

МАТЕРИАЛЫ

VII Всероссийской конференции по молекулярной онкологии

21–23 декабря 2022 г., Москва

MATERIALS

of the 7th All-Russian Conference on Molecular Oncology

Moscow, 21–23 December 2022

МАТЕРИАЛЫ VII ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

ГЕНОМИКА И ЭПИГЕНОМИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ	9
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРОГРЕССИИ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ ОПУХОЛЕЙ	28
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОПУХОЛЕЙ	58
МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ	84

MATERIALS OF THE 7TH ALL-RUSSIAN CONFERENCE ON MOLECULAR ONCOLOGY

GENOMICS AND EPIGENOMICS OF MALIGNANT LESIONS: FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS	9
MOLECULAR MECHANISMS OF PROGRESSION AND METASTATIC DISSEMINATION OF TUMORS	28
MOLECULAR DIAGNOSTIC OF TUMORS	58
MOLECULAR BIOLOGICAL APPROACHES TOWARDS ANTI-NEOPLASTIC TREATMENT	84

Список сокращений

АФК — активные формы кислорода	ОМЛ — острый миелоидный лейкоз
ВКМ — внеклеточный матрикс	ОР — относительный риск
ВНВ — внеклеточные нановезикулы	ОСК — опухолевые стволовые клетки
ВЭБ — вирус Эпштейна — Барр	ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ГИСО — гастроинтестинальные стромальные опухоли	ОШ — отношение шансов
ДИ — доверительный интервал	ПКР — почечно-клеточный рак
ДК — дендритные клетки	ПРГШ — плоскоклеточный рак головы и шеи
ДМГ — 1,2-диметилгидразин	ПЦР — полимеразная цепная реакция
днРНК — длинные некодирующие РНК	РЖ — рак желудка
ЗНО — злокачественные новообразования	РЛ — рак легкого
ИГХ — иммуногистохимический	РМЖ — рак молочной железы
ИКТ — иммунные контрольные точки	РПЖ — рак предстательной железы
ИЛ — интерлейкин	РПК — рак прямой кишки
ИФА — иммуноферментный анализ	РШМ — рак шейки матки
ИФН — интерферон	РЩЖ — рак щитовидной железы
КРР — колоректальный рак	РЯ — рак яичника
ЛТ — лучевая терапия	скПКР — светлоклеточный почечно-клеточный рак
МА — моноклональные антитела	ФДТ — фотодинамическая терапия
МГБ — мультиформная глиобластома	ФНО- α — фактор некроза опухолей α
МЛУ — множественная лекарственная устойчивость	ХТ — химиотерапия
ММ — множественная миелома	ЦОК — циркулирующие опухолевые клетки
мРНК — матричная РНК	ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход
МЭП — мезенхимально-эпителиальный переход	FLIM — fluorescence lifetime imaging (флуоресцентный времяразрешенный имиджинг)
НАД(Ф)Н — суммарное обозначение восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДН) и его фосфорилированной формы (НАДФН)	PARP1 — поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1
НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого	PD-1 — programmed cell death protein 1 (белок программированной клеточной гибели 1)
НХТ — неоадъювантная химиотерапия	PD-L1 — programmed cell death ligand 1 (лиганд белка программированной клеточной гибели 1)
ОАМ — опухолеассоциированные макрофаги	P-gr — P-гликопротеин

Геномика и эпигеномика злокачественных новообразований: фундаментальные и прикладные аспекты

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МОНОТЕРАПИИ НИВОЛУМАБОМ У БОЛЬНЫХ МЕТАСТАТИЧЕСКИМ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

Н.Н. Бабышкина^{1,2}, Т.А. Дронова¹, Н.О. Попова¹,
А.Ю. Добродеев¹, Д.Н. Костромицкий¹, Н.В. Чердынцева¹

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

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск
e-mail: nbabyshkina@mail.ru

Ключевые слова: метастатический колоректальный рак, ниволумаб, диссоциированный ответ

Введение. В настоящее время иммунотерапия ингибиторами контрольных точек, такими как ипилиумаб, пембролизумаб и ниволумаб, одобрена для использования у пациентов с метастатическим колоректальным раком (КРР) с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-high) или нарушением механизма репарации неспаренных оснований ДНК (dMMR). Однако прогностические перспективы, а также потенциальные молекулярные критерии выбора оптимального режима терапии остаются дискуссионными.

Цель исследования — систематический анализ данных современной литературы и результатов собственных исследований эффективности применения ниволумаба в монорежиме у больных метастатическим КРР.

Материалы и методы. Анализ мутаций в кодонах 12 и 13 гена *KRAS*, а также мутации V600E гена *BRAF* выполнен методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Детекция белков системы MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) проведена иммуногистохимически (ИГХ), а также методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим фрагментным анализом. Для оценки эффективности терапии использованы шкалы RECIST v1.1 и iRECIST.

Результаты. Показано, что монотерапия ниволумабом улучшает показатели выживаемости у пациентов с опухолями MSI-high/dMMR, которые прогрессировали на фоне стандартной химиотерапии (ХТ). В многочисленных клинических исследованиях указано на развитие атипичных реакций ответа на ниволумаб у больных со злокачественными заболеваниями

разных локализаций. Собственный опыт демонстрирует случай развития диссоциированного ответа с полной патоморфологической регрессией метастатических очагов в легких и сопутствующим появлением поражения парааортальных лимфатических узлов после 8 мес лечения ниволумабом у пациента с MSI-high/dMMR метастатическим КРР.

Заключение. Последующая детальная молекулярно-генетическая характеристика первичной опухоли и метастатических очагов позволит определить биомаркеры иммуноспецифического действия, в том числе биомаркеры диссоциированного ответа на ниволумаб в целях повышения эффективности его применения.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда (РНФ)
(грант № 22-15-00212).*

РОЛЬ УНАСЛЕДОВАННЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ РЕПАРАЦИИ ДНК В ФОРМИРОВАНИИ РИСКА РАКА ЛЕГКОГО У РАБОЧИХ УГОЛЬНЫХ ШАХТ КУЗБАССА

М.Л. Баканова¹⁻³, В.И. Минина^{1,3}, Я.А. Савченко^{1,3}

¹ФГБНУ «ФИЦ угля и углехимии СО РАН», Кемерово;

²ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, Кемерово;

³ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», Кемерово

e-mail: mari-bakano@ya.ru

Ключевые слова: рак легкого, *hOGG1*, *PARP1*, *APEX1*, *XPB*, шахтеры

Введение. Воздействие комплекса факторов производственной среды предприятий угольного цикла может привести к возникновению различных легочных заболеваний, в том числе такого, как злокачественное новообразование (ЗНО) легкого (Taeger, 2015). С формированием рака легкого (РЛ) нередко ассоциируют варианты генов, осуществляющих контроль репарации ДНК (Bakanova, 2013).

Цель исследования — анализ вариантов генов репарации ДНК (*hOGG1* (rs1052133), *PARP1* (rs1136410), *APEX1* (rs1130409), *XPB* (rs13181)) в связи с риском формирования РЛ у рабочих угольных шахт Кузбасса.

Материалы и методы. Обследованы 214 рабочих угольных шахт Кузбасса, обратившихся для диагностики и лечения в Кемеровский областной онкологический диспансер (диагноз РЛ), и 300 здоровых рабочих угольных шахт Кузбасса, подобранных с учетом возраста, пола, этнической принадлежности и статуса курения, которые составили группу сравнения. Все испытуемые подписали согласие на участие в исследовании.

