисова (Задорожная)¹, А.В. Савинкова^{1,2},
Л.Р. Тилова¹, Е.М. Жидкова², К.И. Кирсанов¹,
Е. Винокур³, Г.Е. Байда³, И.В. Будунова³,
М.Г. Якубовская¹, Е.А. Лесовая^{1,4}

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

²ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова»;

³North-Western University, Chicago, USA;

⁴ГБОУ ВПО «РязГМУ им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России

Глюкокортикоиды (ГК) широко используются при лечении гемобластозов, однако их длительное применение вызывает ряд серьезных осложнений. Глюкокортикоидный рецептор (ГКР) регулирует экспрессию генов по 2 механизмам: трансктивации и транскрепрессии. Транскрепрессия представляет собой белок-белковое взаимодействие ГКР с регуляторами пролиферации и апоптоза. В результате происходит подавление активности этих факторов и, следовательно, снижение жизнеспособности опухолевых клеток. Побочные эффекты ГК связывают с запуском трансктивации, которая реализуется посредством образования гомодимера ГКР и его взаимодействия с респонсивными элементами в промоторах и энхансерах пропролиферативных и антиапоптотических генов.

Показано, что ключевую роль в развитии побочных эффектов ГК играет ГК-зависимый белок REDD1, ингибитор белкового комплекса mTORC1. С помощью виртуального докинга протестировано около 1500 известных лекарственных препаратов — потенциальных ингибиторов REDD1. Четыре препарата были отобраны для тестирования *in vitro*. Наиболее значительное ингибирование REDD1 продемонстрировано на клеточных линиях СЕМ и лимфомы Granta для иммуномодулятора рапамицина. Показано значительное снижение базального и ГК-индуцированного уровня REDD1 после обработки клеток рапамицином, на уровне белка и на уровне мРНК. Рапамицин существенно подавлял фосфорилирование ГКР, его транслокацию в ядро, а также ГК-индуцированную активность люциферазы при проведении репортерного анализа с использованием плазмиды с множественными сайтами связыва-

ния ГКР в промоторной области. Экспрессия ГКР-зависимых генов была также подавлена. В то же время рапамицин усиливал транскрепрессорную функцию ГКР, что показано с помощью NF-κB-репортерного анализа и количественной полимеразной цепной реакции NF-κB-зависимых генов. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования комбинации рапамицина с ГК в химиотерапии гемобластозов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 13-04-01707 и № 15-04-04006) и фонда «Династия».

Математическое моделирование структурной организации лимфатического узла

Г.А. Бочаров¹, А.А. Кислицын^{1,2}, Р.С. Савинков^{1,2}

¹Институт вычислительной математики РАН, Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»

Метастазирование регионарных лимфатических узлов (ЛУ) является ключевым этапом в диссеминации опухолевых клеток для ряда вариантов злокачественных опухолей, таких как карцинома и меланома. Механизмы локального метастазирования опухолевых клеток в ЛУ и их роль в развитии системного метастазирования недостаточно изучены. Для исследования процессов популяционной динамики опухолевых клеток в ЛУ необходимо построение анатомически корректных и структурно содержательных моделей лимфатического узла. В докладе представлены исследования по разработке вычислительной модели геометрической структуры лимфатического узла. Применение современных технологий высокоразрешающей флуоресцентной микроскопии и антител для иммуногистохимической визуализации структур и клеток лимфоидных органов открыло новые возможности в построении на основе экспериментальных данных анатомически корректных геометрических моделей ЛУ. При моделировании трехмерной структуры лимфатического узла использовалось обобщенное построение его макроэлементов. ЛУ представляется как совокупность следующих компонентов: субкапсулярный синус, В-клеточные фолликулы, медуллярная область, сеть фибробластных ретикулярных клеток (ФРК), система кровеносных сосудов, включая высокоэндотелиальные вены. Использовались оригинальные данные, полученные от коллег (М. Novkovic, L. Onder) в Институте иммунобиологии Кантонального госпиталя г. Санкт-Галлен (Швейцария), о геометрических и топологических характеристиках следующих структурных элементов ЛУ: сети ФРК (распределение ФРК по числу связей между ними и длинам контактирующих выступов), В-клеточных фолликулов, субкапсулярного синуса. В результате проведенных исследований разработана твердотельная модель ЛУ (Kislitsyn A. et al.,

2015), которая будет использоваться для моделирования транспортных процессов в ЛУ, а также взаимодействия клеток в ходе развития иммунного ответа.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (грант № 14-31-00024).

Трихинеллы на службе у человека

В.А. Бритов

Первомайск, Нижегородская область

Проведены исследования по изучению лечебного воздействия молока, полученного от лактирующих животных (коров, коз), предварительно прошедших иммунизацию вакциной Бритова. Получены положительные результаты при употреблении молока пациентами, страдавшими различными хроническими болезнями, в том числе: туберкулез, язва желудка и двенадцатиперстной кишки, простатит, импотенция, рак различной локализации (III–IV стадии), меланома, импотенция и др. Все больные говорили об улучшении своего состояния после приема иммунизированного молока в течение 3–4 нед. Они упоминали о повышении активности, снижении или исчезновении болей, приливе сил, увеличении трудовых возможностей, уменьшении объема патологических очагов в органах и тканях.

Большим потенциалом лечебного воздействия обладает и сыворотка крови вакцинированных животных, а также кровь вакцинированных доноров.

Трихинеллы выделяют антигены, в ответ на которые восстанавливается функция клеточного иммунитета, и благодаря неспецифичности он защищает от всевозможных заболеваний, в том числе и от рака. Ведь рак является следствием иммунодефицита. Клеточный иммунитет многофакторный, в этом его особенность и сила. Поэтому крылатая фраза Р.В. Петрова: «Тот, кто научится лечить иммунодефицит, научится лечить рак», — воплощена в реальность.

Трихинеллы как биотерапевтический препарат по своему лечебному воздействию на организм человека превосходят пиявок, пчел и змеиный яд.

Молекулярные механизмы противоопухолевого действия новых антрафурандионов

Ю.Л. Володина¹, Л.Г. Деженкова², В.Б. Цветков³,
В.В. Татарский (мл.)¹, Д.Н. Калужный⁴, А.А. Калинина¹,
А.Е. Щекотихин², А.А. Штиль¹

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

²ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

³ФГБУН «Институт нефтехимического синтеза
им. А.В. Топчиева РАН», Москва;

⁴ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Производные антрахинона — один из важнейших классов современных противоопухолевых препаратов. Однако используемые в клинике антрациклиновые антибиотики (доксорубин, даунорубин и др.) менее эффективны при лечении опухолей, устойчивых к ряду химиопрепаратов. В НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе проводится многолетняя работа по оптимизации структуры гетероциклических производных антрахинона. Среди новой серии антрафурандионов стереоизомеры ЛХТА-2033 (производное (R) — 3-аминопирролидина, R-изомер) и ЛХТА-2034 (производное (S) — 3-аминопирролидина, S-изомер) показали высокую антипролиферативную активность на линиях опухолевых клеток разного тканевого и видового происхождения, в том числе сублиниях с экспрессией Р-гликопротеина и инактивацией проапоптотического белка p53 (Щекотихин А.Е. и др., Патент РФ № 2554939, 2015). Оба изомера не являются субстратами Р-гликопротеин-зависимого транспорта. В микромолярных концентрациях соединения вызывают задержку клеточного цикла в фазе G2/M и последующий апоптоз. Внутриклеточная мишень антрафурандионов — двухцепочечная ДНК, с которой соединения образуют стабильные интеркаляционные комплексы, регистрируемые спектрометрически и подтверждаемые молекулярным докингом. Оба соединения тормозят релаксацию суперскрученной ДНК, осуществляемую топоизомеразы I и II. ЛХТА-2034 ингибирует ряд серин-треониновых протеинкиназ. Таким образом, новые производные антрафурандионов перспективны как соединения-кандидаты для доклинических исследований.

Работа поддержана грантом Минпромторга России (госконтракт № 12411.1008799.13.007).

Анализ белков микровезикул плазмы крови больных немелкоклеточным раком легкого

С.А. Галецкий, А.Ю. Журавская, И.Б. Зборовская,
А.В. Комельков, М.С. Шогенов, Е.М. Чевкина

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

Введение. Работа посвящена анализу белкового состава секретируемых микровезикул в плазме крови больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). В исследование включена группа представителей семейства белков липидных микромонов, играющих важную роль в поддержании структуры липидной мембраны, включая флотиллины (Flot1 и Flot2) и кавеолин (Cav-1), роль которых в секреции микровезикул, в частности экзосом, показана ранее, а также белок стоматин (Stom-1), участие которого в данном процессе ранее не изучалось. Вторая группа белков включала RalA, RalB и Arf6, входящие в суперсемейство малых ГТФаз Ras и известные своим активным участием в различных процессах внутриклеточного везикулярного транспорта, однако практически не исследованные в аспекте секреции внеклеточных микровезикул. Кроме того, в анализ был включен белок сурвивин из семейства ингибиторов апоптоза, данные о возможном участии которого в исследуемом вопросе очень малочисленны и противоречивы.

Материалы и методы. Использовали замороженные препараты плазмы, ранее полученные из образцов периферической крови больных НМРЛ, проходивших лечение в НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина, в том числе «парные» образцы, полученные до и после удаления первичной опухоли. Препараты выделяли с помощью серийного центрифугирования и ультрацентрифугирования (110 000g/3 ч). Полученный материал анализировали по стандартной методике вестерн-блот-гибридизации.

Результаты. Во всех препаратах микровезикулярной фракции плазмы крови регистрировался высокий уровень белка CD9 (маркера экзосом), при этом данный белок не детектировался в лизатах культивируемых клеток опухолей НМРЛ (негативный контроль). Исследована продукция ряда белков, возможное присутствие которых в составе экзосом было предположено на основе литературных данных. Определена группа белков, отсутствующих в экзосомах, включая Arf6, сурвивин и Cav-1. Показано, что белки Stom-1, Flot1 и Flot2, RalA и RalB конститутивно присутствуют в исследуемых образцах. Более того, при сравнении «парных» препаратов, полученных от одного и того же пациента, было обнаружено, что уровень белков Stom-1, Flot1 и Flot2, RalA и RalB в микровезикулярной фракции снижается после удаления первичного опухолевого узла. Важно отметить, что это снижение происходит параллельно с падением уровня CD9. Это

свидетельствует о том, что оно обусловлено, по-видимому, уменьшением общего количества секретируемых в кровь экзосом после хирургического лечения. Для подтверждения этого предположения в дальнейшем планируется увеличить выборку исследуемых образцов, а также провести количественный анализ изменения содержания экзосом и соотнести его результаты с изменением уровня исследуемых белков.

Выводы. Обнаружено, что белки липидных микроомов дифференциально представлены в микровезикулярной фракции образцов крови больных НМРЛ — перманентно присутствуют белки Stom-1, Flot1 и Flot2 и отсутствует белок Cav-1. Также впервые показано присутствие в составе секретируемых микровезикул малых ГТФаз RalA и RalB и отсутствие малой ГТФазы Arf6.

Разработка адресного терапевтического средства для лечения костных метастазов

С.Г. Гамалей, Е.Д. Даниленко, Г.М. Сысоева,
А.В. Батенева, Е.А. Волосникова, Г.М. Левагина

Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ
«Вектор», Бердск

Костные метастазы являются одним из часто встречающихся осложнений опухолевых заболеваний, таких как миеломная болезнь, рак молочной железы, предстательной железы и ряда других. Очевидно, что эффективный препарат для лечения костных метастазов, помимо высокой противоопухолевой активности и селективности воздействия на опухолевые клетки, должен обладать способностью ингибировать разрушение костной ткани, индуцированное опухолевым процессом, и инициировать ее восстановление. Кроме того, существенной проблемой, которую требуется решить в ходе разработки такого препарата, является способ доставки лекарственного вещества в патологический очаг кости.

Для решения этих задач мы использовали рекомбинантный фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) человека и аллендроновую кислоту. ФНО- α — белок-цитокин, обладающий прямым цитотоксическим и апоптогенным действием в отношении опухолевых клеток. Бисфосфонат аллендроновая кислота отличается высоким сродством к костной ткани, активирует процесс ремоделирования кости и, следовательно, может быть использована в качестве векторной молекулы и средства восстановления костной ткани.

Целью исследования являлась разработка метода получения препарата рекомбинантного ФНО- α человека, ковалентно связанного с аллендроновой кислотой, оценка его физико-химических и биологических свойств.

В ходе исследования разработан метод твердофазного синтеза конъюгата ФНО- α с аллендроновой

кислотой с использованием сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилата. Исследование конъюгата методами электрофореза, гель-хроматографии, иммуноферментного анализа и анализ его специфической активности свидетельствуют о том, что введение в структуру ФНО- α остатка аллендроновой кислоты не приводит к нарушению конформационных свойств белка и существенному снижению его биологической активности. ФНО- α в составе конъюгата отличается повышенной тропностью к костной ткани и опухолевой ткани костных метастазов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России, в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0061; уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0061).

Изменение иммунорфологического фенотипа рака прямой кишки под влиянием лучевой терапии с радиомодификацией вихревыми магнитными полями

И.Г. Гатауллин, А.В. Жинов, С.В. Городнов

ГБОУ ДПО КазГМА Минздрава России;
ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер»,
Ульяновск

Актуальность. Дальнейший прогресс в результатах лечения больных раком прямой кишки (РПК) связан с использованием комбинированного метода лечения с неoadъювантным компонентом.

Материалы и методы. Проведена оценка результатов лечения 123 больных РПК II–III стадии. Выделены 2 группы: 1-я ($n = 64$) — радикальная операция; 2-я ($n = 59$) — неoadъювантное лечение по 2 схемам: 30 пациентов получили предоперационную лучевую терапию средними фракциями, у 29 больных предоперационная лучевая терапия сочеталась с использованием магнитотерапии как радиомодифицирующего фактора. Иммуногистохимические исследования проведены с помощью набора моноклональных антител к белкам Ki-67, Bcl-2, p21, раково-эмбриональному антигену, Е-кадгерину, CD68, антигену CD45RO, CD95/Fas.

Результаты. При анализе широкого спектра биомаркеров РПК отмечен высокий уровень экспрессии раково-эмбрионального антигена и маркера клеточной пролиферации Ki-67. Отмечены слабая и умеренная положительная экспрессия CD68 и инфильтрация Т-лимфоцитами во всех случаях; слабopоложительная экспрессия p21 в половине наблюдений; слабopоло-

жительная экспрессия Е-кадгерина в 33,3 %; отрицательная реакция на Bcl-2 и CD95 во всех наблюдениях. Применение предоперационной лучевой терапии с радиомодификацией вихревыми магнитными полями изменяет иммуноморфологический фенотип РПК, что проявляется в снижении пролиферации опухоли (слабая активность Ki-67 в 100 %), уменьшении экспрессии p21 (отрицательная реакция в 100 %), усилении дифференцировки опухоли (экспрессия Е-кадгерина в 88,9 %) и повышении внутритканевого иммунитета (Т-клеточная инфильтрация в 88,9 %).

Заключение. Предоперационная лучевая терапия средними фракциями до суммарной очаговой дозы 25 Гр в сочетании с радиомодификацией вихревыми магнитными полями оказывает выраженное воздействие на структуру опухоли. Это проявляется в снижении ее пролиферативной активности, усилении дифференцировки и Т-клеточной инфильтрации опухоли.