Варианты генов *hOGG1* (rs1052133), *PARP1* (rs1136410), *APEX1* (rs1130409), *XPB* (rs13181) изучали методом аллель-специфической ПЦР (НПФ «Литех», Москва). Статистическую обработку материала проводили с помощью программ SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) и Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты. Частоты генотипов и аллелей исследованных генов соответствовали равновесию Харди–Вайнберга как в группе больных РЛ, так и в группе сравнения. Выявлены ассоциации риска развития РЛ с генотипом GG гена *APEX1* (относительный риск (ОР) 1,59; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,01–2,51; $p = 0,04$ для рецессивной модели), с генотипом GG гена *XPB* (ОР 2,20; 95 % ДИ 1,52–3,20; $p = 0,0001$ для доминантной модели). В ряде исследований показано, что носители G-варианта аллеля гена *APEX1* обладают повышенным риском развития рака желудка (РЖ), РЛ (Gu et al., 2011; Cai et al., 2014). Аллель G гена *XPB* идентифицируется с более высоким уровнем аддуктов ДНК, низкой репарационной способностью, увеличением частоты хроматидных разрывов (Au et al., 2003) и ассоциируется с повышенным риском развития онкопатологий по данным литературы (Yuan et al., 2011; Кузнецова и др., 2011; Wu, Ding, 2014; Savina et al., 2017).

Закключение. Таким образом, полученные данные указывают на возможную роль вариантов генов *APEX1* (rs1130409), *XPB* (rs13181) в формировании риска РЛ у рабочих угольных шахт Кузбасса. Дальнейшие исследования сделают возможным создание подходов к выявлению групп повышенного риска РЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания (ГЗ № 0286-2022-0008).

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ETV6-NTRK3-ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК К ДЕЙСТВИЮ ЛАРОТРЕКТИНИБА

У.А. Боярских, Т.А. Савостьянова, И.П. Оскорбин,
А.Э. Кель, А.А. Кечин, М.Л. Филипенко
ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск
e-mail: boyarskih.u@gmail.com

Ключевые слова: ETV6-NTRK3, ларотректиниб, резистентность

Введение. Разработка, регистрация и дальнейшее применение таргетных препаратов энтректиниб и ларотректиниб для лечения опухолей, возникающих в результате онкогенной стимуляции химерными белками рецепторов нейротрофинов (TRK), обусловили рост интереса к механизмам формирования резистентности опухолевых клеток к ингибиторам TRK в процессе лечения.

Цель исследования — получение клеточной модели TRK-опосредованной злокачественной трансформации и изучение механизмов резистентности ETV6-NTRK3-трансформированных клеток к действию ларотректиниба.

Материалы и методы. Для создания клеточной линии, несущей химерный ген ETV6-NTRK3 (HFF-EN), использовали трансфекцию фибробластов рекомбинантными лентивирусами. Трансформацию валидировали иммунохимическим и мРНК анализом экспрессии NTRK3. Для получения модели развития устойчивости к ларотректинибу при NTRK-зависимом раке использовали пассажи линии при постепенно увеличивающейся концентрации ларотректиниба. Мутации тирозинкиназного домена NTRK3 выявляли секвенированием по Сэнгеру фрагментов кДНК.

Результаты. Нами была получена клеточная линия HFF-EN, в которой уровень транскрипции химерного гена ETV6-NTRK3 был сопоставим с уровнем транскрипции гена домашнего хозяйства ACTB, экспрессия белка ETV6-NTRK3 была подтверждена иммуноблоттингом. Сравнение кривых доза–эффект фибробластов и HFF-EN-клеток показало ~38-кратное увеличение чувствительности HFF-EN к ларотректинибу. Для моделирования развития устойчивости к ларотректинибу при NTRK-зависимом раке были получены резистентные к ларотректинибу клоны. В 5 клонах обнаружена мутация p.G623E с.868G>A, в 1 клоне, демонстрирующем значительно меньшую резистентность, выявлена мутация p.R582W с.1744C>T, ранее не описанная как мутация резистентности.

Нами было проведено полнотранскриптомное профилирование контрольных фибробластов и фибробластов, обработанных ларотректинибом. В результате была показана активация ряда сигнальных путей, вовлеченных в канцерогенез. Среди них сигнальные пути Wnt, HIF-1α, p38α, IL7. Потенциально они также могут участвовать в формировании лекарственной устойчивости клонов ETV6-NTRK3-трансформированных клеток под действием ларотректиниба.

Закключение. Полученные данные могут в дальнейшем быть использованы для более полного понимания механизмов формирования резистентности к ингибиторам TRK и разработки новых препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-15-00418 «Исследование молекулярных механизмов развития резистентности клеток опухолей с химерными NTRK-белками к ингибиторам тирозинкиназ in vitro»).

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ВАРИАНТА САЙТА СПЛАЙСИНГА C.-106+5G>A ГЕНА *MRE11* В ПАТОГЕНЕЗЕ РАКА ЯИЧНИКА

Я.В. Валова^{1,2}, Э.Т. Мингажева¹, Д.С. Прокофьева¹,
А.В. Коростелева¹, О.К. Харина¹, Э.К. Хуснутдинова^{1,3}

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа;

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

³Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр РАН», Уфа
e-mail: q.juk@yandex.ru

Ключевые слова: спорадический рак яичника, наследственный рак яичника, вариант сайта сплайсинга

Введение. На сегодняшний день рак яичника (РЯ) является одной из наиболее часто диагностируемых опухолей женской репродуктивной системы, по частоте встречаемости уступая лишь раку эндометрия и раку шейки матки (РШМ). В то же время именно РЯ считается основной причиной летальности от ЗНО среди женского населения.

Цель исследования — анализ роли варианта сайта сплайсинга с.-106+5G>A гена *MRE11* в патогенезе РЯ у женщин, проживающих в Республике Башкортостан.

Материалы и методы. В качестве материала исследования были использованы образцы ДНК, выделенные из венозной крови больных наследственными формами РЯ ($n = 58$), больных с диагнозом РЯ ($n = 207$) и женщин без онкологических заболеваний на момент забора крови (контрольная группа; $n = 301$), проживающих в Республике Башкортостан. Генотипирование проводили методом анализа кривых плавления с высокой разрешающей способностью (HRM) на приборе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия).

Результаты. Поиск с.-106+5G>A в группе больных РЯ и здоровых женщин выявил 2 (0,97 %) носительниц изучаемого варианта среди пациенток со спорадическим РЯ, 1 (1,7 %) носительницу среди пациенток с наследственными формами РЯ и 1 (0,33 %) — среди здоровых женщин в гетерозиготном состоянии. Таким образом, генетический вариант с.-106+5G>A/*MRE11* чаще встречался в группе больных РЯ по сравнению с контрольной группой, однако выявленные различия не достигли уровня статистической значимости ($p > 0,05$).

Заключение. В результате исследования нами не выявлено ассоциаций варианта с.-106+5G>A/*MRE11* с риском развития РЯ у женщин, проживающих в Республике Башкортостан. Однако преобладание данного изменения в группе больных РЯ говорит о необходимости проведения репликативных исследований на расширенной выборке.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных

исследований (РФФИ) № 20-34-90003, гранта Республики Башкортостан (РБ) № 210/1, гранта РФ МК-3208.2022.1.4, по государственному заданию Минобрнауки России (FZWU2020-0027).