Патч-кламп-спектроскопия как потенциальный инструмент диагностирования в молекулярной онкологии и анализе активности ионных каналов как вероятных молекулярных мишеней

О.В. Градов

ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН», Москва

Известна корреляция между некоторыми молекулярно-онкологическими дескрипторами и состоянием ионных каналов. В частности, известны роли потенциал-зависимых ионных каналов в пролиферации, апоптозе, фармакологической резистентности раковых клеток. Обсуждается связь липидома и канала в механизмах канцерогенеза, а также функция каналомии хондриома в малигнизации и смежных процессах. Роль ионного транспорта в канцерогенезе прослеживается от инициальных до метастатических состояний, в связи с чем некоторые авторы рассматривают канцерогенез как патологию канала (channelopathy) (Litan A., Langhans S.A., 2015). Как следствие, возникают перспективы использования самих ионных каналов как молекулярных мишеней в терапии (в частности — иммунотерапии) рака (Arcangeli A., Becchetti A., 2015). На данный момент простейшими молекулярными мишенями такого рода являются калиевые каналы. Вполне очевидно, что необходимо создание средства контроля состояния молекулярных мишеней при внешних фармакологических и иных воздействиях, базирующегося на принципах функционирования ионных каналов. Использование методов локальной фиксации потенциала (patch-clamp, voltage-clamp), ча-

сто используемых в исследованиях на линиях раковых клеток, в случае перехода к мониторингу эффективности фармакохимических агентов (так называемой patch-clamp pharmacology) требует многофакторного анализа данных, так как система содержит много возможных источников специфического отклика. В настоящее время интерпретация вариаций экспрессии ионных каналов как онкологических маркеров и идеология каналомной верификации действия онкофармакологических препаратов в целом дают возможность подобного исследования при привязке отдельных дескрипторов (например, частот открытия каналов) к характерным особенностям действия фармакологических средств в базе данных. В связи с этим нами предлагается создание средств патч-кламп-спектроскопии, в которой с каждой из релевантных частот отклика можно сопоставить определенный молекулярно-биологический процесс (Градов О.В., 2015), и их использование как потенциального инструмента диагностики в молекулярной онкологии и анализа активности ионных каналов как вероятных молекулярных мишеней для подбора адекватных онкофармакологических средств (как комплементарный валидационный подход).

Изучение новых перспективных систем доставки противоопухолевых препаратов на основе наночастиц нитрида бора

И.Ю. Житняк¹, Н.А. Глушанкова^{1,2}, И.В. Сухорукова²,
А.М. Ковальский², А.Т. Матвеев², Д.В. Штанский²

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

²ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»

Современные исследования в области разработки высокоэффективных способов лечения онкологических заболеваний включают в себя такое важное и перспективное направление, как разработка систем доставки противоопухолевых препаратов. Использование наноносителей позволяет преодолеть ряд ограничений, присущих традиционным схемам лечения злокачественных новообразований химиотерапевтическими препаратами, решить одну из главных проблем при лечении онкологических заболеваний — множественную лекарственную устойчивость неопластических клеток, возникающую в результате опухолевой прогрессии. Кроме того, технологии, использующие наноматериалы, позволяют увеличить время циркуляции препарата в крови, что повышает фармацевтическую эффективность препарата, и позволяет значительно снизить его дозу и уменьшить побочные эффекты.

Нанотранспортеры на основе гексагонального нитрида бора являются одной из новейших и наиболее

перспективных систем доставки противоопухолевых препаратов в опухолевые клетки. Исследуя наночастицы нитрида бора с развитой поверхностью, мы обнаружили, что они эффективно насыщаются доксорубицином и поглощаются трансформированными эпителиальными клетками. Наночастицы нитрида бора сами по себе не имели токсического действия, а их наноконъюгаты с доксорубицином оказывали значительный цитотоксический эффект на трансформированные эпителиальные клетки. Был изучен pH-зависимый механизм высвобождения химиопрепарата доксорубицин из наноконъюгатов внутри клетки и определены условия стабильности наноконъюгатов вне клеток.

Актуальность данного исследования продиктована отсутствием на сегодняшний день универсального носителя лекарственного препарата, обладающего как высокой терапевтической эффективностью, так и биосовместимостью. Поэтому изучение нанотранспортеров на основе нитрида бора представляется перспективным направлением.

Теломеразные ингибиторы на основе модифицированных химерных олигонуклеотидов для разработки противоопухолевых препаратов и диагностики

М.Э. Зверева¹, Д.М. Ажибек^{1,2}, Д.А. Скворцов¹,
М.П. Рубцова¹, Т.С. Зацепин^{1,2}, О.А. Донцова^{1,3}

¹Химический факультет, ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»;

²Сколковский институт науки и технологий;

³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»

Теломераза является сложным РНК-белковым комплексом и ключевым ферментом системы поддержания длины теломер, которая определяет пролиферативный потенциал клетки. В клетках многих типов опухолей человека происходит активация теломеразы, в то время как в соматических клетках активность теломеразы практически не обнаруживается. Ингибиторы теломеразы служат основой для разработки противоопухолевых препаратов. Мы использовали химерные олигонуклеотиды, которые имеют две олигонуклеотидные части, комплементарные разным функциональным областям теломеразной РНК. Эти части соединены ненуклеотидным линкером в различных ориентациях. Химеры ингибируют теломеразу в клетке в наномольных концентрациях, преимущественно за счет их влияния на сборку и димеризацию теломеразы (Azhibek D. et al., 2014). Сравнение эффективности химерных олигонуклеотидов с другими известными теломеразными ингибиторами этой природы показало

их преимущества, а анализ использования существующих теломеразных ингибиторов позволил определить их потенциальную пригодность для визуализации опухолевых клеток (Ажибек Д.М. и соавт., 2015). Обсуждается возможность применения химерных олигонуклеотидных теломеразных ингибиторов для визуализации опухолевых клеток и повышение эффективности их проникновения с помощью дополнительных модификаций.

Анализ возможности использования ингибиторов теломеразы олигонуклеотидной природы для разработки противоопухолевых препаратов и диагностики был проведен при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-24-00061).

Влияние К-21, К-23, К-26 и этопозида на активность нуклеиновых кислот, топоизомеразы II и экспрессию гена лекарственной устойчивости *MDR1* интактных клеток саркомы 180

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

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) — это невосприимчивость клеток или организма к целому ряду лекарственных препаратов. Механизмы формирования МЛУ разные; известно, что в клетке включается сразу несколько механизмов (Ставровская А.А., 2000; Красильников М.А., 2000), такие как: активация ферментов системы глутатиона, активация трансмембранных транспортных белков, выводящих токсические вещества из клетки (например, Р-гликопротеина), изменения в системе генов и белков, которые осуществляют контроль за апоптозом и клеточной пролиферацией, усиление репарации лекарственно индуцированного повреждения ДНК, повреждение лекарственных мишеней (топоизомеразы II).

Целью исследования было изучение влияния новых производных трополоновых алкалоидов К-21, К-23 и К-26 на синтез нуклеиновых кислот, активность топоизомеразы II и экспрессию мышинного гена лекарственной устойчивости *MDR1* на опухоли саркома 180.

Материалы и методы. К суспензии клеток саркомы 180 в 96-луночных планшетах добавляли препараты в концентрации 9 (К-21), 20 (К-23) и 22 (К-26) мкг/мл и инкубировали 2 ч при 37 °С и 5 % CO₂ в CO₂-инкубаторе. Затем количество выделенных ДНК и РНК измеряли на СФ-26. Межнуклеосомную деградацию ДНК оценивали посредством электрофореза ДНК в 1,5 % агарозном геле. Из опухолевой ткани под воздействием каждого препарата получены тотальные препараты РНК,

затем методом обратной транскриптазы получены мРНК и синтезированы комплементарные ДНК (экспрессия *MDR1*/ОТ-ПЦР).

Результаты. На клетках саркомы 180 показана высокая активность ингибирования синтеза ДНК и РНК исследуемых препаратов: у К-26 — 90 и 96 %; у К-23 — 70 и 90 % и у К-21 — 70 и 80 % соответственно; этопозид ингибировал синтез ДНК и РНК на 75 и 85 %. Самый высокий процент межнуклеосомной деградации ДНК был у К-26 — 85 %, у К-23 — 75 %, у К-21 — 55 % (у этопозиды — 65 %). К-26 ингибировал топоизомеразу II на 80 %, К-23 — на 70 %, К-21 и этопозид — на 50 %. Под влиянием К-21, К-23 и К-26 наблюдается низкий уровень экспрессии гена *MDR1* — 15–20 % по сравнению с более высоким уровнем экспрессии этого гена (в пределах 35 %) под воздействием этопозиды.

Вывод. Противоопухолевые препараты К-21, К-23 и К-26 способствуют низкому уровню развития МЛУ, по-видимому, из-за значительного ингибирования синтеза ДНК и РНК, межнуклеосомной деградации ДНК и активности топоизомеразы II.

Работа поддержана грантом Республики Узбекистан ФДСС 12.7.

Кандидатный маркер для ранней диагностики и прогноза течения плоскоклеточного рака головы и шеи

Г.В. Какурина, И.В. Кондакова, О.В. Черемисина,
Д.А. Шишкин, Е.Л. Чойнзонов
ФГБНУ Томский НИИ онкологии

Актуальность. Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) отличается долгим бессимптомным течением и высокой агрессивностью. Развитие ПРГШ в большом проценте случаев происходит на фоне диспластических изменений эпителия верхних дыхательных путей. Актуален поиск новых маркеров для ранней диагностики и прогноза течения этого заболевания.

Цель исследования — провести поиск кандидатных маркеров ранней диагностики и прогноза течения ПРГШ на основе протеомного анализа сыворотки крови больных ПРГШ.

Материалы и методы. Материалом для протеомного анализа явилась сыворотка крови 20 первичных больных ПРГШ (T1–4N0–3M0) и 10 здоровых добровольцев. Протеомный анализ осуществляли на базе института ТМЦ СО РАН (Новосибирск). Подтверждение результатов протеомного анализа проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) выбранного кандидатного маркера — аденилилциклаза-ассоциированного протеина 1 (CAP1) в сыворотке и ткани 46 первичных больных ПРГШ (T1–4N0–3M0), 12 пациентов с хроническим гиперпластическим ларингитом (ХГЛ)

и 15 здоровых добровольцев. Статистическую обработку выполняли с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты. Протеомный анализ сыворотки крови всех исследуемых групп выявил различия белковых бэндов в диапазоне масс 10–150 кДа. Анализ и сопоставление результатов работы с данными литературы позволили выделить в качестве кандидатного маркера для ранней диагностики и прогноза течения ПРГШ CAP1. Изучение содержания CAP1 в сыворотке крови методом ИФА показало достоверные различия во всех группах ($p = 0,008$). Содержание сывороточного CAP1 в группе пациентов с ХГЛ было в 2 раза выше, чем в группах здоровых лиц и больных ПРГШ стадии T1N0M0 ($p \leq 0,05$). Рост первичной опухоли сопровождался увеличением содержания сывороточного CAP1 ($p \leq 0,05$). В группе больных ПРГШ с лимфогенными метастазами содержание CAP1 в сыворотке крови было выше в 6 раз ($p \leq 0,01$) по отношению к группе пациентов без метастазов. Анализ содержания CAP1 в опухолевой ткани показал более сложную зависимость уровня маркера от стадии заболевания. Обнаружено значительное повышение уровня CAP1 в опухолевой ткани ПРГШ на стадии заболевания T1N0M0 по сравнению с группой ХГЛ и на стадиях T3–4N0M0 по сравнению с группой T2N0M0.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования определения CAP1 в сыворотке крови как для ранней диагностики, так и для прогноза течения и прогрессирования ПРГШ. Увеличение тканевого содержания CAP1 в группе T1N0M0 по сравнению с группой больных ХГЛ может иметь важное значение для ранней диагностики ПРГШ.

Скрининг биологической активности новых препаратов, предположительно блокирующих взаимодействие p53–MDM2

М.А. Калинина¹, Д.А. Скворцов², Я.А. Иваненков^{2,3},
С.В. Василевский², А.Г. Мажуга², О.А. Донцова^{2,4}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики;

²химический факультет ФГБОУ ВО

«МГУ им. М.В. Ломоносова»;

³Московский физико-технический институт, Долгопрудный;

⁴НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО

«МГУ им. М.В. Ломоносова»

Онкосупрессор p53 вовлечен во многие клеточные процессы, такие как арест клеточного цикла, репарация ДНК, апоптоз, старение. В здоровых клетках количество p53 тонко регулируется и поддерживается на низком уровне, в то время как при стрессе оно резко возрастает. Это достигается в том числе за счет того, что в норме p53 взаимодействует со своим негативным регулятором — E3-убиквитинлигазой MDM2. Низко-

молекулярные органические соединения могут конкурировать с p53 за связывание с MDM2. **Целью работы** была разработка высокопроизводительной системы тестирования и оценка новых соединений спирооксиндольного ряда на предмет способности реактивировать p53.

Была создана автоматизированная тест-система для оценки активации p53 и клеточной токсичности на основе станции автопипетирования Janus, МТТ-теста и любезно предоставленной П.М. Чумаковым клеточной линии с репортерной системой, экспрессирующей галактозидазу в ответ на активацию p53. Возможно параллельное скринирование клеточной токсичности и активации p53 с производительностью до 50 препаратов в день.

Протестировано 60 соединений спиротиогидантоинового ряда, синтезированных на кафедре органической химии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, для части из которых ранее было предсказано сродство к связыванию с MDM2 молекулярным докингом (Ivanenkov Y.A. et al., 2015). Три спиротиогидантоиновых производных (s400-0026, s400-0038 и NB-169) оказались активаторами p53. При этом действующая концентрация (приводящая к увеличению активности p53-зависимого репортера в 2 и более раз) всех лидерных соединений составила 27 мкМ, в то время как 50 % клеточная токсичность (IC₅₀) не достигалась даже при 133 мкМ. В результате анализа структуры этих соединений предложен ряд дальнейших направленных модификаций для усиления активирования p53.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 14-34-00017).

Экспрессия рецептора факторов роста эндотелия сосудов VEGFR3 в популяциях клеток множественной миеломы, различающихся по CD138: корреляции с прогнозом

**А.Ф. Карамышева, М.Н. Костюкова,
И.В. Буравцова, Н.Н. Тупицын**

*НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва*

Сигнальные системы, связанные с факторами роста эндотелия сосудов, играют важную роль в неоангиогенезе солидных опухолей. Менее исследована роль этих систем в развитии гемобластозов, в том числе множественной миеломы (ММ). В отличие от многих солидных опухолей, в которых одним из важных показателей неоангиогенеза является экспрессия VEGFR2 (KDR) — основного рецептора фактора роста VEGF-A, в плазматических клетках ММ этот рецептор экспрессирован редко. Наиболее активно в плазмацитах ММ

экспрессирован рецептор VEGFR3 и, соответственно, связанная с ним сигнальная система VEGF-C, -D/VEGFR3. Вместе с тем при исследовании экспрессии мРНК *VEGFC*, *VEGFD* и *VEGFR3* в мононуклеарной фракции аспиратов костного мозга больных ММ была выявлена группа пациентов, у которых экспрессия *VEGFR3* отсутствовала. Общая выживаемость в этой группе оказалась меньшей, чем у больных с коэкспрессией *VEGFC*, *VEGFD* и *VEGFR3* (медианы выживаемости составили соответственно 24 и 38 мес). Анализ плазматических клеток больных ММ с помощью проточной цитометрии показал, что *VEGFR3* активно экспрессируется в популяции CD138-положительных клеток и полностью отсутствует в клетках, негативных по CD138. Полученные нами данные о различиях в выживаемости больных ММ, различающихся по экспрессии мРНК *VEGFR3* и связанных с этим рецептором факторов роста, а также данные о корреляции экспрессии VEGFR3 и одного из основных маркеров плазматических клеток CD138 указывают на необходимость учета CD138-отрицательных клеток при анализе больных ММ.