СИНХРОННО-МЕТАХРОННЫЕ ОПУХОЛИ ТОЛСТОЙ КИШКИ У ПАЦИЕНТКИ С МНОЖЕСТВЕННЫМИ ПЕРВИЧНЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ: ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ

В.Н. Вербенко¹, А.Д. Шахматова¹, Е.Д. Мирлина¹,
С.С. Емельянова¹, Д.Н. Хмелькова², Г.М. Бутрович¹,
Ю.В. Киль¹, И.Л. Поляцкий³, А.С. Артемьева³,
А.В. Гуляев³, О.А. Вострюхина¹

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

²АО «Центр генетики и репродуктивной медицины «Генетико», Москва;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург
e-mail: verbenko@pnpi.nrcki.ru

Ключевые слова: первично-множественные опухоли, полноэкзомное секвенирование ДНК, патогенные соматические мутации, пути прогрессирования колоректального рака

Введение. Наследственная форма неполипозного КРР, известная как синдром Линча, ассоциирована с увеличенным риском ЗНО, из которых наиболее распространены колоректальные карциномы. Пациенты с синдромом Линча зачастую несут герминальные мутации в генах системы коррекции неспаренных оснований ДНК (КНО). Дальнейшие пути прогрессирования заболевания по-прежнему остаются предметом поиска ввиду своего разнообразия и разной чувствительности к терапевтическим препаратам.

Цель исследования — анализ 4 синхронно-метакронных аденокарцином толстой кишки у пациентки с множественными первичными новообразованиями и герминальным патогенным вариантом гена *MSH6*. Мутационные профили этих опухолей были изучены для выяснения и подтверждения независимого их происхождения с помощью полноэкзомного секвенирования ДНК (WES).

Материалы и методы. Парафиновые срезы аденокарцином прямой, поперечной ободочной кишки, нисходящего отдела ободочной и слепой кишки предоставлены патолого-анатомической лабораторией НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург). ДНК выделяли из парафиновых срезов опухолей с помощью набора GeneJET FFPE DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Затем ДНК была фрагментирована ультразвуком с помощью ME220 (Covaris, США) до среднего размера 180–280 п.н. Библиотеки ДНК были получены с применением реагентов для захвата

экзома SureSelect Human All Exon V7 (Agilent Technologies, США). Для секвенирования экзома использовалась платформа Illumina NovaSeq 6000 (Illumina Inc., США). Библиотеки ДНК были секвенированы компанией «Генетико» (Россия).

Результаты. Анализ данных WES в 3 из 4 случаев выявил патогенные соматические мутации в генах *MSH6*, *TP53*, *ARID1A* и *BLM*, в 2 случаях — патогенные соматические мутации в генах *KRAS*, *TGFBR2*, *PIK3CA* и *ZNRF3*. К уникальным мутациям, характеризующим особенности каждой опухоли, относятся варианты генов *APC*, *ATM*, *FBXW7*, *RNF43*, *CDH1*, *CTNNB1* и *NF1*. Мутации были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Была предложена схема озлокачествления опухолей начиная с дефицита КНО до разрегулирования сигнального пути WNT/ β -катенин.

Заключение. Несколько критических генов и путей, таких как WNT, RAS/MAPK, PI3K, TGF- β , P53, КНО и изменения NF1 в разных сочетаниях участвуют в инициации и прогрессии опухолей, что свидетельствует об их первично-множественной природе. Нарушение КНО, определяемое герминальным вариантом гена *MSH6*, приводит к накоплению мутаций в генах-онкосупрессорах в течение длительного времени, свободного от клинических проявлений. Это требует постоянного наблюдения далеко за пределами 5-летней ремиссии.

ДЕТЕКЦИЯ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *TP53* У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ МИЕЛОИДНЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ ПОЖИЛОГО И СТАРЧЕСКОГО ВОЗРАСТА

А.В. Виноградов¹, С.В. Сазонов^{2,3}, А.В. Резайкин^{2,3},
А.Г. Сергеев^{2,4}

¹ГАОУ СО «Свердловская областная клиническая
больница № 1», Екатеринбург;

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Екатеринбург;

³ГАОУ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
Екатеринбург;

⁴Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций ФБУН
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора, Екатеринбург
e-mail: vinogradov-av@ya.ru

Ключевые слова: ген *TP53*, острый миелоидный лейкоз

Введение. Мутации гена *TP53* являются одними из самых распространенных при различных ЗНО. При этом они, как правило, считаются важным генетическим фактором неблагоприятного прогноза.

Цель исследования — определить частоту мутаций в гене *TP53* у больных острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) пожилого и старческого возраста методами прямого и высокопроизводительного секвенирования (NGS).

Материалы и методы. Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 62 больных ОМЛ пожилого и старческого возраста, получавших лечение в Свердловском областном гематологическом центре в период с 2008 по 2022 г. С морфологическим вариантом М0 наблюдали 1 пациента, М1 — 8, М2 — 31, М3 — 2, М4 — 14, М5 — 1, М6 — 2, с острым гибридным лейкозом (миело-/В-линейный) — 1, острым миелофиброзом — 1, бластной плазмочитоидной дендритно-клеточной опухолью — 1. Средний возраст больных составил 66,9 года. Детекцию точечных мутаций в гене *TP53* проводили с использованием прямого автоматического секвенирования ($n = 50$) и массового параллельного секвенирования ($n = 12$). Прямое автоматическое секвенирование осуществляли на генетических анализаторах. Праймеры для прямого секвенирования кДНК описаны нами ранее и охватывали с 4-го по 11-й экзон гена *TP53*. Высокопроизводительное секвенирование проводили с использованием секвенатора MiSeqDX и набора QIAseq Targeted DNA Human Myeloid Neoplasms Panel.

Результаты. Патогенетически значимые генные мутации *TP53* выявлены обоими методами в лейкозных клетках 14,5 % больных ОМЛ пожилого и старческого возраста. При этом частоты мутаций, установленные методами прямого автоматического секвенирования и NGS, составили 16,0 и 8,3 % соответственно. Мутации в 7 (11,3 %) случаях были представлены несинонимичными заменами, в 1 (1,6 %) — делецией, в 1 (1,6 %) — тандемной дупликацией. В 2 (3,2 %) случаях одновременно определялись по 2 несинонимичные нуклеотидные замены в гене *TP53* в каждом исследуемом биообразце. Морфологические варианты ОМЛ, при которых выявлялись точечные мутации в гене *TP53*, были следующими: М2 — 4, М4 — 2, М6 — 2. Преобладающими вариантами хромосомных мутаций, ассоциированных с мутациями *TP53* при ОМЛ, были комплексные аномалии кариотипа ($n = 7$), в 1 случае определялся нормальный кариотип. В 1 наблюдении вариант кариотипа лейкозных клеток уточнить не удалось из-за недостаточного количества метафазных пластинок в исследуемой пробе аспирата костного мозга.

Заключение. Таким образом, в онкогенезе ОМЛ у больных пожилого и старческого возраста мутации в гене *TP53* являются частыми молекулярными событиями, имеющими тенденцию к комбинированию с комплексными хромосомными aberrациями. Указанные генетические особенности необходимо учитывать при определении лечебной тактики у больных ОМЛ в возрасте старше 60 лет.