МикроРНК и малые интерферирующие РНК – функционирование в опухоли и использование для разработки биомаркеров и средств терапии рака

**А.В. Карпунин¹, А.А. Алимов¹, А.А. Коротаева¹,
А.Ю. Кузванова¹, В.А. Хайленко², Т.А. Музаффарова¹,
Н.И. Поспехова¹, К.А. Музыкина¹, Е.Г. Зенит-Журавлева¹**

¹ФГБНУ МГНЦ, Москва;

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

Рассмотрены характеристики микроРНК и малых интерферирующих РНК (миРНК), особенности их функционирования в клетках злокачественных опухолей. Как и микроРНК, миРНК относятся к классу коротких не кодирующих белок РНК, имеют сходные с микроРНК размеры и биогенез. Коренное отличие заключается в высокой специфичности взаимодействия миРНК с мРНК гена-мишени, которое приводит к ее деградации. Это свойство обусловило использование искусственно синтезированных миРНК для изучения функционального значения генов и развития новых средств терапии. Пока не в полной мере охарактеризована картина функционирования микроРНК, их взаимодействия с генами, в том числе в клинически различных образцах опухоли одной локализации. В последнее время внимание исследователей все больше обращается к «неканоническим» формам функционирования микроРНК.

В экспериментальной работе проанализирована экспрессия набора микроРНК и генов, участвующих в прогрессии рака молочной железы (РМЖ). Результаты указывают на преобладание ко-транскрипционных процессов микроРНК и генов в опухолях молочной железы. Выявлено различие процессов, в которые вовлечены разные по характеру связи с экспрессией генов группы микроРНК при РМЖ, что может отражать функциональное значение ко-корреляции экспрессии микроРНК и генов. Найдены различия взаимодействия микроРНК и генов при метастатическом и неметастатическом РМЖ.

Проведено исследование по выявлению перспективных с точки зрения терапевтического эффекта геномишней миРНК для ингибирования их функции. Получены данные по функциональным характеристикам изучаемых генов в раковых клетках. Выявлены гены, блокирование которых с помощью миРНК позволяет достичь эффективного действия химиопрепарата при дозах приблизительно в 15 раз меньше стандартных или увеличить эффект низкой дозы примерно на порядок.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 14-04-32074.

Экспрессия гена *BCR-ABL* при миелопролиферативных заболеваниях

Л.А. Кесаева, А.В. Мисюрин, В.А. Мисюрин,
Ю.П. Финашутина, В.В. Тихонова, Н.А. Лыжко,
И.Н. Солдатов, А.А. Крутов

ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва

Введение. Значимым этапом в понимании молекулярного патогенеза миелопролиферативных заболеваний (МПЗ) стало обнаружение мутации *JAK2V617F*, делеции в 12-м экзоне гена *JAK2*, мутации *MPL W515L/K* и открытых позднее мутаций в гене *CALR*. Тем не менее остаются вопросы, касающиеся молекулярного механизма, лежащего в основе прогрессирования этой группы заболеваний. Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) относится к группе МПЗ. Мутации генов *JAK2* затрагивают регуляторные пути, зависящие от тирозинкиназной активности. Известные на сегодняшний день молекулярные механизмы патогенеза данной группы заболеваний связаны с гиперактивацией тирозинкиназ. Расшифровка этих механизмов началась с выявления при ХМЛ патогенетической роли химерного гена *BCR-ABL*, обладающего аномальной тирозинкиназной активностью. Мы предположили, что появление экспрессии гена *BCR-ABL* у больных МПЗ может свидетельствовать о прогрессии данных заболеваний.

Цель работы — изучение экспрессии гена *BCR-ABL* у больных МПЗ с явными признаками прогрессии,

которые проявлялись в недостаточном ответе на проводимую терапию, гепатоспленомегалии, высоких показателях при проведении морфологического анализа крови, а также выраженном миелофиброзе.

Материалы и методы. Качественное и количественное определение гена *BCR-ABL* (типы транскриптов p190, p210, p230) проводили с помощью двустадийной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в реальном времени; определение мутаций *JAK2*, *JAK-e12*, *MPL* — с помощью прямого секвенирования, аллель-специфичной ПЦР. В качестве биологического материала использовали кровь и костный мозг.

Результаты и обсуждение. Проанализированы 175 больных МПЗ с признаками прогрессии: 35 (20 %) — истинная полицитемия (ИП), 38 (22 %) — эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), 102 (58 %) — идиопатический миелофиброз (ИМФ). Экспрессия гена *BCR-ABL* выявлена у 47 (27 %) из 175 больных МПЗ: в 44 случаях — *BCR-ABL* (p210), в 3 — *BCR-ABL* (p190); *BCR-ABL* (p230) найден не был. Мутация *JAK2V617F* обнаружена у 139 пациентов, делеции в 12-м экзоне гена *JAK2* — у 2, мутация *MPL W515L* — в 1 случае.

В группе первичных больных МПЗ ($n = 67$; 26 (47 %) — ИП, 21 (38 %) — ЭТ, 8 (15 %) — ИМФ) мутация *JAK2V617F* была найдена в 55 (82 %) случаях; экспрессия гена *BCR-ABL* (p210) выявлена только у 2 (3,6 %) из 55 пациентов.

Таким образом, экспрессия гена *BCR-ABL* (p210) у больных МПЗ с признаками прогрессии — явление достаточно частое (27 %; $p = 0,0002$).

Оценка позднего эффекта воздействия фотемустина на клетки глиобластомы T98G

Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, Н.Л. Вартанян,
М.П. Самойлович

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России, Санкт-Петербург

Целью исследования была оценка поздних эффектов воздействия фотемустина, производного нитрозомочевина, на клетки мультиформной глиобластомы линии T98G.

Клеточную культуру T98G в логарифмической фазе роста инкубировали в течение 1 ч в среде, содержащей фотемустин в концентрациях 100–750 мкг/мл. После удаления препарата каждые 2–3 дня проводили замену ростовой среды. Клетки, возобновившие пролиферацию после первого действия препарата, пересевали, а затем повторно инкубировали с фотемустином. В течение 1,5 мес оценивали состояние клеточных культур, определяли дозы фотемустина, вызывающие прекращение пролиферации. Через 16–30 дней после инкубации в клетках определяли экспрессию генов ростовых факторов.

Первичное воздействие фотемустина в концентрации от 200 мкг/мл и выше останавливало пролиферацию клеток, в культуре оставались переживающие клетки, которые сохраняли жизнеспособность более 1,5 мес. После инкубации клеток с фотемустинном в концентрации 100 мкг/мл оставалась популяция резистентных, возобновлявших пролиферацию клеток. Резистентные клетки сохраняли способность к пролиферации после повторной обработки фотемустинном в концентрации 300 мкг/мл. При увеличении его концентрации до 400 мкг/мл в культуре оставались только переживающие клетки. После инкубации с фотемустинном в клетках была многократно увеличена экспрессия генов *TNC*, *FAP*, *HGF* и *FGF-2* (b). Уровень экспрессии названных генов находился в прямой зависимости от концентрации фотемустина, как после первичного, так и после повторного воздействия препарата. В переживающих клетках, сохранившихся после воздействия 400 мкг/мл фотемустина, экспрессия этих генов была выше, чем в пролиферирующих клетках после его действия в концентрациях 100 или 200 мкг/мл.

В результате исследования одно- и двукратного действия фотемустина на культивируемые клетки линии T98G было установлено, что: 1) популяция мультиформной глиобластомы гетерогенна и включает клетки, которые прекращают пролиферацию, но длительное время остаются жизнеспособными, а также резистентные клетки, которые возобновляют пролиферацию; 2) каждая обработка клеток фотемустинном приводит к возрастанию их резистентности к следующему действию препарата; 3) как пролиферирующие, так и переживающие клетки экспрессируют гены ростовых факторов, при этом уровень их экспрессии находится в прямой зависимости от концентрации фотемустина.

Соотношение факторов активации лимфоцитов и показателей апоптоза в периферической крови больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями III степени и микроинвазивным раком шейки матки

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

ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

Рак шейки матки (РШМ) развивается как результат вируса папилломы человека (ВПЧ) и сопровождается активацией иммунных механизмов. Выяснение изменений между процессами активации и подавления Т-клеточного звена иммунитета может определять

риск развития РШМ и тактику дальнейшей комплексной терапии.

Материалы и методы. Изучали уровень экспрессии CD95 и активности каспаз, содержание регуляторных Т-клеток в крови больных с ВПЧ, цервикальными интраэпителиальными неоплазиями (ЦИН) и ранними стадиями РШМ. Исследованы образцы периферической крови 155 пациенток с ДНК ВПЧ (95,6 %), в том числе 110 — с ЦИН III степени и 45 — с плоскоклеточным РШМ IA1 стадии. Контрольную группу составили 30 здоровых женщин (без ВПЧ и патологии шейки матки). Иммунофенотипирование лимфоцитов крови проводили методом проточной цитофлуориметрии; определение активности каспаз-3, -6, -8 и -9 — спектрофлуориметрическим методом с использованием AFC-меченных тетрапептидных субстратов (BioRad, США).

Результаты. Проанализирована численность лимфоцитов с фенотипами CD95⁺, CD3⁺95^{+/high}, CD3⁺4⁺95^{+/high}, CD3⁺8⁺95^{+/high}. Выявлено повышение экспрессии CD95 в суммарной фракции лимфоцитов крови больных ЦИН и микроинвазивным РШМ ($p < 0,05$) и увеличение CD3⁺95^{+/high} Т-клеток (эффекторов) и CD3⁺4⁺95^{+/high} Т-хелперов ($p < 0,05$), в сравнении с группой контроля. В популяции Т-киллеров изменений не выявлено. Количество CD25-позитивных Т-лимфоцитов в крови больных было выше ($p < 0,05$); их идентифицировали по фенотипам CD4⁺25^{+/high} и CD4⁺25⁺127^{dim/neg}FoxP3⁺ ($p < 0,05$). Обнаружено увеличение активности CD95-регулируемой каспазы-8 и эффекторной каспазы-3 в лимфоцитарной фракции больных ЦИН и РШМ. Увеличение активности каспазы-6 наблюдали в 25 % случаев ЦИН и в большинстве случаев РШМ IA1 стадии. Для каспазы-9 показано снижение активности.

Выводы. Развитие РШМ на самых ранних этапах сопровождается увеличением экспрессии активационных Т-маркеров и одновременным повышением уровня апоптоза лимфоцитов и численности регуляторных Т-клеток.

Работа выполнена при поддержке грантов № НК-1404-32098 (РФФИ), № 11.G34.31.0052 (Постановление 220), Программы стратегического развития ПетрГУ на 2012–2016 гг. и госзадания в сфере научной деятельности № 1713.

Фенотипические особенности лимфоцитов периферической крови у больных преинвазивным раком шейки матки

П.И. Ковчур, Л.И. Белова, О.В. Курмышкина, Т.О. Волкова
ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

Изучение показателей клеточного иммунитета служит для оценки иммунного статуса пациентки, определения индивидуальных рисков и оптимизации методов лечения. **Цель работы** — изучить изменения содержания регуляторных CD4⁺/8⁺-Т-лимфоцитов, субпопуляций естественных киллеров (ЕК), ЕК-Т-лимфоцитов в периферической крови пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями III степени (ЦИН 3) в сравнении с группой здоровых доноров.

Материалы и методы. Изучены образцы крови 35 пациенток с ЦИН 3 (100 % — с ДНК ВПЧ) в сравнении с образцами крови здоровых женщин (без ВПЧ и патологии шейки матки). Иммунофенотипирование лимфоцитов крови проводилось методом проточной цитофлуориметрии на приборе MACSQuant (Германия): CD3⁺ (Т-лимфоциты), CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперы), CD3⁺CD8⁺ (Т-киллеры), CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/neg}, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (регуляторные Т-хелперы), CD8⁺CD25⁺, CD8⁺CD25⁺CD127^{dim/neg}, CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ (регуляторные Т-киллеры), CD3⁺CD16⁺, CD3⁺CD56⁺, CD3⁺(CD16⁺/-)CD56^{bright}, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16^{low/neg}CD56⁺ (субпопуляции ЕК-клеток), CD3⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (ЕК-Т-лимфоциты).

Результаты. В крови больных с ЦИН 3 достоверно повышается численность CD4⁺CD25⁺-лимфоцитов, в том числе фракций CD4⁺CD25^{high} и CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/neg}, относительно группы контроля. Численность CD4⁺FoxP3⁺-лимфоцитов достоверно не различалась. Отмечена тенденция к повышению численности регуляторных CD8⁺-Т-клеток (CD8⁺CD25⁺CD127^{dim/neg}FoxP3⁺) в группе ЦИН 3. Достоверных изменений в содержании цитотоксических ЕК и других функциональных групп ЕК-клеток при ЦИН 3 обнаружено не было, в то же время установлено увеличение численности ЕК-Т-лимфоцитов. Общая численность CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперов) и CD3⁺CD8⁺ (Т-киллеров) была сопоставима между анализируемыми группами.

Выводы. Развитие РШМ на самых ранних этапах сопровождается увеличением численности регуляторных Т-лимфоцитов и ЕК-Т-клеток, обладающих иммуносупрессорными свойствами.

Работа выполнена при поддержке грантов
№ НК-1404-32098 (РФФИ), № 11.G34.31.0052
(Постановление 220),

Программы стратегического развития ПетрГУ
на 2012–2016 гг. и госзадания на НИР.

Экспрессия генов раннего ответа в опухолевой ткани при развитии цервикальных интраэпителиальных неоплазий и рака шейки матки

П.И. Ковчур, О.В. Курмышкина, Л.Л. Белова, Т.О. Волкова
ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

Перспективными маркерами и мишенями ранних стадий развития рака шейки матки (РШМ) являются транскрипционные факторы c-Myc, c-Fos и c-Jun, входящие в состав генома человека — генов раннего ответа. Гены *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* рассматривают как протоонкогены, и изменение их экспрессии является одним из центральных событий канцерогенеза. **Цель исследования** — изучить экспрессию генов *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* в опухолевой ткани больных РШМ в зависимости от степени тяжести процесса.

Материалы и методы. Экспрессию генов анализировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, идентификацию белков проводили вестерн-блоттингом с использованием мышиных моноклональных антител. Обследованы 130 пациенток в возрасте от 20 до 69 лет (средний возраст — 45,3 ± 3,2 года): 55 — с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями III степени (ЦИН 3) (дисплазия тяжелой степени — 25, карцинома *in situ* — 30), 30 — с РШМ I стадии, 25 — II стадии, 20 — III–IV стадии. Контролем служили 30 здоровых женщин (без вируса папилломы человека и патологии шейки матки).