РОЛЬ АРИЛ-ГИДРОКАРБОНОВОГО РЕЦЕПТОРА В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ ЛЕГКОГО

Л.Ф. Гуляева^{1,2}, Г.Е. Чернова², Д.А. Ахметова²,
В.В. Конончук¹, Т.С. Калинина¹, В.О. Пустыльяк^{1,2},
В.В. Козлов^{1,3}

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

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», Новосибирск;

³ГБУЗ НСО «Новосибирский областной клинический
онкологический диспансер», Новосибирск
e-mail: lfgulyaeva@gmail.com

Ключевые слова: плоскоклеточный рак легкого, аденокарцинома легкого, курение, AhR

Цель исследования — комплексный анализ влияния курения на выживаемость пациентов, а также молекулярно-генетическое исследование плоскоклеточного РЛ и аденокарциномы РЛ у курящих и некурящих пациентов с акцентом на определение арил-гидрокарбонного рецептора (AhR) и его генов-мишеней.

Материалы и методы. Проведена статистическая обработка (пакет данных StatSoft Inc. и Statistica) анализа выживаемости пациентов в Новосибирской области с плоскоклеточным РЛ ($n = 3007$) и аденокарциномой РЛ ($n = 3049$) за 2015–2020 гг. Выполнен *in silico* анализ геномных данных TCGA. Определяли уровни экспрессии генов-мишеней AhR в опухолях с помощью метода ОТ-ПЦР и ИГХ-анализа.

Результаты. Длительное курение является фактором, существенно сокращающим медиану выживаемости: в 1,92 раза при плоскоклеточном РЛ и в 1,32 раза при аденокарциноме РЛ. Результаты исследования *in silico* подтвердили влияние курения на выживаемость пациентов в зависимости от экспрессии AhR и некоторых регулируемых им генов (*NR1P1*, *MAML2*, *TMEM106B* и др.). Уровни экспрессии микроРНК miR-342, регулируемой AhR, и miR-181a, потенциально регулирующей экспрессию PD-L1, были в 2–3 раза ниже в образцах плоскоклеточного РЛ. Выявлены ассоциация экспрессии PD-L1-регулирующих miR-181a, miR-155 с размером опухоли и наличием метастазов в лимфатических узлах и ассоциация уровня экспрессии miR-155, miR-181a, miR-93 со статусом PD-L1 у пациентов с плоскоклеточным РЛ. Наблюдалась тенденция к снижению уровня *PTEN* у пациентов с высокой экспрессией PD-L1, что соответствовало увеличению экспрессии miR-93, miR-155, miR-181a, для которых ген *PTEN* является мишенью. Показано, что экспрессия этого гена различается у курящих и некурящих пациентов.

Заключение

1. Курение меняет биологию опухоли по сравнению с опухолью у некурящих пациентов и значительно снижает выживаемость. Результаты исследований *in silico* подтвердили влияние курения на выживаемость пациентов с НМРЛ в зависимости от экспрессии AhR и некоторых регулируемых им генов, что

является перспективным для разработки стратегии таргетной терапии.

2. Экспрессия AhR-регулируемых miR-342 и miR-181a снижена в 3 раза в опухолях курильщиков.

3. Впервые выявлена ассоциация уровня экспрессии miR-155, miR-181a и miR-93 со статусом PD-L1 у пациентов с плоскоклеточным РЛ, что указывает на возможность использования их в качестве маркеров для иммунотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-15-00065 «Поиск новых мишеней для диагностики и терапии плоскоклеточного рака легкого»).

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ PD-L1 В ВЭБ-АССОЦИИРОВАННОМ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Н.В. Данилова¹, Т.Н. Сотникова², П.Г. Мальков¹,
Д.В. Калинин³, Т.В. Полушкина²

¹Медицинский научно-образовательный центр
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²ГБУЗ г. Москвы «ГКБ им. И.В. Давыдовского ДЗМ», Москва;

³ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского»
Минздрава России, Москва
e-mail: natalyadanilova@gmail.com

Ключевые слова: иммуногистохимия, PD-L1, EBER, вирус Эпштейна–Барр, опухолевые клетки, рак желудка

Введение. Самостоятельный механизм опухолевой иммунорезистентности определяется способностью некоторых опухолей экспрессировать на своей поверхности лиганды белка программированной клеточной гибели 1 (programmed cell death ligand 1, PD-L1). В настоящее время активно изучается возможная связь экспрессии PD-L1 с эпидемиологическими, клинικο-морфологическими и молекулярно-генетическими особенностями РЖ и возможностью дальнейшей таргетной иммунотерапии.

Цель исследования — оценить частоту выявления экспрессии PD-L1 в аденокарциномах желудка, ассоциированных с вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ), а также уточнить возможную связь экспрессии PD-L1 с клинικο-морфологическими характеристиками опухоли и ее влияние на прогноз заболевания.

Материалы и методы. Для исследования были отобраны образцы операционного материала от 127 пациентов разного возраста с РЖ, имевшего различные клинικο-морфологические характеристики. Каждый образец был окрашен методом гибридизации *in situ* с использованием праймеров к малым вирусным РНК ВЭБ (EBER), а также с антителами к PD-L1 (клоны SP263, SP142). Полученные результаты были сопоставлены с основными клинικο-морфологическими характеристиками РЖ, данными о выживаемости пациентов и наличием маркеров ВЭБ.

Результаты. Среди ВЭБ-ассоциированного РЖ частота выявления положительного PD-L1-статуса SP263

составила 100 %, а PD-L1-статуса SP142 – 76,9 %. Таким образом, положительный PD-L1-статус SP263, SP142 значимо чаще выявляется в ВЭБ-ассоциированных карциномах желудка. Установлено, что пациенты с положительным PD-L1-статусом в ВЭБ-ассоциированных карциномах желудка отличаются более молодым возрастом (средний возраст 56,3 года для SP263 и 55,6 года для SP142), принадлежностью к мужскому полу. Также в данной группе преобладают проксимальная локализация опухолей, язвенная форма роста, тубулярный гистологический тип, промежуточный подтип по P. Lauren. Общая медиана выживаемости пациентов с наличием положительного PD-L1-статуса SP263 в ВЭБ-ассоциированных карциномах желудка составила 35 мес, пациентов с наличием положительного PD-L1-статуса SP142 – 25 мес. Медиана выживаемости пациентов с положительным PD-L1-статусом SP142 выше по сравнению с общей медианой выживаемости пациентов с отрицательным PD-L1-статусом в ВЭБ-ассоциированных карциномах желудка, составляющей 15 мес.

Заключение. Отдельно взятый PD-L1-статус не оказывает значимого влияния на прогноз у пациентов с РЖ, в том числе в группе ВЭБ-ассоциированных карцином, и может рассматриваться только в совокупности с «классическими» клинико-морфологическими характеристиками, в первую очередь со стадией опухолевого процесса.

ОСНОВА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КЛАССИФИКАЦИИ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТРОЙНЫМ НЕГАТИВНЫМ ФЕНОТИПОМ

М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, Н.В. Литвяков
НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: imk1805@yandex.ru

Ключевые слова: трижды негативный рак молочной железы, соматические мутации, выживаемость

Введение. В современной онкологической практике до настоящего времени не представлено классификации для трижды негативного рака молочной железы (ТН РМЖ), имеющей высокую прогностическую значимость. Более того, отсутствует «мутационная (tumor mutation) классификация» ТН РМЖ.

Цель работы – представление нового подхода к молекулярно-генетической классификации ТН РМЖ с прогнозированием исхода у больных.

Материалы и методы. В работе использованы данные 3 баз – TCGA, METABRIC, МСК. По данным TCGA частота мутаций оценивалась у 171 пациентки с ТН РМЖ. В качестве группы контроля использовали данные о частоте мутаций у 774 больных раком молочной железы (РМЖ) других молекулярных подтипов (не-ТН РМЖ). Для дополнительного анализа также

использовалась база METABRIC с включением 270 пациенток с ТН РМЖ.

Результаты. Определены гены, соматические мутации которых наиболее распространены при ТН РМЖ по сравнению с не-ТН РМЖ (TCGA), и частота генных мутаций (METABRIC). Согласно данным диаграммы Венна, 13 генов были общими для ТН РМЖ и не-ТН РМЖ (*HMCN1, RYR2, FLG, SPTA1, USH2A, TTN, SYNE1, ABCA13, KMT2C, ZFHX4, TP53, RYR1, MUC16*), 24 гена были уникальными для ТН РМЖ (*PLXNA2, ASNSD1, F5, FLG2, ZNF687, CACNA1B, TG, DYNC2H1, FAT3, RNF213, DNAH17, HYDIN, ABCA9, AHNK, USP32, SALL1, PCNT, BRCA1, NOL6, DNAH5, LAMA1, VWF, TNRC18, MXRA5*) с частотой мутаций более 5 %. При сравнении только соматических мутаций ТН РМЖ по базам TCGA и METABRIC определено пересечение по 4 генам: *DNAH5, TG, AHNK, BRCA1*.

Согласно данным литературы, частота мутации гена *DNAH5* при ТН РМЖ достигает 13 %. Ген *AHNK* действует как супрессор опухоли, негативно регулируя пролиферацию клеток при ТН РМЖ. У пациенток с мутацией *BRCA1* при ТН РМЖ наблюдается более высокая степень злокачественности и большая опухолевая масса (>2 см). Ген *TG* играет роль опухолевого супрессора посредством Nrf2-противовоспалительного ответа.

Далее проанализирована выживаемость больных ТН РМЖ в зависимости от мутационного статуса. Из 3 баз данных выделены все пациенты с ТН РМЖ, определены 2 группы: 1-я – только с мутацией *PIK3CA*, 2-я – с одиночными/множественными мутациями генов *DNAH5, TG, AHNK, BRCA1* без мутаций *PIK3CA*. Показано, что в группе с наличием мутаций 4 генов медиана общей выживаемости превышает аналогичную у пациенток с мутацией *PIK3CA* более чем в 2 раза (211,2 и 104,3 мес соответственно). Медиана безрецидивной выживаемости в группе с мутацией *PIK3CA* составила 67 мес, в группе с 4 мутациями не достигнута.

Заключение. Показана высокая прогностическая значимость определения наличия мутаций генов *DNAH5, TG, AHNK, BRCA1* в отношении общей и безрецидивной выживаемости пациенток с ТН РМЖ.

Полученные данные могут быть использованы в качестве классификации ТН РМЖ на основе мутаций для прогнозирования исхода у пациентов и определения тактики лечения в адъювантном режиме.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-25-00499).

ТЕХНОЛОГИЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ OXFORD NANOPORE: ПЕРСПЕКТИВЫ И ВОЗМОЖНОСТИ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

А.А. Кечин^{1,2}, В.С. Борова^{1,2}, М.А. Корюков^{1,2},
К.В. Субботина¹, У.А. Боярских¹, А.В. Тархов³,
М.Л. Филипенко¹

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

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет»,
Новосибирск;

³ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница № 1»,
Новосибирск

e-mail: aa_kechin@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: секвенирование, *BRCA*, рак яичника

Введение. В молекулярной онкологии требуется выявлять как герминальные мутации, повышающие риск развития определенных типов онкологических заболеваний, так и соматические, являющиеся частью механизмов канцерогенеза и мишенями для таргетных препаратов.

Цель исследования — отработка подходов и оценка возможностей в технологии секвенирования с протяженными прочтениями Oxford Nanopore в области молекулярной онкологии.

Материалы и методы. Образцы ДНК были выделены из лейкоцитов крови пациентки с герминальным патогенным вариантом *BRCA1* с.5266dup и свежемороженой опухолевой ткани другой пациентки с патогенным вариантом *BRCA1* с.4035del стандартным фенол-хлороформным методом. Для обеих пациенток был установлен диагноз серозной аденокарциномы яичника и выявлены все вариации в кодирующих последовательностях генов *BRCA1* и *BRCA2*. Приготовление библиотек осуществляли наборами реагентов Oxford Nanopore, секвенирование — на приборе MinION: 1 ячейка — для образца из лейкоцитов крови, 1 ячейка — для образца из опухолевой ткани. Конвертацию сигнала в читаемые нуклеотиды проводили программой Guppy.

Результаты. При секвенировании в течение 48 ч было получено 4,12 млн прочтений с суммарной длиной $15,8 \times 10^9$ п. о. для образца из лейкоцитов крови и 9,46 млн прочтений с суммарной длиной $13,8 \times 10^9$ п. о. для образца из опухоли. С помощью ROC-анализа были определены оптимальные параметры выявления точечных вариаций программой PISCES: минимальное качество основания — 6, минимальное качество варианта — 2, минимальное покрытие — 4. Площадь под ROC-кривой составила 93 %. Важным результатом стало верное определение для обоих исследуемых образцов патогенных вариантов в гене *BRCA1*. При поиске крупных геномных перестроек с использованием программ Sniffles и NanoVar были выявлены проблемы с выдачей некорректной информации о перестройках:

координаты границ, процента и абсолютного числа прочтений, подтверждающих перестройку, из-за чего невозможно выбрать наиболее вероятные перестройки для последующей валидации с помощью ПЦР.

Заключение. Для точечных мутаций были получены удовлетворительные результаты даже для низкого покрытия (4–5×). Однако для крупных геномных перестроек требуется разработка новых программ.

Работа выполнена при поддержке гранта
Президента МК-4082.2021.1.4.

Обработка и анализ данных выполнены
с применением вычислительных мощностей
информационно-вычислительного кластера ФГАОУ
ВО «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет».

НОВЫЕ МАРКЕРЫ ПЕРЕСТРОЙКИ ГЕНОВ *NTRK* В ТРАНСКРИПТОМНЫХ ПРОФИЛЯХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.А. Кечин^{1,2}, М.А. Корюков^{1,2}, М.А. Смертина¹,
В.С. Борова^{1,2}, И.П. Оскорбин¹, А.А. Иванов³,
С.Ю. Бахарев³, У.А. Боярских¹, Н.Е. Кушлинский⁴,
М.Л. Филипенко¹

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

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», Новосибирск;

³КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер»,
Барнаул;

⁴ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: aa_kechin@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: опухоль головного мозга, рак щитовидной железы, *NTRK*

Введение. При наличии перестроек генов *NTRK* (*NTRK1*, *NTRK2* или *NTRK3*) применяются таргетные ингибиторы энтрактиниб и ларотректиниб вне зависимости от локализации опухоли.

Цель исследования — сравнение изменений транскрипционной активности генов в опухолях головного мозга (ОГМ) и рака щитовидной железы (РЩЖ) с перестройкой (*NTRK*⁺) и без перестройки (*NTRK*[−]) генов *NTRK*.

Материалы и методы. Использовали общедоступные транскрипционные данные из баз TCGA (образцы опухоли) и GEO (образцы здоровой ткани). Анализ данных проводили с применением пакета R DESeq2, а также собственных Python-скриптов. Валидацию выявленных дифференциально экспрессирующихся генов выполняли с помощью количественной ПЦР на выборке образцов РЩЖ.