Результаты. Выявлены достоверные изменения экспрессии в опухолевой ткани для гена *c-fos*. Увеличение уровня экспрессии мРНК данного гена наблюдалось в 50 % образцов ткани ЦИН 3 и 100 % образцов микроинвазивного РШМ в сравнении с образцами нормального эпителия и резко увеличивалось в образцах РШМ III–IV стадии. Индукция экспрессии мРНК гена *c-myc* наблюдалась в 55 % случаев РШМ IA стадии; в 45 % образцов РШМ IA стадии отмечено незначительное подавление экспрессии *c-myc*. В 70 % образцов ЦИН 3 отсутствовали изменения уровня мРНК *c-myc* в сравнении с соответствующим контролем. Начиная с I стадии РШМ и далее наблюдается резкое повышение экспрессии *c-myc*. Для гена *c-jun* выявлена активация экспрессии мРНК при ЦИН 3 и РШМ I–IV стадий, но в значительно меньшей степени ($p > 0,05$). Результаты блот-анализа уровня экспрессии *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* при ЦИН 3 и микроинвазивном РШМ подтверждают результаты оценки экспрессии мРНК этих генов.

Выводы. Гены *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* определяют индивидуальный профиль их экспрессии при развитии РШМ и могут рассматриваться в качестве дополнительного диагностического маркера, что имеет значение при выборе тактики лечения.

Работа выполнена при поддержке грантов
№ НК-1404-32098 (РФФИ), № 11.G34.31.0052

(Постановление 220), Программы стратегического развития ПетрГУ на 2012–2016 гг. и госзадания в сфере научной деятельности № 1713.

Молекулярно-генетические и иммунологические особенности преинвазивного и микроинвазивного рака шейки матки до и после лечения

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

ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

Развитие рака шейки матки в каждом индивидуальном случае определяется молекулярно-генетическим профилем опухоли и возможностями иммунной системы элиминировать вирус-инфицированные и злокачественно перерожденные клетки. Цель исследования — оценить экспрессию лимфоцитарных маркеров CD3, CD4, CD4⁺CD25⁺, CD8, CD16, CD95 и предрасположенности их к апоптозу по уровню экспрессии генов каспаз-3, -6, -8, -9 в клетках цервикального эпителия и лейкоцитах крови у пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями III степени (ЦИН 3) и микроинвазивным раком шейки матки (РШМ) до и через 1 и 3 мес после лечения.

Материалы и методы. Выделено 3 группы. В основную вошли 120 пациенток: 75 — с ЦИН 3 (средний возраст $32,9 \pm 7,4$ года) и 45 — с РШМ IA1 стадии (средний возраст $31,3 \pm 6,0$ года) с выявленной ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) в 95,6 %. В этой группе проведено хирургическое и вторым этапом — иммуномодулирующее лечение (Аллокин-альфа 1,0 мг 6 раз через день подкожно). Контрольную группу 1 составили 30 больных с ЦИН 3 и РШМ IA1 стадии, которым проводилось только хирургическое лечение (с ДНК ВПЧ в 100 %); контрольную группу 2 — 45 здоровых женщин (без ВПЧ и без патологии шейки матки).

Результаты. Показано, что при комплексном лечении в течение 3 мес происходит более эффективная нормализация численности НК-клеток, В-лимфоцитов, популяции Т-хелперов, регуляторных Т-клеток, супрессорного цитокина TGF- β 1 и FOXP3 в циркулирующих лимфоцитах в сравнении с только хирургическим лечением. Показано восстановление уровня экспрессии CD95 ($p < 0,05$) и активности каспаз-3, -6, -8 и -9 в циркулирующих лимфоцитах больных ЦИН 3 и микроинвазивным РШМ ($p < 0,05$). Отмечено снижение ВПЧ-позитивных пациенток в основной группе (1,7 %) и отсутствие онкобелка E7 в сравнении с контролем ($p < 0,01$). В контрольной группе 1 зафиксирована тенденция к постепенному восстановлению нормальных значений показателей клеточного иммунитета в течение 3 мес. Использование в монотерапии иммуно-

модулирующего препарата без хирургического компонента у больных с преинвазивным РШМ не приводило к изменению уровня экспрессии TGF- β 1 и FOXP3.

Выводы. Обоснована целесообразность применения иммунологических и молекулярно-генетических исследований в комплексной диагностике, оценке результатов лечения и мониторинге больных с РШМ.

Работа выполнена при поддержке грантов № НК-1404-32098 (РФФИ), № 11.G34.31.0052 (Постановление 220), Программы стратегического развития ПетрГУ на 2012–2016 гг. и госзадания в сфере научной деятельности № 1713.

Молекулярные маркеры в диагностике рака щитовидной железы

Н.Н. Колесников¹, С.Е. Титов^{1,2}, Е.С. Малахина³, Т.Л. Полоз⁴, М.К. Иванов², Л.Г. Ахмерова¹, Ю.А. Верякина¹, С.П. Шевченко⁵, П.С. Деменков⁶, А.В. Малек⁷, И.Ф. Жимулев¹

¹ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», Новосибирск;

²ЗАО «Вектор-Бест», Кольцово;

³ИХБФМ СО РАН, Новосибирск;

⁴НУЗ «Дорожная клиническая больница на станции Новосибирск-Главный», ОАО «РЖД»;

⁵МБУЗ «Городская клиническая больница № 1», Новосибирск;

⁶Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

⁷ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Разработка подходов и поиск молекулярных маркеров для ранней и дифференциальной диагностики новообразований щитовидной железы составляет суть наших исследований. В работе использованы технологические платформы: Q-RT-PCR, Nanostring, ddPCR. Ранее нами была показана принципиальная возможность использования микроРНК и соматических мутаций *BRAF* и *RET/PTC* в качестве молекулярных маркеров (патент РФ № 2548773, приоритет от 17.02.2014) на операционном материале. В настоящей работе мы разработали подход экстракции нуклеиновых кислот (РНК и ДНК) с материала уже проанализированных цитологических препаратов, полученных после тонкоигльной аспирационной биопсии (ТАБ). Это позволило с одного препарата получить цитологический анализ, провести тестирование профиля экспрессии специфических микроРНК и тест на наличие/отсутствие соматических мутаций генов *BRAF*, *RET/PTC*, анализ экспрессии онкогена *HMG2*. Подобный анализ увеличил вероятность выявления папиллярной карциномы до 99,9 %, позволил дифференцировать ее от медуллярной карциномы. Несомненными преимуществами предлагаемого подхода являются отсутствие дополнительных затрат на взятие биологическо-

го материала, возможность сопоставления заключения цитологического исследования с результатами молекулярного анализа и, как следствие, более полная информация о характере узлового образования, повышение точности ТАБ как метода диагностики новообразований щитовидной железы и определения более обоснованной тактики ведения больного на дооперационном этапе.

Работа поддержана грантами по Программе фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» (ФИМТ-2014-094) и Программе «Фундаментальные науки медицине» (ФНМ-08).

Механизмы гибели клеток хронического миелоидного лейкоза при действии PF-114, нового ингибитора тирозинкиназы BCR-ABL

Е.С. Колотова¹, В.В. Татарский (мл.)¹, А.А. Зейфман^{2,3},
О.В. Строганов^{2,3}, В.С. Стройлов^{2,3}, И.Ю. Титов^{2,3},
Ф.Н. Новиков^{2,3}, А.А. Калинина¹, Г.Г. Чиров², А.А. Штиль¹

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

²ФГБУН «Институт органической химии

им. Н.Д. Зелинского РАН», Москва;

³ООО «Фьюжн Фарма», Москва

Одна из проблем лечения больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) — мутации в химерной тирозинкиназе BCR-ABL, обуславливающие резистентность к ингибиторам I–II поколений. Разработанный нами ингибитор BCR-ABL III поколения PF-114 в доклинических исследованиях показал эффективность при ХМЛ с наиболее частой мутацией T315I и существенно более селективное ингибирование протеинкиназ по сравнению с одобренным FDA понатинобом, а также повышенную безопасность.

Соединение PF-114 высокоактивно для BCR-ABL⁺-клеток: гибель клеток линии K562 отмечена при действии наномолярных или даже субнаномолярных концентраций PF-114. Напротив, для BCR-ABL-негативных лейкозов PF-114 значительно менее активен. Изучение зависимости гибели клеток K562 от времени инкубации с PF-114 показало, что цитотоксический эффект развивается относительно медленно: через 72 ч сохраняется примерно 30 % жизнеспособных клеток. Гибель всей популяции наступает через 4–5 сут; этому предшествует задержка клеточного цикла в фазе G1. Важнейшим субстратом фосфорилирования BCR-ABL является адаптерный белок CrkL, контролирующий передачу внутриклеточных сигналов. Результаты проточной цитофлуориметрии показали, что после инкубации клеток K562 с PF-114 в течение 2 ч относительное содержание клеток с фос-

форилированным CrkL снижалось с увеличением концентрации соединения. Однако цитотоксический эффект проявляется при более низких концентрациях PF-114, чем требуемые для ингибирования фосфорилирования CrkL. Методом иммуноблоттинга определено влияние PF-114 на активацию каспаз-3 и -9, а также расщепление поли(АДФ-рибоза)полимеразы. Действие PF-114 сопровождается изменениями фосфорилирования белков семейства STAT и митоген-активируемых протеинкиназ. Таким образом, высокая специфичность к патогенетически важной внутриклеточной мишени, преимущественная токсичность для клеток ХМЛ, способность подавлять мутантные формы BCR-ABL, а также благоприятные фармакологические характеристики обуславливают перспективность создания нового препарата для лечения ХМЛ на основе соединения PF-114.

Система детекции минимальной остаточной болезни при онкогематологических заболеваниях человека на основе технологий массированного секвенирования

А.Ю. Комков, А.А. Минервина, В.И. Назаров,
И.З. Мамедов, Ю.Б. Лебедев

ФГБУН «Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина

и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Минимальная остаточная болезнь (МОБ) является одним из основных показателей эффективности терапии онкогематологических заболеваний. Наиболее чувствительными системами для анализа МОБ в настоящее время являются системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Однако ввиду трудоемкости дизайна клон-специфических флуоресцентных проб, а также неуниверсальности протокола анализа эти системы требуют существенных затрат времени, что в условиях терапии быстроразвивающихся заболеваний имеет критическое значение. Альтернативой ПЦР в реальном времени являются технологии массированного секвенирования (NGS), которые позволяют не только удешевить и стандартизировать процедуру диагностики МОБ, но также повысить чувствительность и точность анализа. Настоящее исследование направлено на разработку системы высокочувствительной диагностики МОБ при онкогематологических заболеваниях на основе технологий NGS. Данная система предполагает проведение 3-ступенчатого анализа: 1) поиск маркеров опухолевых клеток; 2) проверка информативности выявленных маркеров; 3) количественный анализ представленности

опухолевого клона среди нормальных клеток костного мозга после терапии. Поиск маркеров опухолевого клона проводится в ДНК костного мозга до терапии в ходе мультиплексных ПЦР локусов Т- и В-клеточных рецепторов с последующим секвенированием ПЦР-продуктов по Сэнгеру для установления полной структуры V(D)J-перестроек. После статистической проверки наиболее информативные V(D)J-перестройки используются для количественного анализа оставшегося опухолевого клона. Методический подход для этого анализа базируется на секвенировании на платформе Illumina локусов Т- и В-клеточных рецепторов (имеющих соответствующие V- и J-гены) в ДНК костного мозга после терапии. При этом на стадии пробоподготовки в анализируемые фрагменты ДНК вводятся случайные нуклеотидные последовательности. В результате каждая целевая молекула из каждой клетки получает уникальный молекулярный идентификатор, подсчет которых после NGS дает возможность отсеять все шумы и точно оценить размер опухолевого клона в анализируемом образце.

Работа поддержана Минобрнауки России (грант № RFMEFI60414X0118).

Разработка технологии персонализированного назначения неоадъювантной химиотерапии больным раком молочной железы

Н.В. Литвяков^{1,2}, П.В. Казанцева¹, М.М. Цыганов^{1,2},
Е.М. Слонимская¹, Н.В. Чердынцева^{1,2}

¹ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Цель — разработать технологию персонализированного назначения больным раком молочной железы (РМЖ) неоадъювантной химиотерапии (НАХТ) для повышения ее эффективности.

Материалы и методы. На 1-м, ретроспективном этапе было обследовано 68 больных РМЖ (лечившихся в 2006–2010 гг.), которым проводили НАХТ по схемам FAC, CAH или таксотер. Эффективность НАХТ оценивали по критериям ВОЗ. ДНК и РНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани до лечения. Микроматричный анализ CNV (Copy Number Variation) проводили на ДНК-чипах CytoScan™ HD Array (Affymetrix, USA). С помощью количественной полимеразной цепной реакции оценивали экспрессию ABC-транспортеров и генов монорезистентности. На 2-м этапе клинически валидировали разработанную технологию. Проспективную группу составили 34 пациента с люминальным В РМЖ, которым НАХТ персонализированно назначалась по результатам микроматричного анализа ДНК биопсийного материала опухоли до лечения.

Результаты. На 1-м этапе исследования были идентифицированы маркеры ожидаемой эффективности НАХТ, которые позволяют определить целесообразность ее проведения, а также маркеры ответа опухоли на отдельные химиопрепараты. При делеции хотя бы одного из локусов генов ABC (*ABCB5* — 3q27, *ABCG2* — 4q22.1, *ABCB3* — 6p21.32, *ABCB1* — 7q21.1, *ABCC1* — 16p11.2, *MVP* — 16p13.1) не формировался фенотип лекарственной устойчивости и отмечался 85–100 % эффект НАХТ. Больные с CNV локусов 1q43, 11q22.1–23.3 или 18p11.21 отвечали, а у пациентов с нормальным состоянием этих локусов отсутствовал ответ на НАХТ ($p = 0,000005–0,0004$). Амплификация локуса гена *TOP2A* — 17q21.2 обуславливала ответ на антрациклины. Делеция локуса гена *TUBB3* — 16q24.3 определяла ответ на таксотер у 67 % пациентов. Делеция локуса гена *BRCA1* — 17q21.31 в опухоли молочной железы отмечалась у 37 % больных, и они хорошо отвечали на FAC и CAH (75 %), но не на таксотер. Делеция локуса гена *TYMS* — 18p11.32 в 100 % случаев была сопряжена с ответом на кселоду (CAH) и в 88 % — на фторурацил (FAC). На основе этих данных была разработана технология персонализированного назначения НАХТ больным РМЖ. До начала НАХТ проводят микроматричное исследование ДНК биопсийного материала для определения выявленных маркеров ожидаемой эффективности НАХТ, и при наличии хотя бы одного из маркеров пациенты начинают лечение с курсов НАХТ (в противном случае назначается операция), схема НАХТ также подбирается индивидуально. При амплификации гена *TOP2A* назначаются антрациклины (FAC или CAH), а таксаны противопоказаны. При делеции *TYMS* назначается CAH, а не FAC. При делеции *TUBB3* назначаются таксаны, при амплификации *HER2* — герцептин, при делеции *BRCA1* — препараты платины, а таксаны противопоказаны. По результатам клинической валидации эффективность НАХТ в группе с персонализированным назначением составила 88 % против 45 % в группе исторического контроля.

Работа поддержана РФФИ (грант № 15-04-03091).

Нарушение частоты генов AURKA и TP53 у больных местно-распространенным раком желудка

Г.Ф. Михайлова, В.В. Цепенко,
В.Ю. Скоропад, С.А. Мозеров

МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИРЦ
Минздрава России, Обнинск

Введение. В структуре смертности от злокачественных опухолей рак желудка (РЖ) занимает 2-е место. Основным и, как правило, единственным методом лечения РЖ является хирургический. Однако радикальность большинства операций, особенно при ле-

чении местно-распространенных форм, носит условный характер, что отражается в неудовлетворительных отдаленных результатах лечения. Несмотря на значительное количество опубликованных исследований, в том числе рандомизированных, до настоящего времени отсутствует единое мнение о выборе оптимальных показаний и этапности проведения адъювантной терапии у больных РЖ.

Цель работы — изучение прогностической роли динамики генов *AURKA* и *TP53* у больных местно-распространенным РЖ до и после неoadъювантной химиолучевой терапии.

Материалы и методы. Объектом ретроспективного исследования были образцы биопсии опухолевой ткани и операционного материала после проведения неoadъювантной химиолучевой терапии (суммарная очаговая доза 45 Гр на фоне химиотерапии CapOX) 11 больных местно-распространенным РЖ. В работе использованы метод интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) и коммерческие ДНК-пробы *AURKA* и *TP53* (Vysis, США).

Результаты. Среднее количество копий генов *AURKA* и *TP53* на aberrантную клетку в биопсийном материале колебалось в пределах 1,36–6,03 и 0,99–4,52; в операционном — 1,14–7,72 и 1,4–3,76 соответственно. У 6 больных среднее число копий генов *AURKA* и *TP53* на aberrантную клетку в операционном материале достоверно снизилось по сравнению с биопсийным материалом. У 5 пациентов данный показатель либо увеличился, либо остался на прежнем уровне: у 3 больных это выявлено одновременно для генов *AURKA* и *TP53*, у 1 — только для гена *AURKA* и у 1 — для гена *TP53*. У 4 из этих 5 пациентов при последующем наблюдении были выявлены метастазы, причем у 3 больных с увеличением частоты гена *TP53* метастазы развились через 6–8 мес, а у 1 больного с увеличением частоты гена *AURKA* — через 26 мес.

Закключение. Предварительные результаты исследования динамики изменений частоты генов *AURKA* и *TP53* у больных местно-распространенным РЖ до и после неoadъювантной химиолучевой терапии показали потенциальную возможность выявления подгруппы больных, у которых высока вероятность развития рецидивов и метастазов.

Шапероны нуклеолин и нуклеофозмин как потенциальные мишени для противоопухолевой терапии

Д.А. Понкратова¹, А.А. Лушникова¹,
Л.Ф. Морозова¹, С.М. Андреев², Д.Д. Пургина²,
И.С. Абрамов¹, А.В. Балбуцкий¹, И.В. Цыганова¹,
Н.Н. Мазуренко¹, М.Р. Хаитов²

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

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

Нуклеофозмин (В23) и нуклеолин (С23) — многофункциональные фосфопротеины, играющие ключевую роль в регуляции клеточного цикла, биогенеза рибосом, транскрипции и трансляции, в молекулярном транспорте и сигналинге. Эти шапероны служат маркерами клеточной пролиферации и прогрессии целого ряда неоплазий и рассматриваются как возможные мишени для терапии опухолей, в которых выявлена гиперэкспрессия С23/В23. Для этой цели перспективны катионные пептиды (КП) — малотоксичные, устойчивые к внутриклеточной деградации молекулы, способные проникать в клетки и индуцировать апоптоз. **Целью** нашей работы было изучение противоопухолевой активности некоторых КП *in vitro*.

Материалы и методы. Динамику клеточной пролиферации и токсичность КП исследовали на перевиваемых линиях клеток меланомы кожи (МК) человека mH 275 и mIS 223 и на нетрансформированных фибробластах человека перевиваемой линии H1036 (любезно предоставлены д.б.н. А.Ю. Александровой, РОНЦ им. Н.Н. Блохина). Структуру и экспрессию генов *NCL/NPM*, кодирующих С23/В23, анализировали с помощью специфичных полимеразных цепных реакций (ПЦР) на матрице ДНК культивируемых клеток с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле и ПЦР с обратной транскрипцией на матрице мРНК клеток; мутации онкогенов *BRAF* и *NRAS* — методом ПЦР с последующим секвенированием ампликонов; мутации гена *TP53* — с помощью секвенирования 5–10-го экзонов этого гена, амплифицированных на микрочипе.

Результаты. ПЦР-анализ выявил в обеих клеточных линиях МК мутации *BRAF V600E* (экзон 15) в сочетании с полиморфными вариантами генов *NCL/NPM*. Мутаций в гене *TP53* не обнаружено. Уровень экспрессии гена *NCL* до инкубации клеток МК с пептидами был в 8,5 раза выше, чем в нормальных клетках, гена *TP53* — в 2,8 раза ниже. После 3-суточной инкубации уровень экспрессии *NCL* резко упал, *TP53* — вырос в 2,5 раза. Один из возможных механизмов избирательной цитотоксичности КП — их взаимодействие с молекулами С23/В23 после внутриклеточного транспорта КП и последующая активация *p53*.

Выводы. На модельных клеточных линиях МК человека выявлена избирательная цитотоксическая активность *in vitro* ряда КП с дендримерной структурой, исследуются механизмы их противоопухолевой активности.

Использование таргетного секвенирования в диагностике наследственных форм злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта

Л.Н. Любченко¹, М.Г. Филиппова¹, И.С. Абрамов^{1,2},
А.В. Семьянихина¹, Т.С. Дубровина¹, Т.В. Наседкина²,
Ю.И. Патютко¹, А.О. Расулов¹, М.М. Давыдов¹

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

²ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Введение. Существует ряд наследственных заболеваний, при которых риск развития злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) значительно превышает общепопуляционный. Этиологическим фактором являются герминальные мутации в генах-супрессорах. Так, наследственный неполипозный колоректальный рак (синдром Линча) ассоциирован с мутациями в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* и *PMS2*, семейный аденоматозный полипоз — в гене *APC*, а МУН-ассоциированный полипоз — с мутациями в гене *MUTYH*.

Материалы и методы. В целях оценки вклада герминальных мутаций и полиморфных вариантов в генах *APC*, *MLH1*, *PMS2*, *PMS1*, *MSH2*, *TP53*, *MSH6*, *CDH1*, *BMPRIA*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MUTYH*, *PTEN*, *SMAD4*, *STK11* было проведено молекулярно-генетическое исследование геномной ДНК 36 пациентов со злокачественными новообразованиями ЖКТ. Отягощенный семейный анамнез отмечался в 90 % случаев. Отбор целевой последовательности проводили с помощью технологии жидких чипов NimbleGen Sequence Capture. Библиотека зондов включала 2,1 млн олигонуклеотидов длиной 50–105 нуклеотидов, комплементарных кодирующим участкам исследуемых генов. Секвенирование проводили на платформе GS Junior (454/Roche).

Результаты. Выявлено 50 полиморфизмов и мутаций, включая описанные ранее патогенные варианты. Редкие варианты были представлены синонимичными заменами (p.Tyr214= в гене *MSH6*, p.Asn751= в гене *CDH1*), миссенс-мутациями (p.Gly256Asp в гене *MSH2*, p.Val22Met в гене *MUTYH*, p.Thr511Ala в гене *PMS2*, p.Ile157Thr в гене *CHEK2*). Также выявлены нонсенс-мутации, приводящие к формированию преждевременного стоп-кодона (p.Gln816Ter, p.Arg406Ter, p.eu744Ter в гене *MSH2*). Данные NGS были подтверждены с использованием метода секвенирования по Сэнгеру.

Выводы. Высокопроизводительное секвенирование является эффективным методом выявления герминальных мутаций и может быть применено в диагностике наследственных форм злокачественных новообразований ЖКТ в рутинной клинической практике.

Высокопроизводительный поиск ингибиторов синтеза белка – эффективный способ обнаружения новых противоопухолевых препаратов

И.А. Остерман¹, Е.С. Андреянова², Д.А. Скворцов¹,
Ф.И. Плетнев¹, Е.И. Марусич³,
М.С. Веселов³, С.В. Леонов³, Я.А. Иваненков³,
П.В. Сергиев¹, О.А. Донцова^{1,4}

¹Химический факультет;

²факультет биоинженерии и биоинформатики
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»;

³Московский физико-технический институт, Долгопрудный;

⁴НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»

Уровень синтеза белка в раковых клетках в большинстве случаев повышен по сравнению с нераковыми, так как для быстрого деления необходимо большое количество новых белков. В связи с этим разработка эффективных ингибиторов трансляции, особенно специфически активных в отношении раковых клеток, представляется крайне актуальной задачей современной биомедицины.

Разработана репортерная система, позволяющая в высокопроизводительном формате анализировать механизм действия новых противоопухолевых препаратов. Репортер основан на 2 флуоресцентных белках, экспрессия одного из них остается на постоянном уровне, а количество второго увеличивается в присутствии ингибиторов синтеза белка. Первичный скрининг проводился на бактериальном репортерном штамме, так как это позволяет быстро проанализировать большое количество образцов. Таким образом проверено около 10 тыс. соединений и отобрано несколько десятков потенциальных кандидатов. Затем проанализирована эффективность подавления синтеза белка в модельной *in vitro* реакции, а также оценено влияние этих соединений на ингибирование роста клеточной линии НЕК293Т. Вещества, для которых был подтвержден механизм действия и показана токсичность в отношении эукариотических клеток, отобраны для дальнейшего анализа. Для них проанализирована токсичность уже относительно нескольких клеточных линий — 2 модельных раковых (A549 и MCF7) и 2 модельных нераковых (НЕК293Т и VA13). Соединения, продемонстрировавшие большую эффективность в подавлении роста раковых клеток по сравнению с нера-

ковыми, могут рассматриваться как потенциальные противоопухолевые препараты.

Поиск ассоциации полиморфных локусов генов *VEGF*, *VCAM1* с риском развития рака мочевого пузыря

В.Н. Павлов¹, С.М. Измайлова¹, Л.З. Ахмадишина²,
А.А. Измайлов¹, Т.В. Викторова^{1,2}

¹ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

²ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН

Введение. В патогенезе злокачественных новообразований, в том числе и рака мочевого пузыря (РМП), значительную роль играют специфические факторы роста клеток. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) вовлечен в процесс новообразования сосудов в растущей опухоли. VEGF секретируется опухолевыми клетками, стимулирует экспрессию молекул межклеточной адгезии 1-го типа (ICAM1) и молекул адгезии клеток сосудистого эндотелия 1 типа (VCAM-1) в эндотелиальных клетках. Высокая экспрессия VEGF характеризует интенсивность роста и большой метастатический потенциал опухоли.

Целью исследования был анализ ассоциации полиморфного локуса –25491/D гена *VEGF*, интронного rs3917010 гена *VCAM* с риском развития РМП.

Материалы и методы. Проведен молекулярно-генетический анализ образцов ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической венозной крови 228 больных РМП: мышечно-неинвазивной формы (МНРМП; $n = 127$) и мышечно-инвазивной формы (МИРМП; $n = 101$). Контрольную группу составили 286 пациентов без хронических заболеваний мочеполовой системы в анамнезе. Полиморфные локусы генов анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с ПДРФ и аллель-специфичной ПЦР. Математическую обработку результатов проводили с использованием пакетов статистических программ SNPstats.

Результаты. Ассоциации с риском развития РМП по локусу –25491/D гена *VEGF* не выявлено. При отдельном анализе МНРМП показано, что генотип II встречался чаще в выборке больных РМП (29 %), чем в группе здоровых индивидов (19,3 %; $p = 0,05$; отношение шансов (ОШ) 1,71; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,00–2,92).

Сравнение наших выборок больных РМП и здоровых индивидов по вариантному аллелю локуса rs3176879 гена *VCAM1* показало отсутствие различий в распределении частот генотипов ($\chi^2 = 4,66$; $p = 0,10$) и аллелей ($\chi^2 = 0,02$; $p = 0,88$). Однако при анализе выборки больных с МНРМП была показана ассоциация с риском развития опухоли в модели сверхдоминирования (ОШ 1,72; 95 % ДИ 1,02–2,88; $p = 0,04$).

Заключение. Показана роль полиморфных локусов rs3917010 гена *VCAM1* и rs34357231 гена *VEGF* в развитии МНРМП.

Поиск ассоциации полиморфного локуса *ICAM1* с риском развития рака мочевого пузыря

В.Н. Павлов¹, С.М. Измайлова¹, Л.З. Ахмадишина²,
А.А. Измайлов¹, Т.В. Викторова^{1,2}

¹ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

²ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН

Введение. Значительную роль в патогенезе злокачественных новообразований, в том числе и рака мочевого пузыря (РМП), играют специфические факторы роста клеток. ICAM1-опосредованная адгезия лейкоцитов к эндотелию является ключевым этапом в раннем ангиогенезе и имеет важное значение в развитии эндотелиальной клеточной полярности, таким образом опосредуя миграцию эндотелиальных клеток VCAM-1. Эти клетки, как полагают, выполняют такую же роль, что и ICAM-1, в то время как PECAM-1 регулирует и адгезию эндотелия, и миграцию, опосредованную межклеточными взаимодействиями. **Целью исследования** был анализ ассоциации полиморфного локуса rs71647806 (Leu125Val) гена *ICAM1* с риском развития мышечно-инвазивного (МИРМП) и мышечно-неинвазивного РМП (МНРМП).

Материалы и методы. Проведен молекулярно-генетический анализ образцов ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической венозной крови 228 больных РМП: МНРМП ($n = 127$) и МИРМП ($n = 101$). Контрольную группу составили 286 человек без хронических заболеваний мочеполовой системы в анамнезе. Полиморфные локусы генов анализировали методом ПЦР-ПДРФ и аллель-специфичной ПЦР. Математическую обработку результатов проводили с использованием пакетов статистических программ SNPstats.

Результаты. Анализ локуса rs5498 гена *ICAM1* выявил ассоциацию с риском развития РМП в доминантной модели (отношение шансов (ОШ) 2,63; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,79–3,88; $p < 0,0001$). Причем полученная ассоциация сохранялась как при анализе МНРМП (ОШ 2,91; 95 % ДИ 1,72–4,95; $p < 0,0001$ в доминантной модели), так в случае МИРМП (ОШ 1,90; 95 % ДИ 1,35–2,66; $p = 0,0002$ в аддитивной модели). Полученные данные согласуются с результатами других исследований.

Комбинированное действие димерных бисбензимидазолов DB (5), DB (7) и γ -излучения на клетки рака молочной железы человека линии MCF-7 *in vitro*

К.А. Проношкина¹, А.А. Иванов²,
А.Л. Жузе³, И.А. Замулаева¹

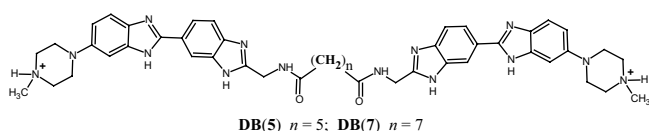
¹МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИРЦ
Минздрава России, Обнинск;

²НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

³ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва

Поиск эффективных радиомодификаторов, увеличивающих повреждающее действие ионизирующих излучений на злокачественную опухоль и оказывающих при этом щадящее действие на нормальные ткани или по крайней мере не влияющих на их радиочувствительность, остается актуальной проблемой радиационной онкологии уже многие годы. Можно предположить, что ДНК-связывающие лиганды, способные высокоспецифично связываться с определенными последовательностями ДНК, представляют группу перспективных в этом отношении соединений.

Оценен эффект комбинированного действия синтетических димерных бисбензимидазолов (DB (*n*), где *n* = 5, *n* = 7 — число метиленовых остатков в линкерной части молекулы):



и γ -облучения на клетки рака молочной железы человека линии MCF-7 *in vitro*.