Результаты. Для всех групп образцов (ОГМ *NTRK*⁺/*NTRK*[−], РЩЖ *NTRK*⁺/*NTRK*[−]) была показана активация одинаковых сигнальных и метаболических путей, связанных с ростом и пролиферацией клетки. В то же время было выявлено увеличение уровня экспрессии

гена *JUN*, входящего в сигнальный путь нейротрофинов, в образцах $NTRK^+$ по сравнению с $NTRK^-$: в 1,6 раза для ОГМ ($p = 0,239$) и в 2,5 раза для РЩЖ ($p = 0,003$), а для образцов РЩЖ — также увеличение уровня экспрессии *ERBB4* и многих других генов, входящих в сигнальные пути, регулируемые *ERBB4*. В образцах ОГМ $NTRK^+$ количество мРНК транскриптов *ERBB4*, наоборот, было ниже в 14 раз, чем в образцах $NTRK^-$ ($p = 0,019$).

Другим отличием стало повышение уровня транскрипции 8 *HOX*-генов (в 85–725 раз; $p < 0,05$) в образцах ОГМ $NTRK^+$ по сравнению с $NTRK^-$.

Различие было найдено и по количеству микроРНК: в образцах РЩЖ $NTRK^+$ количество *miR-31* (в 3 раза; $p = 0,00071$) и *miR-542* (в 2,5 раза; $p = 0,00011$) было выше, чем в образцах $NTRK^-$. Для образцов ОГМ статистически значимые различия (более чем в 5 раз) были выявлены для *miR-10b* ($p = 0,0086$), *miR-182* ($p = 0,0474$) и *miR-21* ($p = 0,0439$). Для некоторых из выявленных генов в образцах РЩЖ различие в уровне транскрипции было подтверждено на независимой выборке: *ARX* (в 3,6 раза; $p = 0,002$), *TP63* (в 2,3 раза; $p = 0,02$), *ECM1* (в 5,3 раза; $p = 0,02$), *miR-31* (в 4,1 раза; $p = 0,004$) и *miR-542* (в 6,1 раза; $p = 0,002$).

Заключение. Выявленные различия могут быть использованы при поиске механизмов резистентности к энтректинибу и ларотрентибу, а также как новые маркеры наличия перестройки генов *NTRK* в опухолевой ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-15-00418 «Исследование молекулярных механизмов развития резистентности клеток опухолей с химерными NTRK-белками к ингибиторам тирозинкиназ in vitro»).

ЭРИТРОЦИТАРНАЯ ФРАКЦИЯ КРОВИ КАК ВОЗМОЖНЫЙ БИООБРАЗЕЦ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ЧЕЛОВЕКА ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ

И.В. Кононова¹, С.Н. Мамаева², В.А. Алексеев¹

¹ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», Якутск;

²ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», Якутск
e-mail: irinakon.07@mail.ru

Ключевые слова: диагностика, тест, опухолевая ДНК

Введение. Установлено, что внеклеточная опухолевая ДНК с конкретными молекулярно-генетическими характеристиками обладает потенциалом биомаркера для рака определенных локализаций. В основном внеклеточную опухолевую ДНК выделяют из плазмы или сыворотки, однако в этих фракциях крови ее доля незначительна. Из плазмы и сыворотки пациенток с РШМ часто выделяется также инфекционная ДНК.

Инфекционную ДНК способны нести на своей поверхности эритроциты. Было предположено, что при РШМ эритроциты также способны нести на своей поверхности ДНК человека в количестве, достаточном для ее детекции. Детекция фрагментов ДНК человека в эритроцитарной фракции, возможно, будет частью теста для выявления РШМ по анализу крови.

Цель исследования — установить, что у пациенток с РШМ из эритроцитарной фракции возможно выделить ДНК человека в количестве, достаточном для ее детекции, и сравнить частоту ее обнаружения в эритроцитарной фракции и плазме.

Материалы и методы. Выделили двухцепочечную ДНК из плазмы и эритроцитарной фракции, трижды отмытой в фосфатном буфере, у 5 пациенток с впервые выявленным РШМ, проживающих в Якутии и на момент забора крови не получавших лечения. Методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров PC03/04 выявили наличие фрагментов ДНК, кодирующих бета-глобин человека, и сравнили частоту их обнаружения в плазме и эритроцитарной фракции. Для того чтобы убедиться, что фрагменты ДНК бета-глобина находятся на поверхности клеток, дополнительно приготовили 3-й вид биоматериала — эритроцитарную фракцию, которую для разрушения рецепторных связей ДНК с поверхностью эритроцитов дополнительно обработали 0,25 % раствором трипсина.

Результаты. У всех 5 пациенток из плазмы и эритроцитарной фракции ДНК была выделена в достаточном количестве. В плазме фрагменты ДНК бета-глобина были выявлены у 3 (60 %) пациенток, у 2 (40 %) из них гель-электрофорез подтвердил наличие целевых ампликонов. В эритроцитарной фракции фрагменты ДНК бета-глобина обнаружены у всех 5 (100 %) пациенток, у 4 (80 %) из них гель-электрофорез подтвердил наличие целевых ампликонов. Интересно, что из эритроцитарной фракции, обработанной трипсином, также удалось извлечь двухцепочечную ДНК и ПЦР в реальном времени показала наличие фрагментов ДНК бета-глобина у 3 (60 %) пациенток, но гель-электрофорез не подтвердил этот результат ни в одном случае.

Заключение. Первые результаты показывают, что при РШМ возможно выделение ДНК человека из эритроцитарной фракции, и ее детекция в этой фракции крови может происходить чаще, чем в плазме. ДНК человека может находиться на поверхности эритроцитов в связанном состоянии. Необходимо продолжение исследования.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ВАРИАНТА C.985G>A В ГЕНЕ *MUTYH* У ЖЕНЩИН ИЗ РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

А.В. Коростелева¹, Я.В. Валова^{1,2}, О.К. Харина¹,
Э.Т. Мингажева¹, Д.С. Прокофьева¹, Э.К. Хуснутдинова^{1,3}

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа;

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

³Институт биохимии и генетики — обособленное
структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный
исследовательский центр РАН», Уфа
e-mail: korostelyova1806@gmail.com

Ключевые слова: рак яичника, наследственный рак яичника, спорадический рак яичника, ассоциативный анализ, *MUTYH*

Введение. В настоящее время ЗНО женской репродуктивной системы имеют наибольший удельный вес в структуре онкологической заболеваемости. Среди новообразований женских половых органов РЯ лидирует по числу смертей. Важную роль в патогенезе РЯ отводят генам, участвующим в репарации, так как различные нарушения функциональной активности белков в процессе восстановления повреждений ДНК могут привести к онкологическим заболеваниям. К числу таких генов относится *MUTYH*. Данный ген кодирует белок, участвующий в эксцизионной репарации ДНК и восстановлении окислительного повреждения гуанина.

Цель исследования — проведение ассоциативного анализа варианта с.985G>A гена *MUTYH* с риском развития РЯ у женщин, проживающих в Республике Башкортостан.

Материалы и методы. В качестве материала исследования были использованы образцы ДНК, выделенные из венозной крови больных наследственными формами РЯ ($n = 59$), спорадическим РЯ ($n = 242$) и женщин без онкологических заболеваний на момент забора крови (контрольная группа; $n = 317$), проживающих в Республике Башкортостан. Генотипирование проводили методом ПДРФ — анализа с использованием эндонуклеазы рестрикции HpySE526 I.