После одиночного и комбинированного действия DB (*n*) и γ -излучения в дозе 4 Гр оценена выживаемость клеток линии MCF-7 в близкие и отдаленные сроки после воздействия (по критериям общего количества живых клеток и колониеобразующей способности соответственно). По обоим критериям показано радиосенсибилизирующее действие использованных соединений. Эффекты комбинированного действия имели аддитивный характер, и коэффициенты синергизма при оценке эффектов в близкие сроки после воздействия составили $0,99 \pm 0,11$ (DB (5)) и $0,91 \pm 0,01$ (DB (7)). Коэффициенты синергизма при оценке эффектов комбинированного воздействия по критерию колониеобразующей способности составили $1,02 \pm 0,14$ (DB (5)) и $0,89 \pm 0,11$ (DB (7)).

Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки средств комбиниро-

ванного воздействия на опухолевые клетки на основе изучаемого класса соединений.

Работа выполнена при поддержке РФФИ
(грант № 14-04-00388).

Молекулярные факторы опухолевой прогрессии при увеальной меланоме: мутации в генах *GNAQ/GNA11* и полиморфизм *ABCB1/MDR1*

С.В. Саакян¹, А.Ю. Цыганков¹, А.Г. Амирян¹,
В.И. Логинов², А.М. Бурденный²

¹ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт
глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России;

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

Цель исследования — анализ мутаций в онкогенах *GNAQ* и *GNA11* и полиморфизма гена *ABCB1/MDR1*, их корреляции с клиническими и морфологическими характеристиками при первичной увеальной меланоме (УМ).

Материалы и методы. Обследованы и пролечены 30 пациентов в возрасте 23–72 года (средний возраст $52,5 \pm 9,1$ года) с первичной УМ: 12 мужчин и 18 женщин (2:3). Во всех случаях проведена энуклеация с гистологическим подтверждением диагноза УМ. Мутации в генах *GNAQ/GNA11* и полиморфизм гена *ABCB1/MDR1* определены с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа.

Результаты. В 27 (90 %) из 30 образцов выявлены мутации в экзонах 4 и 5 генов *GNAQ/GNA11*. Частота мутаций в экзонах 4 и 5 гена *GNAQ* составила 40 и 16,7 %, гена *GNA11* — 0 и 50 %. Показана статистически значимая ассоциация между частотой мутации глутамина в 209-м положении гена *GNAQ* с высокой отслойкой сетчатки (0,55 при $p < 0,05$). Частота мутации в экзоне 5 гена *GNA11* в опухоли веретенноклеточного типа в 2,8 раза выше, чем эпителиоидноклеточного типа. Аллель С полиморфного маркера С3435Т гена *ABCB1* выявлена в 80 % случаев. Частота предрасполагающего генотипа СС у больных УМ в 4 раза выше, чем в контрольной группе. Данный генотип ассоциирован с высоким риском развития УМ (отношение шансов 8,5; $p = 7 \times 10^{-6}$). Установлена достоверная корреляционная связь частоты встречаемости генотипа СС полиморфного маркера С3435Т гена *ABCB1* с высотой и степенью пигментации опухоли ($p = 0,0391$ и $p = 0,0381$), состоянием сосудов и эпителиоидноклеточным/смешанноклеточным типом УМ ($p = 0,0493$ и $p = 0,0569$). Генотип ТТ у больных УМ не выявлен.

Заключение. Показаны высокая частота мутаций в генах *GNAQ/GNA11* и ассоциация аллеля С полиморфного маркера С3435Т гена *ABCB1* с неблагоприятными клиническими и морфологическими вари-

антами УМ. Выявленные особенности могут быть использованы для разработки в ходе дальнейших исследований современных подходов к прогнозированию течения УМ, а также для скрининга пациентов, находящихся в группе риска по данному заболеванию.

Увеальная меланома с высоким риском метастазирования: молекулярно-генетические, клинические и патоморфологические особенности опухоли

С.В. Саакян¹, А.Ю. Цыганков¹, А.Г. Амирян¹,
Н.В. Склярова¹, Д.В. Залетаев²

¹ФГБУ «МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца»
Минздрава России;

²ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России

Цель исследования — уточнение клинических, патоморфологических и молекулярно-генетических особенностей увеальной меланомы (УМ) с высоким риском метастазирования.

Материалы и методы. Всего обследованы 104 пациента с УМ, в том числе 66 (63,4 %) женщин и 38 (36,6 %) мужчин, пролеченных в период 2005–2007 гг. Возраст пациентов на момент постановки диагноза составил 22–84 года (средний возраст $53,7 \pm 12,2$ года). Срок наблюдения составил 41–84 мес (средний — $60,9 \pm 8,8$ мес). Потерю гетерозиготности в хромосомных районах 1p36, 1p31.3, 3p25.3, 3p21.3, 3p14.2, 3q12, 3q26.3, 3q28 идентифицировали с использованием панели высокополиморфных маркеров. Для определения метилирования CpG-островков промоторных областей генов применяли метод метил-чувствительной полимеразной цепной реакции. Выделены группы УМ с наличием ($n = 32$) и отсутствием ($n = 72$) метастазирования.

Результаты. Возраст, пол пациентов, размеры опухоли, наличие пигментации, гемофтальма, вторичной отслойки сетчатки, субретинального экссудата и видимых собственных сосудов существенно не различались в группах метастатической и неметастатической УМ. Экстрабульбарный рост опухоли наблюдался с приблизительно одинаковой частотой в обеих группах ($p = 0,065$), однако у пациентов с метастазированием размер экстрабульбарных очагов был больше. Для больных с метастатической УМ характерны значительно более высокая частота смешанноклеточного варианта опухоли и более низкая — веретенноклеточного, а также более высокая частота вовлечения цилиарного тела (43,8 %). В частоте эпителиоидноклеточного типа опухоли значимых отличий не выявлено. Моносомия хромосомы 3 в клетках опухоли значимо ухудшает витальный прогноз ($p = 0,0001$), делеция короткого

плеча хромосомы 1 не влияет на развитие метастатической болезни, а метилирование гена *RASSF1A* несколько улучшает витальный прогноз при УМ ($p = 0,04$).

Заключение. Все пациенты с УМ должны быть обследованы на моносомию хромосомы 3. При ее выявлении рекомендуется регулярное обследование отдаленных органов (печень, легкие и др.) методами ультразвукового исследования, компьютерной томографии (КТ), КТ с позитронно-эмиссионной томографией для определения возможных метастатических очагов.

Анализ корреляции между экспрессией основных маркеров карциномы молочной железы и экспрессией топоизомеразы $\Pi\alpha$

С.В. Сазонов, Е.В. Арутюнян, Е.А. Новикова
ГБОУ ВПО «Уральский ГМУ» Минздрава России,
Екатеринбург

Актуальность. Топоизомераза $\Pi\alpha$ (Top $\Pi\alpha$) — ядерный фермент, активно участвующий в процессах пролиферации и репарации ДНК, что ведет к повышению выживаемости опухолевых клеток. Ген *TOP2A* расположен близко к гену, кодирующему человеческий эпидермальный фактора роста (HER-2/neu), на хромосоме 17q12–21. Предполагается, что нарушения в гене *HER-2/neu* вызывают амплификацию гена *TOP2A* по механизму breakage-fusion-bridge. **Цель исследования** — определить наличие корреляции между экспрессией белка Top $\Pi\alpha$ и экспрессией белков Ki-67, HER-2/neu, эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в клетках карциномы молочной железы.

Материалы и методы. Проанализированы 532 случая инфильтративной карциномы молочной железы. Исследования выполнены с использованием автоматической системы для иммуногистохимического окрашивания Universal Staining System Autostainer Dako (Дания). Экспрессию Top $\Pi\alpha$ оценивали по шкале L. Usha (гиперэкспрессия ≥ 35 %), анализ данных проводили с помощью программного пакета The Salford Predictive Modeler 7.0. Все случаи были разделены на 2 группы в зависимости от значения экспрессии Top $\Pi\alpha$. В 1-ю группу вошли случаи со значением TPI ≥ 35 % ($n = 80$; 15 %), классифицирующиеся как гиперэкспрессия по данному белку. Во 2-ю группу — случаи с TPI < 35 % ($n = 452$; 85 %). В каждой из групп рассматривали распределение маркеров по важности с использованием алгоритма CART и построением классификационного дерева решений.

Результаты и обсуждение. В 1-й группе основным маркером, связанным с Top $\Pi\alpha$, является белок Ki-67. При этом гиперэкспрессия Top $\Pi\alpha$ наиболее часто встречается в опухолях с уровнем Ki-67 > 20 % (71 случай из 80). Четкой зависимости от уровня экспрессии

HER-2/neu, эстрогеновых или прогестероновых рецепторов в данной группе не обнаружено. Во 2-й группе основным маркером, связанным с TopIIa, также оказался белок Ki-67. Алгоритмом CART выделено множество подгрупп Ki-67 в зависимости от уровня прогестерона и HER-2/neu.

Заключение. Экспрессия белка Ki-67 коррелирует с уровнем экспрессии TopIIa. Гиперэкспрессия TopIIa наиболее часто встречается в клетках опухоли карциномы молочной железы с уровнем Ki-67 > 20 %. Корреляции уровня экспрессии TopIIa с экспрессией HER-2/neu, эстрогеновых или прогестероновых рецепторов при карциноме молочной железы не обнаружено.

Разработка экспресс-FISH-теста для выявления скрытых хромосомных aberrаций при миелопролиферативных новообразованиях

А.А. Сальник, А.С. Мкртчян, Н.А. Лыжко, А.В. Мисюрин
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Миелопролиферативные новообразования (МПН) — клональные гематологические злокачественные новообразования, происходящие из зрелых стволовых клеток и характеризующиеся пролиферацией в костном мозге.

Для диагностики МПН важными являются результаты цитогенетических, молекулярно-цитогенетических и молекулярных исследований. Цитогенетический анализ показывает различные хромосомные aberrации, что указывает на наличие того или иного заболевания. Молекулярно-цитогенетические исследования позволяют определить криптические цитогенетические изменения, которые невозможно заметить при проведении только цитогенетического анализа. Мутации некоторых генов, таких как *JAK2*, *MPL*, *CALR*, *LNK*, *CBL*, *MPN*, *TET2*, *IDH1/2* и т. д., очень специфичны для МНП и выявляются в 20–90 % случаев. При переходе из хронической фазы в фазу бластного криза частота генетических и цитогенетических изменений существенно увеличивается.

Целью данной работы было обнаружение генетических и скрытых цитогенетических изменений при помощи FISH-анализа; создание экспресс-FISH-теста для выявления наиболее часто встречаемых aberrаций при МПН.

Проведены молекулярно-цитогенетические и молекулярные исследования 24 пациентов. У 23 из них была обнаружена мутация в 12-м экзоне гена *JAK2* и у 1 — делеция гена *CALR*. Для молекулярно-цитогенетического анализа была собрана панель зондов для

выявления наиболее часто встречаемых aberrаций при МПН: амплификация/делеция 1q21, 1p36, 3q26, 5q31–33, 7q22–36, 20q11/20q12, 13q14, 17p, трисомия хромосом 8, 9, 21. У 3 пациентов с мутацией в гене *JAK2* обнаружены скрытые хромосомные aberrации: в 8 % клеток — амплификация участка 1q21; в 60 % — амплификация участка 3q26; в 8 % — необычная комбинация сигналов зонда для транслокации t(12;21)(p13.2;q22.1) (выявлено 2 слитых сигнала генов *TEL* и *AML* со слабым сигналом *TEL* и 2 сигнала гена *TEL*).

Таким образом, у всех больных МПН обнаружены специфические мутации (96 % — гена *JAK2*, 4 % — гена *CALR*). Полученные результаты позволяют дать предварительную оценку высокой эффективности использования панели подобранных зондов (в 13 % случаев выявлены цитогенетические изменения). Пациенту с перестройкой 12;21 необходимо провести генетические исследования для уточнения характера данной aberrации. Дальнейшие исследования будут направлены на усовершенствование панели путем добавления/изъятия ДНК-зондов.

Дифференциальная диагностика узловых образований щитовидной железы путем анализа экзосомальных микроРНК

Р.Б. Самсонов^{1,2}, В.С. Бурдаков³, Т.А. Штам³,
З.А. Раджабова¹, Д.А. Васильев¹, Е.В. Цырлина¹,
С.Е. Титов^{4,5}, М.К. Иванов⁵, М.В. Филатов³,
Л.М. Берштейн¹, Н.Н. Колесников⁴, А.В. Малек^{1,3}

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

²ФГБУ РНЦРХТ Минздрава России, Санкт-Петербург;

³Петербургский институт ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

⁴ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», Новосибирск;

⁵ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск

В настоящее время в клинической практике отсутствуют надежные методы неинвазивной первичной и/или дифференциальной диагностики узловых заболеваний щитовидной железы, примерно 10 % которых представлены злокачественными новообразованиями (Gandolfi et al., 2004; Botrugno et al., 2011). МикроРНК — это короткие одноцепочечные молекулы РНК, выполняющие функцию аутокринной регуляции генной экспрессии внутри клетки. МикроРНК могут секретироваться клетками в составе мембранных везикул (экзосом) и опосредовать пара- и эндокринное взаимодействие клеток различных тканей. Клетки опухоли секретируют экзосомы, которые опосредуют процессы инвазивного роста и метастатической диссеминации и могут быть выделены из биологических жидкостей. Анализ состава микроРНК опухоле-

вых экзосом развивается как новый перспективный метод диагностики онкологических заболеваний. В группах пациентов с различными узловыми заболеваниями щитовидной железы методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией проведен сравнительный анализ экзосомальных микроРНК. Выявлено, что повышение концентрации микроРНК отличает пациентов с папиллярным (miR-31) и фолликулярным (miR-21) раком щитовидной железы от больных с аденомой. Реципрокный характер экспрессии 2 микроРНК (miR-21/miR-181a) наблюдался у пациентов с папиллярным и фолликулярным раком щитовидной железы, что позволяло дифференцировать эти заболевания со 100 % чувствительностью и 77 % специфичностью.

Возможности NGS в диагностике редких наследственных синдромов

А.В. Семьянихина¹, М.Г. Филиппова¹, И.С. Абрамов^{1,2},
А.С. Тюляндина¹, О.В. Крохина¹, Т.В. Наседкина²,
Л.Н. Любченко¹

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

²ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва

Введение. Синдром Ли–Фраумени (СЛФ) относится к группе редких наследственных высокопенетрантных аутосомно-доминантных заболеваний, характеризуется фенотипической и генетической гетерогенностью и ассоциирован с высокими рисками развития остеогенных и мягкотканых сарком, одно- и двустороннего рака молочной железы (РМЖ) у женщин, аденокортикального рака, опухолей головного мозга, гемобластозов и др.

Материалы и методы. В целях оценки вклада герминальных мутаций и полиморфных вариантов в гене *TP53* в развитие двустороннего РМЖ и первично-множественных злокачественных новообразований (ПМЗН) в составе СЛФ, а также возможностей современных методов ДНК-диагностики представлен клинический случай 33-летней пациентки с ПМЗН в составе СЛФ: рак правой молочной железы, состояние после полихимиотерапии. Прогрессирование в 2010 г. Метастатический рак левой молочной железы, состояние после комплексного лечения в 2011–2013 гг. Прогрессирование РМЖ на фоне беременности в 2013 г. Кесарево сечение на сроке 25 нед беременности. Анапластическая олигоастроцитома правой лобной доли головного мозга, состояние после комплексного лечения в 2011–2013 гг. Прогрессирование заболевания в 2014 г. Состояние после установки резервуара Оммаи в кистозный компонент опухоли правой лобной доли головного мозга 01.07.2014. Для проведения молекулярно-генетического исследования получена геномная ДНК пациентки, предварительно генотипированная на предмет отсутствия мутаций в генах *BRCA1/2*. С помощью коммерческого набора SeqPlate *TP53* амплифициро-

ваны 4–11-й экзоны гена *TP53*. Таргетное секвенирование выполнено на платформе GS Junior (454/Roche).

Результаты. В 7-м экзоне гена *TP53* выявлена герминальная миссенс-мутация с.722C>A (p.S241Y), в последующем валидированная автоматическим секвенированием по Сэнгеру; подтвержден клинический диагноз: *TP53*-ассоциированные ПМЗН в составе СЛФ.

Выводы. Представленные результаты демонстрируют высокую диагностическую эффективность современных методов молекулярно-генетической диагностики в онкологической практике, в том числе технологий массового параллельного секвенирования.

Идентификация потенциальных маркеров и эффекторов гепатоканцерогенеза по результатам транскриптомного секвенирования

П.А. Сковородникова^{1,2}, М.С. Чесноков³, И.Ф. Кустова³,
Д.А. Шавочкина³, М.Д. Логачева², А.А. Пенин²,
А.В. Клепикова², Н.Е. Кудашкин⁴, Ю.И. Патютко⁴,
Н.Л. Лазаревич^{1,3}

¹Биологический факультет

ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»;

²НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского

ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»;

³отдел иммунохимии НИИ канцерогенеза ФГБУ

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

⁴отделение опухолей печени и поджелудочной железы НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является одной из наиболее распространенных форм рака в мире и характеризуется поздними сроками выявления и устойчивостью к химиотерапии. Данная работа направлена на поиск новых потенциальных маркеров для ранней диагностики и мишеней для направленной терапии.

Из 5 пар образцов опухоли и неопухолевой ткани печени пациентов с ГЦК выделены РНК и проведено их полнотранскриптомное секвенирование на платформе Illumina HiSeq2000. По результатам секвенирования выбраны гены *CENPF*, *IQGAP3*, *TOP2A*, *GNAZ* и *PDGFA*, уровни экспрессии которых исследованы методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени на 19 парах образцов ГЦК и неопухолевой ткани печени. Гиперэкспрессия исследованных генов выявлена в 90–100 % случаев, при этом в высокозлокачественных опухолях экспрессия большинства генов была повышена в 16–2000 раз, у пациентов с ранними стадиями заболевания — в 2–4 раза.

Также исследованы изменения спектра экспрессии альтернативных изоформ ключевого активатора ангиогенеза VEGFA, который является важным регулятором прогрессии ГЦК. В образцах ГЦК наблюдается повышение экспрессии наиболее активных растворимых изоформ VEGF121 и VEGF165 (40 и 30 % случаев соответственно) и снижение экспрессии изоформы VEGF189, сцепленной с клеточной поверхностью (в 85 % образцов).

Таким образом, обнаружены новые потенциальные маркеры гепатоканцерогенеза, значительная гиперэкспрессия которых наблюдается в ткани ГЦК. Выявлено специфическое для ГЦК изменение баланса уровней экспрессии изоформ VEGFA. Полученные данные могут быть использованы для оптимизации существующих и разработки новых подходов в таргетной терапии ГЦК.

Работа частично поддержана грантом Минобрнауки России (контракт № 14.607.21.0049, RFMEFI60714X0049).

Подавление экспрессии онкогена RUNX1-RUNX1T1 приводит к активации сигнальных каскадов, ответственных как за выживаемость, так и за гибель клеток острого миелоидного лейкоза

П.В. Спирин¹, Н.Н. Орлова¹, Т.Д. Лебедев¹,
А.А. Буздин², К. Стокин³, В.С. Прасолов¹

¹ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва;

²ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва;

³Институт им. Генриха Петте — Лейбницкий институт экспериментальной вирусологии, Гамбург, Германия

Транслокация t(8;21)(q22;q22) наиболее часто является при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) и приводит к образованию в клетках транскрипта, кодирующего слитый белок RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO), который представляет собой перспективную мишень для лечения лейкозов. Однако активности только этого онкогена недостаточно, чтобы привести к образованию лейкозных клеток, и эффективность такой терапии остается неясной. RUNX1-RUNX1T1, как известно, регулирует экспрессию генов, участвующих в опухолевой прогрессии, но роль этих сигнальных путей и их отдельных компонентов неизвестна. Мы использовали РНК-интерференцию (RNAi) для выяснения эффекта подавления RUNX1-RUNX1T1 в клетках линии Kasumi-1, несущих транслокацию t(8;21). Показано значительное уменьшение экспрессии KIT, снижение скорости пролиферации и стимулирование апоптоза. В результате получена линия

клеток, в которых осуществляется стабильное подавление экспрессии RUNX1-RUNX1T1. Проанализирован геном данных клеток; показано, что подавление RUNX1-RUNX1T1 приводит к активации и подавлению путей, ответственных за выживаемость и пролиферацию клеток. Показано, что подавления синтеза только данного онкобелка может быть недостаточно для гибели злокачественных клеток. Обнаружено, что белок ERK2, являющийся одним из ключевых регуляторов, ответственных за пролиферацию клеток, может опосредовать активацию 23 (79 %) из 29 исследованных сигнальных путей. Таким образом, данный фактор может быть рассмотрен в качестве ключевой мишени для избирательной элиминации клеток, несущих транслокацию t(8;21). Показана возможность сочетанного использования ингибиторов ERK2 и RUNX1-RUNX1T1. IC₅₀ для t(8;21)-позитивных клеток линии Kasumi-1 была более чем в 2 раза ниже по сравнению с использованием этих ингибиторов в тех же концентрациях по отдельности. Мы полагаем, что этот подход может быть использован при разработке методов лечения t(8;21)-позитивных лейкозов.

Работа выполнена при поддержке РНФ (договор № 14-14-01089).

Влияние таргетной терапии на молекулярные маркеры опухоли у больных с диссеминированным раком почки

Л.В. Спирина^{1,2}, З.А. Юрмазов¹, Е.А. Усынин¹,
И.В. Кондакова¹, Е.М. Слонимская^{1,2}

¹ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск

Таргетная терапия является перспективным направлением лечения распространенного рака почки (РП), поскольку значимо увеличивает время без прогрессирования по сравнению со стандартной иммунотерапией. Однако в настоящее время существует необходимость поиска дополнительных критериев, позволяющих предсказывать эффективность подобного лечения.

Цель работы заключалась в изучении динамики изменений транскрипционных факторов NF-κB, HIF-1α, ростового фактора VEGF, его рецептора VEGFR2, протеинкиназы m-TOR, активности протеасом и кальпаинов у больных с диссеминированным РП на фоне проводимой таргетной терапии.

Материалы и методы. В исследование включены 44 пациента с гистологически верифицированным диагнозом светлоклеточного РП (средний возраст 58,6 ± 2,2 года). Пациенты были рандомизированы на 2 группы: 1-я (n = 26) в плане комбинированного лечения получала пазопаниб в количестве 2 курсов в рекомендованной дозе 800 мг ежедневно в течение 2 мес,

2-я ($n = 18$) — эверолимус 10 мг. После окончания курса предоперационного лечения проводилась паллиативная нефрэктомия. Содержание транскрипционных и ростовых факторов изучено методом иммуноферментного анализа; активность протеасом и кальпаинов — флуориметрическим методом.

Результаты. На фоне лечения таргетными препаратами, как пазопанибом, так и эверолимусом, экспрессия гипоксического ядерного фактора HIF-1 в ткани РП снижалась. Падение экспрессии ростового фактора VEGF и его рецептора VEGFR2 отмечено только в группе больных, получавших терапию ингибитором m-TOR. Повышение активности кальпаинов в ткани опухоли наблюдается при лечении обоими таргетными препаратами. Полученные данные расширяют представления о механизме действия таргетных противоопухолевых препаратов, а также позволяют рассматривать изучаемые маркеры в качестве предикторных при выборе оптимальной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МД-3637.2015.7.

Синтез новых селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) и оценка их противоопухолевого эффекта *in vitro*

Л.Р. Тилова¹, Е.М. Жидкова², О.И. Борисова (Задорожная)¹, А.В. Савинкова^{1,2}, К.И. Кирсанов¹, И.В. Буднова³, Е.Ю. Булич⁴, В.З. Ширинян⁵, М.Г. Якубовская¹, Е.А. Лесовая^{1,6}

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

²МИТХТ им. М.В. Ломоносова;

³North-Western University, Chicago, USA;

⁴ФГБОУ ВПО «РХТУ им. Д.И. Менделеева», Москва;

⁵ФГБУН «ИОХ им. Н.Д. Зелинского» РАН, Москва;

⁶ГБОУ ВПО «РязГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России

Глюкокортикоиды (ГК) широко используются в химиотерапии гемобластозов. Биологический эффект ГК реализуется посредством активации глюкокортикоидного рецептора (ГКР), регулирующего экспрессию генов путем: 1) трансактивации, требующей связывания ГКР с ДНК, и 2) транскрепрессии — белок-белкового взаимодействия ГКР с факторами транскрипции. Транскрепрессия обуславливает терапевтические эффекты ГК, в то время как трансактивация вызывает развитие побочных эффектов. Перспективным является поиск селективных агонистов ГКР (SEGRA), избирательно запускающих транскрепессию. К классу SEGRA относится 2-(4-ацетоксиметил)-2-хлор-N-метилэтиламмоний хлорид, или CpдA, соединение растительного происхождения, выделенное из кустарника *Salsola tuberculatifomis*.

Показано, что CpдA конкурирует с ГК за связывание с ГКР и селективно запускает механизм транскрепрессии. Также мы показали, что CpдA проявляет ГКР-зависимый противоопухолевый эффект на моделях гемобластозов *in vitro* и *in vivo*. В данном исследовании мы планировали расширить список SEGRA путем синтеза энантиомеров CpдA или его химических производных. Энантиомеры CpдA синтезированы на основании асимметричного дигидроксилирования по Шарплессу. При оценке биологических свойств показано, что оба энантиомера обладают ГКР-зависимым антипролиферативным эффектом и способностью селективно запускать только транскрепессию, причем для (S)-CpдA эти свойства выражены сильнее. Химические производные CpдA получены путем введения объемных заместителей в бензольное кольцо молекулы CpдA, алкилирования атома углерода, смежного с атомом хлора, или путем введения заместителей к атому азота. Цитотоксические и проапоптотические эффекты полученных соединений были сравнимы с эффектами исходного агента.

Полученные данные показывают перспективность дальнейшего исследования производных CpдA как новых противоопухолевых препаратов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 13-04-01707 и № 15-04-04006) и фонда «Династия».

Ассоциация уровней экспрессии генов ABC и GST и выживаемости без прогрессирования заболевания у пациенток, страдающих отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы

И.Ю. Третьяк

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск

Цель работы — определить ассоциацию уровней экспрессии генов ABC и GST и выживаемости без прогрессирования заболевания у пациенток, страдающих отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. Экспрессия генов ABC и GST определена у 37 пациенток с отечно-инфильтративной формой РМЖ и 74 больных с первично-диссеминированным РМЖ, которым проводилась химиотерапия с включением антрациклинов на 1-м этапе специального лечения. В качестве материала для исследования использовали фиксированные в парафине срезы образцов опухолевой ткани.

Результаты и выводы. При многофакторном анализе выявлена ассоциация между временем до про-

грессирования заболевания у пациенток с IV стадией РМЖ, получавших цитостатическую терапию с включением антрациклинов, и отсутствием экспрессии гена *GSTM1* (отношение рисков (ОР) 1,8; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,1–3,1; $p = 0,024$), а также со степенью поражения регионарных лимфатических узлов (сN2–3 против сN0–1) (ОР 2,0; 95 % ДИ 1,2–3,4; $p = 0,010$). Выделены группы риска прогрессирования опухолевого процесса из числа пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным РМЖ, получавших цитостатическую терапию с включением антрациклинов, на основе определения экспрессии гена *GSTM1* и степени поражения регионарных лимфатических узлов. Группа умеренного риска прогрессирования включала больных с отсутствием факторов риска или наличием только 1 фактора риска (отсутствие экспрессии гена *GSTM1* или поражение регионарных лимфатических узлов сN2–3). Группа высокого риска прогрессирования включала пациенток с наличием 2 факторов риска и характеризовалась отсутствием экспрессии гена *GSTM1* и поражением регионарных лимфатических узлов сN2–3. Выявлены статистически значимые различия в выживаемости без прогрессирования заболевания в группах высоко-го/умеренного риска прогрессирования ($p < 0,05$).

Исследование мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* у молодых женщин, больных раком молочной железы, в Узбекистане

М.Т. Тухтабоева, А.Н. Абдихакимов, Б.Ш. Адылов,
Ш.У. Турдикулова

Ташкентский областной онкологический диспансер,
Республика Узбекистан;

Центр медицинской генетики Института биохимии
Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент

Заболеваемость раком молочной железы (РМЖ) в Узбекистане — одна из самых высоких среди Центральноазиатских республик. В связи с этим разработка эффективных стратегий ранней диагностики и профилактики РМЖ является очень важным направлением.

Наследственные факторы играют важную роль в развитии РМЖ. Наиболее значимыми на сегодняшний день генетическими факторами риска РМЖ являются герминальные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*.

Целью работы явилось исследование вклада 5 часто встречающихся мутаций *BRCA1/2* в развитие РМЖ у женщин молодого возраста в Узбекистане. В исследование была включена группа пациенток с относительно ранним возрастом возникновения заболевания (до 35 лет; $n = 45$). Контрольная группа состояла из 103 практически здоровых женщин. Для выявления мутаций 5382insC, 4153delA, 185delAG и 300T>G в ге-

не *BRCA1*, а также 6174delT в гене *BRCA2* использовалась аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Обнаружено, что 7 % пациенток имеют гетерозиготную мутацию *BRCA1* 5382insC. Мутации *BRCA1* 4153delA, 185delAG, 300T>G и *BRCA2* 6174delT не выявлены ни в одном из проанализированных случаев. Исследованные мутации не обнаружены и в контрольной группе.

Результаты нашего исследования подтверждают вклад мутации *BRCA1* 5382insC в развитие РМЖ у женщин молодого возраста в Узбекистане. Таким образом, целесообразно включить генотипирование данной мутации в скрининговые программы профилактики РМЖ у молодых женщин.

Влияние селективного ингибитора eNOS T1023 на развитие неоплазий различного гистогенеза

М.В. Филимонова, Л.И. Шевченко, В.М. Макачук,
Е.А. Чеснакова, Т.С. Корнеева, А.С. Самсонова,
А.С. Филимонов, И.А. Замулаева

МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИРЦ
Минздрава России, Обнинск

Введение. Изучение механизмов ангиогенеза неоплазий и выявление многочисленных факторов, модулирующих эти процессы, создали условия для разработки фармакологических средств ангиостатической терапии опухолей. Известно, что общим звеном в развитии ангиогенного действия большинства проангиогенных факторов является активация eNOS/sGC/sGMP-пути. В связи с этим перспективным для противоопухолевой терапии может являться применение ингибиторов ангиогенеза, действие которых направлено на общие участки проангиогенных путей, в частности ингибиторов эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS). Проведено сравнительное изучение противоопухолевого действия ингибитора eNOS на 3 моделях экспериментальных неоплазий с различным гистогенезом и характером развития.