Результаты. В результате проведенного скрининга нами была обнаружена лишь 1 (1,69 %) носительница варианта с.985G>A в гене *MUTYH* среди больных наследственными формами РЯ. По этнической принадлежности носительница варианта башкирка. Согласно клиническим данным у пациентки в период постменопаузы диагностирована серозная аденокарцинома высокой степени злокачественности. Помимо мутации в гене *MUTYH* у женщины выявлена нонсенс-мутация с.1299T>G в гене *MSH6*. В ходе сбора анамнеза было установлено, что сестра пациентки также страдает РЯ.

Заключение. Таким образом, нами не выявлено ассоциаций с.985G>A в гене *MUTYH* с риском развития РЯ у женщин, проживающих в Республике Башкортостан.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №20-34-90003, гранта РБ №210/1, гранта РФ МК-3208.2022.1.4, по государственному заданию Минобрнауки России (FZWU2020-0027).

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯТОРНОЙ СЕТИ КОНКУРЕНТНО-ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ РНК У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЯМОЙ КИШКИ С РАЗНЫМ ОТВЕТОМ НА ЛУЧЕВУЮ ТЕРАПИЮ

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

ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону
e-mail: k.denees@yandex.ru

Ключевые слова: рак прямой кишки, лучевая терапия, радиорезистентность, длинные некодирующие РНК, микроРНК, экспрессия генов

Введение. Ежегодно рак прямой кишки (РПК) становится причиной более 310 тыс. смертей, что делает данную патологию лидирующей по показателю летальности среди других онкологических заболеваний. Одним из ключевых компонентов лечения РПК в настоящее время является лучевая терапия (ЛТ). Несмотря на постоянное совершенствование алгоритмов ЛТ РПК, полный клинический ответ достигается лишь у небольшого числа пациентов, что связано с формированием радиорезистентности клеток опухоли. Поэтому сейчас особую актуальность приобретает проведение комплексного исследования, интегрирующего различные молекулярных параметры и позволяющего как объяснить ряд молекулярных механизмов радиорезистентности, так и предложить перечень ее предикторов. Применение высокопроизводительного секвенирования доказало существование регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК, состоящей из длинных некодирующих РНК (днРНК), микроРНК и мРНК.

Цель исследования — анализ особенностей регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК у больных РПК, резистентным и чувствительным к ЛТ.

Материалы и методы. Исследование было выполнено с включением 300 пациентов с диагностированным РПК. ЛТ проводили на линейном ускорителе частиц Novalis TX по алгоритму: разовая очаговая доза 2,4 Гр до суммарной очаговой дозы 54,0 Гр. Для выделения РНК использовали парные фрагменты биопсии условно нормальных и опухолевых тканей прямой кишки, полученные при видеокOLONоскопии. Перечень генетических локусов, микроРНК и днРНК был сформирован с использованием биоинформатического анализа открытых баз данных. Был проведен биоинформатический поиск потенциальных взаимодействий между исследуемыми мРНК, микроРНК и днРНК. Представленность транскриптов мРНК, микроРНК и днРНК оценивали методом количественной ПЦР

в реальном времени. Значимость межгрупповых различий определяли с использованием критерия Манна–Уитни (поправка Бонферрони).

Результаты. Анализ результатов эффективности ЛТ у 300 больных РПК показал у 90 пациентов наличие полного клинического ответа, у 87 больных — частичного ответа, у 51 больного — отсутствие ответа на ЛТ. Было установлено, что эффективность ЛТ зависит от уровня экспрессии микроРНК (miR-195-5p, miR-4257, miR-5187-5p, miR-149-5p, miR-138-1-3p, miR-6798-5p, miR-6819-5p, miR-4728-5p, miR-1249-5p, miR-557, miR-1273h-5p, miR-6737-5p, miR-6808-5p, miR-3202, miR-5195-3p, miR-130b-3p) и днРНК (XIST, HELLPAR, NEAT1, AC008124.1, LINC01089, LINC01547 и VASH1-AS1), обеспечивающих эффективную регуляцию экспрессии генов *H2AX* и *RBBP-8* (система репарации ДНК) и *BCL-2* (регуляция апоптоза).

Закключение. Проведенное комплексное исследование особенностей регуляторной сети конкурентно-взаимодействующих РНК и эффективности ЛТ опухолей прямой кишки позволило установить механизмы формирования радиорезистентности и ее предикторы.

ТЕХНОЛОГИИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ТРАНСКРИПТОМИКИ ДЛЯ АНАЛИЗА ОПУХОЛЕЙ НА ПРИМЕРЕ 10X GENOMICS VISIUM И NANOSTRING GEOMX

И.В. Ларионова¹⁻³, П.С. Ямщиков^{1,2}, Е.О. Казакова², М.А. Ракина²

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

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

³лаборатория генетических технологий ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск
e-mail: laronova0903irina@mail.ru

Ключевые слова: пространственная транскриптомика, опухоль, 10x Genomics Visium, Nanostring GeoMx

Введение. Методы пространственной транскриптомики предоставляют собой количественные данные об экспрессии генов в пространственном контексте клеточных кластеров на срезах тканей. Их использование обеспечивает более глубокий анализ клеточных популяций в микроокружении опухоли и их взаимоотношений с опухолью и друг с другом. Лидерами в пространственном транскриптомном анализе на 2022 г. являются технологии 10x Genomics Visium и Nanostring GeoMx.

Цель исследования — представить опыт секвенирования опухолевых образцов с использованием технологий 10x Genomics Visium и Nanostring GeoMx.

Материалы и методы. Был проведен анализ 16 FFPE образцов опухолевой ткани яичника с помощью технологии секвенирования единичных клеток 10x Genomics Visium. Срезы были обработаны по протоколу, секвенирование образцов проводили на секвенаторе

NextSeq 2000 (Illumina Inc., США). FFPE образцы ($n = 10$) KPP были проанализированы с помощью Nanostring GeoMx. Были выбраны регионы интереса (ROIs). Секвенирование проводили на платформе NextSeq 500 (Illumina Inc., США).

Результаты. Мы впервые провели пространственный транскриптомный анализ данных пациенток с РЯ, имеющих 2 различных исхода: благоприятный и неблагоприятный. Биоинформатический анализ позволил выявить специфические кластеры в разных группах. У пациентов с неблагоприятным исходом в стромальных компартментах обнаруживались кластеры со значительно более выраженной экспрессией генов, относящихся к процессам ангиогенеза, ремоделирования внеклеточного матрикса (ВКМ), инвазии и иммунной активации. Они включают гены, кодирующие коллагены, матриксные металлопротеазы и другие белки матрикса, а также иммуноглобулины. С помощью технологии Nanostring GeoMx был проведен анализ опухоли кишки. Были показаны различия в экспрессии генов в регионах интересах, расположенных в CD45⁺ (иммунных) и СК⁺ (опухолевых) областях. Биоинформатический анализ позволил выявить гликолитический регулятор PFKFB3, экспрессия которого коррелировала с количеством и проопухолевой поляризацией макрофагов рака ободочной, но не РПК.

Закключение. В работе продемонстрированы возможности технологий пространственной транскриптомики 10x Genomics Visium и Nanostring GeoMx для анализа FFPE образцов опухолевых тканей, была проведена их сравнительная характеристика.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-75-10021), Минобрнауки России (№ 075-15-2021-1073).