Материалы и методы. Использованы перевиваемые опухоли животных: меланома мышей В16, эпидермоидная карцинома легких Льюиса (КЛЛ) и рак шейки матки мышей РШМ5. КЛЛ и В16 поддерживали на самцах мышей C57BL/6j, РШМ5 — на самках мышей линии СВА. Ингибитор eNOS T1023 вводился подопытным животным ежедневно однократно внутривентриально в дозе 1/6–1/5 ЛД₅₀, в зависимости от схемы терапии со 2-х, 7-х или 14-х суток после перевивки и до конца срока наблюдения. Для оценки противоопухолевого и анти-метастатического эффекта рассчитывали индекс торможения роста (ИТР), индекс роста (ИР) опухоли и для КЛЛ — индекс ингибирования метастазирования (ИИМ).

Результаты. Во всех схемах воздействия на КЛЛ соединение T1023 вызывало выраженную задержку роста

и подавление метастазирования карциномы (ИТР 40–70 %, ИИМ 50–80 %). Торможение роста РШМ5 независимо от сроков начала применения T1023 развивалось только в экспоненциальной фазе роста РШМ, и в дальнейшем наблюдался стабильный противоопухолевый эффект (ИР 50–60 %). Меланома B16 была существенно более резистентной: умеренное торможение роста (ИТР 30–35 %) отмечалось лишь на начальных этапах с последующей адаптацией к влиянию ингибитора eNOS.

Выводы. Селективные ингибиторы eNOS являются перспективными для разработки средств антиангиогенной терапии неоплазий. Их эффективность во многом определяется схемой терапии и гистогенезом опухоли.

Иммунизация рекомбинантным антигеном PRAME снижает развитие опухоли на животной модели

Ю.П. Финашутина, Н.А. Лыжко, Т.В. Ахлынина,
А.В. Мисюрин

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

Введение. Антиген PRAME (preferentially expressed antigen of melanoma) распознается цитотоксическими CD8⁺-Т-клетками у многих пациентов с меланомой. Показано также, что ген PRAME избыточно экспрессируется в различных новообразованиях, включая солидные опухоли и гемобласты. Кроме того, некоторые PRAME-пептиды, используемые в качестве вакцины, способны стимулировать цитотоксическое действие специфических CD8⁺-Т-клеток. Следовательно, антиген PRAME может быть перспективной мишенью для разработки противоопухолевой иммунотерапии. **Цель исследования** — оценить значение полноразмерного рекомбинантного белка PRAME в качестве противоопухолевой вакцины против PRAME-экспрессирующих опухолевых клеток.

Материалы и методы. Рекомбинантный человеческий антиген PRAME был получен путем клонирования в экспрессирующий вектор pET-15b его кодирующей последовательности с последующей разработкой белка в культуре *Escherichia coli*. Очистка белка гесPRAME осуществлялась методом аффинной хроматографии. Последовательность гена PRAME также была клонирована в вектор pCER4 для экспрессии белка в эукариотических клетках. Клетки мышины меланомы B16-F10 были трансфицированы этим вектором, и был отобран клон, стабильно экспрессирующий ген. Мыши линии C57BL/6 были иммунизированы внутрибрюшинно композицией из 100 мкг рекомбинантного белка PRAME и 300 мкг адьюванта гидроксида алюминия 4 раза с интервалом 2 нед. Затем мышам подкожно трансплантировали 4×10^5 клеток меланомы PRAME-B16-F10. В контрольных группах были мыши с трансплантированной меланомой B16-

F10, трансфицированной вектором pCER4 без гена PRAME, и мыши, иммунизированные только адьювантом. В процессе развития опухоли измеряли ее размер, а также определяли титр анти-PRAME-антител в сыворотке методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Получен рекомбинантный человеческий антиген PRAME с чистотой белка 95 %. Было показано, что введение гесPRAME не влияет на формулу крови и морфологические характеристики различных тканей. Иммунизация мышей белком гесPRAME вызывает гуморальный ответ в сыворотке. Профилактическая вакцинация мышей белком гесPRAME приводит к подавлению роста меланомы PRAME-B16-F10, причем степень подавления ее роста зависит от интенсивности гуморального ответа, который развивается у мышей в результате иммунизации рекомбинантной вакциной гесPRAME. Наши данные показывают противоопухолевый эффект иммунизации белком гесPRAME на животной модели, и антиген PRAME является подходящим кандидатом для создания противоопухолевой вакцины для PRAME-позитивных злокачественных новообразований.

Панель однонуклеотидных полиморфизмов, позволяющая прогнозировать изменение экспрессии генов резистентности в опухоли молочной железы под действием химиотерапии

М.М. Цыганов^{1,2}, М.К. Ибрагимова¹, Е.М. Слонимская¹,
Н.В. Чердынцева^{1,2}, Н.В. Литвяков^{1,2}

¹ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Ранее нами получены данные о коэкспрессии в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии (НХТ) 4 генов ABC-транспортеров: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* ($r = 0,27–0,81$; $p < 0,05$), повышение экспрессии которых приводит к формированию фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Механизмы регуляции экспрессии генов ABC, которые связаны с индивидуальными генетическими особенностями, определяемыми однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП), не изучены. **Целью работы** явилось изучение связи ОНП с изменением экспрессии одновременно 4 генов ABC в процессе НХТ.

Материалы и методы. Обследованы 80 больных раком молочной железы (IIA–IIIC стадии), из них 68 и 12 пациентов составили обучающую и тестовую выборки соответственно. Больные получали 2–4 курса НХТ. Экспрессию генов ABC оценивали в 80 парных

образцах до лечения и после НХТ методом количественной полимеразной цепной реакции. ДНК из биоптатов использовали для микроматричного анализа на чипе CytoScan HD Array (Affymetrix, USA) и получения данных по ОНП. Связь изменения экспрессии генов *ABC* с ОНП оценивали с помощью программы R v. 3.0.2.

Результаты. При исследовании на обучающей выборке установлено, что с изменением экспрессии одновременно 4 генов *ABC* ассоциированы 19 полиморфизмов: rs2239222, rs1104880, rs984838, rs7410474, rs7988924, rs7857937, rs7529524, rs11765409, rs7542399, rs4285288, rs13037594, rs10863350, rs7036572, rs8125425, rs6064404, rs10780227, rs6069763, rs3787395, rs6559731. «Дикий» и/или мутантный генотип каждого ОНП сопряжен либо со снижением, либо с повышением экспрессии изучаемых генов *ABC*, и их определение до лечения позволяет предсказать изменение экспрессии генов *ABC* в процессе НХТ. На тестовой группе проспективно была проверена эффективность прогноза изменения экспрессии генов *ABC*. В 10 (83 %) из 12 случаев определение генотипов 19 ОНП позволяет предсказать снижение или повышение экспрессии генов *ABC*.

Заключение. Использование идентифицированных ОНП в качестве предсказательного фактора позволяет с 83 % эффективностью прогнозировать направление изменения генов *ABC* и формирование фенотипа МЛУ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № НК14-04-31633/15 и Программы повышения конкурентоспособности НИ ТГУ.

Изменения процесса метилирования ДНК при раке верхних дыхательных и пищеварительных органов

О.В. Шаньгина, Ю.М. Кузиченкова, Д.Г. Заридзе

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

Рак верхних дыхательных и пищеварительных органов (ВДПО) является распространенной формой злокачественных заболеваний, этиологически связанной с курением и чрезмерным употреблением алкоголя. Известно, что изменения процесса метилирования ДНК связаны с повышенным риском рака ВДПО, однако этот механизм изучен плохо. В результате данного исследования выявлено большое количество генов с aberrантной функцией гиперметилирования, включая *MYOD1*, *CHRNA3* и *MTHFR*. Кроме того, выявлен новый ген (ген рецептора никотинацетилхолина), aberrантная функция гиперметилирования которого влияет на прекращение эпигенетического регулирования рецепторов никотинацетилхолина, что, в свою очередь, может привести к опухолевой трансформации ткани. Установлено, что на статус метилирования ДНК влияют пол и возраст человека, в то время как

курение и потребление алкоголя также могут влиять на уровни метилирования ДНК в специфических генах. Таким образом, предложен новый потенциальный механизм воздействия факторов образа жизни на ключевые гены, регулирующие клеточный цикл при опухолевой супрессии и дальнейшем развитии рака ВДПО.

Редкий вариант *BRCA2* и риск рака легкого и верхних дыхательных и пищеварительных органов

О.В. Шаньгина, А.Ф. Мукерия, Д.Г. Заридзе

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

Известно, что опасная мутация гена *BRCA2* повышает риск развития рака молочной железы. Однако в рамках полногеномного метаанализа случаев рака легкого в Европейском регионе, включающего 21 597 больных плоскоклеточным раком легкого и 54 083 контрольных лиц, была выявлена четкая достоверная связь риска рака легкого с редким аллельным вариантом гена *BRCA2* (rs13314271). У носителей варианта rs13314271 риск рака легкого повышен в 2,5 раза (относительный риск (ОР) 2,47; $p = 10-20$), причем у курящих эта связь выражена сильнее, чем у некурящих. В то же время этот вариант лишь незначительно повышает риск развития рака молочной железы (только на 26 %). В последующем метаанализе случаев рака верхних дыхательных и пищеварительных органов (ВДПО), насчитывающем 5942 больных плоскоклеточным раком ВДПО и 8086 контрольных лиц, было установлено, что rs11571833 также значительно повышает риск развития рака ВДПО (ОР 2,53; 95 % доверительный интервал 1,89–3,38). Связь rs11571833 с раком ВДПО более очевидна у курильщиков и экс-курильщиков по сравнению с никогда не курившими лицами. Полученные результаты создают предпосылку для разработки методов таргетной терапии больных раком легкого и ВДПО с такими вариантами полиморфизма гена *BRCA2*.

Взаимодействие генетического полиморфизма и курения в этиологии рака верхних дыхательных и пищеварительных органов

О.В. Шаньгина, В.А. Юрченко, Д.Г. Заридзе

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

Оценку роли факторов окружающей среды в этиологии рака верхних дыхательных и пищеварительных органов (ВДПО) и модификации этого эффекта в за-

висимости от генетических вариантов (генотипа), а также идентификацию геномных вариантов, влияющих на риск развития заболевания, на основании сканирования всего генома проводили методом полногеномного исследования генотипа человека (GWAS). В этом исследовании идентифицировано 5 редких вариантов в 3 локусах (4q21, 4q23 и 12q24), которые статистически достоверно влияли на риск рака ВДПО. Выявлены 2 новых варианта 4q21 (rs1494961) и 12q24 (rs4767364), не содержащие известных генов. Кроме того, воспроизведены результаты предыдущего исследования, основанного на гипотезе (candidate gene study), и показано, что у индивидов с редким вариантом генов *ADH7* (rs1573496) и *ADH1B* (rs1229984) риск рака ВДПО понижен. Однако протективный эффект этих редких вариантов был отмечен исключительно у пьющих лиц. Это наблюдение подтверждает гипотезу, что полиморфизм метаболических генов влияет на риск злокачественных опухолей только в случае экспозиции к экзогенному этиологическому фактору и является еще одним доказательством взаимодействия генетического полиморфизма и факторов окружающей среды в этиологии рака.

Экспрессия гена сурвивина (*BIRC5*) в первичной опухоли и циркулирующих опухолевых клетках при раке молочной железы

Е.А. Шляхтунов

УО ВГМУ ордена Дружбы народов, Республика Беларусь

Отдаленные метастазы остаются основной причиной гибели пациенток, страдающих раком молочной железы (РМЖ). Субстратом для развития метастазов являются циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК). Однако один лишь поиск этих клеток недостаточен для формирования полного представления о характере и течении опухолевого процесса у отдельно взятой пациентки. Определение экспрессии опухоль-специфических генов, отвечающих за различные процессы опухолевой прогрессии, позволяет получить более полную картину. К таким генам относится ген сурвивина (*BIRC5*) семейства ингибиторов апоптоза.

Цель работы — изучить экспрессию гена сурвивина (*BIRC5*) в опухолевой ткани карциномы молочной железы, а также в ЦОК периферической крови больных РМЖ.

Материалы и методы. С помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени исследована экспрессия гена сурвивина в 16 образцах первичной инвазивной протоковой карциномы молочной железы, 3 образцах доброкачественной опухоли — фиброаденомы молочной железы, а также в 26 образцах периферической крови больных РМЖ на различных ста-

диях опухолевого процесса и этапах специального лечения и 3 образцах здоровых людей (контроль).

Результаты. В первичной карциноме молочной железы определялась высокая экспрессия гена сурвивина во всех 16 образцах со средним значением ($M \pm m$) $1,405749 \pm 0,492979$ (min — 1,215579; max — 3,408922). Наибольшие показатели экспрессии определялись в опухолях средней и высокой степени злокачественности (G2–3) с лимфовенозной инвазией (LVS1+). В 2 из 3 образцов доброкачественной опухоли экспрессия сурвивина не определялась, а в 1 она составила 0,015569. В ЦОК, выделенных из периферической крови больных РМЖ, во всех 26 образцах также определялась экспрессия гена сурвивина со средним значением ($M \pm m$) $0,903849 \pm 0,193965$ (min — 0,265369; max — 3,908322). В контрольных образцах уровень экспрессии не превышал 0,003393. Следует отметить, что максимальные показатели экспрессии получены в образцах пациенток со стадией N+ и особенно M1 по TNM классификации. Какой-либо закономерной зависимости экспрессии сурвивина от размеров опухоли не выявлено. У пациенток, получающих химиотерапию, уровень экспрессии гена сурвивина был средним, но никогда не приближался к показателям контроля.

Заключение. Определение экспрессии гена сурвивина как в первичной опухоли, так и в ЦОК может рассматриваться как один из перспективных маркеров опухолевой прогрессии и мониторинга терапии РМЖ.

Молекулярные факторы прогноза у больных с диссеминированным раком почки

З.А. Юрмазов¹, Е.А. Усынин¹, Л.В. Спирина^{1,2},
И.В. Кондакова¹, Е.М. Слонимская^{1,2}

¹ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск

Поиск дополнительных информативных прогностических параметров у больных раком почки является актуальной задачей современной онкологии. **Цель исследования** заключалась в изучении прогностической значимости экспрессии транскрипционных факторов, фактора роста VEGF, его рецептора, протеинкиназы m-TOR и активности внутриклеточных протеиназ у больных диссеминированным раком почки в соотношении со шкалой MSKCC.

Материалы и методы. В исследование включены 40 пациентов с метастатическим почечно-клеточным раком (ПКР) T3–4N0–1M1. Согласно шкале MSKCC все больные были распределены на 3 группы: с хорошим ($n = 13$), промежуточным ($n = 26$) и неблагоприятным ($n = 1$) прогнозом. В дальнейшем анализировали группы больных с хорошим и промежуточным прогнозом ($n = 39$). Всем пациентам на I-м этапе проводилась таргетная терапия пазопанибом или эвероли-

мусом. После окончания курса предоперационного лечения выполнялась паллиативная нефрэктомия. Содержание транскрипционных и ростовых факторов изучено методом иммуноферментного анализа; активность протеасом и кальпаинов — флуориметрическим методом.

Результаты. Исходно высокие уровни экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 и ростового фактора VEGF в опухоли почки ассоциированы с хорошим прогнозом заболевания по шкале MSKCC. У этой категории больных на фоне лечения наблюдалось снижение экспрессии транскрипционных

факторов HIF-1, NF-κB p65, NF-κB p50, ростового фактора VEGF и активности протеасом. Выявленное повышение активности кальпаинов у больных с промежуточным прогнозом было ассоциировано с прогрессированием заболевания.

Заключение. Выделены дополнительные молекулярные показатели, повышающие информативность шкалы MSKCC, что позволяет с большей точностью предсказать возможный исход заболевания у больных метастатическим раком почки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МД-3637.2015.7.