G-КВАДРУПЛЕКСЫ В СОСТАВЕ ДНК ИНГИБИРУЮТ АКТИВНОСТЬ ЭУКАРИОТИЧЕСКОЙ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ Dnmt3a

А.Г. Лойко, А.И. Генатулина, А.В. Сергеев, Е.С. Громова

Химический факультет ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва
e-mail: andrewloykochem@gmail.com

Ключевые слова: ДНК-метилтрансфераза Dnmt3a, G-квадруплекс, метилирование ДНК, ДНК-белковые комплексы

Введение. Метилирование ДНК является важнейшей эпигенетической модификацией, регулирующей уровень экспрессии генов в эукариотических клетках. *De novo* метилирование остатков цитозина в CpG-сайтах ДНК у млекопитающих осуществляется ДНК-метилтрансферазой (МТазой) Dnmt3a. Данный фермент содержит N-концевую регуляторную область и C-концевой каталитический домен (Dnmt3a-CD), сохраняющий способность к метилированию даже при отсутствии

регуляторной области. Показано, что в промоторах некоторых онкогенов образуются G-квадруплексы (G4). Предположительно, G4 могут участвовать в регуляции работы МТаз, так как известно, что присутствие G4 приводит к гипометилированию ДНК.

Цель исследования — изучение влияния G4 в составе ДНК на активность Dnmt3a при различных конфигурациях взаимного расположения G4 и метилируемых CpG-сайтов.

Материалы и методы. В качестве модельных субстратов были использованы синтетические флуоресцентно меченные формирующие G4-олигонуклеотиды и ДНК-дуплексы с инкорпорированными последовательностями, формирующими параллельные G4 (G4-ДНК). В исследуемых G4-ДНК количество метилируемых CpG-сайтов варьировалось, при этом они располагались различным образом относительно G4. Возможность связывания G4-олигонуклеотидов с Dnmt3a исследовалась методом поляризации флуоресценции. Степень метилирования CpG-сайтов в G4-ДНК определяли методом защиты от расщепления эндонуклеазой R. HinfI с последующим анализом реакции в полиакриламидном геле.

Результаты. Доказано, что G4-олигонуклеотиды связываются с МТазой Dnmt3a-CD, что было дополнительно подтверждено ингибированием метилирующей активности фермента в их присутствии. Степень метилирования CpG-сайтов в ДНК МТазой Dnmt3a-CD значительно снижалась в присутствии инкорпорированного G4. Важную роль в процессе метилирования G4-ДНК играло количество CpG-сайтов, а также расстояние между ними и G4. В то же время прокариотическая CpG-узнающая МТаза M. SssI демонстрировала высокую метилирующую активность вне зависимости от наличия G4 в ДНК.

Закключение. Впервые показано, что G4 в составе ДНК способны значительно затруднять функционирование Dnmt3a-CD. Полученные данные позволили предложить механизм влияния взаимного расположения G4 и CpG-сайтов в составе ДНК на активность Dnmt3a. G4 формируют прочный комплекс с Dnmt3a, препятствующий связыванию фермента с CpG-сайтами, а также создают пространственные затруднения при олигомеризации Dnmt3a на ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 22-24-00368).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТИПЫ ВЭБ, ВАРИАбельНОСТЬ ВИРУСНОГО ОНКОГЕНА LMP1 И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ 4 ЭТНОСОВ РОССИИ

А.К. Лубенская, Н.Б. Сениута, Т.Е. Душенькина,
А.С. Васильева, А.Д. Молчанов, В.Э. Гурцевич, К.В. Смирнова

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

Минздрава России, Москва

e-mail: lubenskaya.96@mail.ru

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр, типы вируса Эпштейна–Барр, латентный мембранный белок 1, LMP1, сиквенсный анализ, адыгейцы, калмыки, татары, славяне, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, злокачественная опухоль

Введение. Обнаружение 2 типов ВЭБ (ВЭБ-1 и ВЭБ-2), различающихся по трансформирующим способностям, стимулировало их изучение в различных популяциях в целях выяснения связи со ЗНО.

Цель исследования — изучение ВЭБ 1-го и 2-го типов (ВЭБ-1 и ВЭБ-2) у представителей 4 этносов России, сиквенсный анализ онкогена *LMP1* в изолятах вируса и поиск корреляции типов ВЭБ с заболеваемостью злокачественными опухолями, ассоциированными с ВЭБ.

Материалы и методы. Из тотальной ДНК, полученной из смывов полости рта этнических представителей республик Адыгеи ($n = 59$), Калмыкии ($n = 49$) Татарстана ($n = 60$) и Московской области ($n = 40$), амплифицировали ДНК ВЭБ, ее наличие и концентрацию анализировали методом гнездовой ПЦР, и каждый продукт исследовали на тип вируса и вариант *LMP1*. Типы ВЭБ, обнаруженные у представителей 4 этносов, сопоставляли с опубликованными в 2020 г. стандартизованными показателями заболеваемости злокачественными опухолями у населения 3 республик и Московской области.

Результаты и заключение. Обнаружено, что более высокая заболеваемость РЖ у жителей Татарстана и Московской области (13,26 и 10,14 на 100 тыс. населения соответственно), по сравнению с жителями Адыгеи и Калмыкии (6,88 и 9,44 на 100 тыс. населения соответственно), коррелировала с доминированием у представителей татар и славян ВЭБ-1, обладающего трансформирующим потенциалом *in vitro*. У представителей же Адыгеи преобладал нетрансформирующий тип ВЭБ-2, а жители Калмыкии были инфицированы обоими типами вирусов примерно в равном соотношении. Однако различия между показателями заболеваемости РЖ у населения Татарстана и Московской области, с одной стороны, и Адыгеи и Калмыкии — с другой, были статистически недостоверными ($p > 0,5$). Обнаруженный спектр вариантов *LMP1*, а также результаты их сиквенсного анализа подтверждают тот факт, что циркулирующие штаммы вируса у изучаемых этносов обладают генетическим родством.

КОМЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ микроРНК
В ПАТОГЕНЕЗЕ СЕРОЗНОГО РАКА ЯИЧНИКАС.С. Лукина¹, А.М. Бурденный¹, И.В. Пронина¹,
Т.П. Казубская², В.И. Логинов¹, Э.А. Брага¹¹ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва;²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва

e-mail: sveta_sergeevna349@mail.ru

Ключевые слова: микроРНК, рак яичника

Введение. Понимание механизма онкогенеза невозможно без ответа на вопрос о синхронизации действия ряда генов на одни и те же биологические процессы. Ранее на РМЖ нами получены результаты по изменению кометилирования и коэкспрессии ряда генов супрессорных микроРНК. Результаты показали, что разные микроРНК могут регулировать одни и те же биологические процессы. Однако при РЯ подобных исследований не проводилось.

Цель исследования — изучение корреляционной связи уровней метилирования 21 гена микроРНК в первичных опухолях с перитонеальными метастазами серозного РЯ.

Материалы и методы. В исследование включена выборка из 99 парных (опухоль/гистологически нормальная прилежащая ткань) образцов серозного РЯ, 29 из которых имеют перитонеальные метастазы. Анализ метилирования проводили с использованием метода количественной метилспецифичной ПЦР. Для каждого образца был получен свой уровень метилирования в процентах. Статистический анализ уровней метилирования выполняли с применением непараметрического U-теста Манна–Уитни. Использовали математические пакеты IBM SPSS Statistics 22.

Результаты. Нами впервые получены статистически значимые ($p < 0,0001$) результаты корреляционного анализа для 13 пар микроРНК, состоящих из взаимодействующих 15 генов микроРНК для первичных опухолей РЯ. При исследовании образцов с перитонеальными метастазами получены 22 пары кометилированных микроРНК, составленных из 21 гена микроРНК.

Заключение. Таким образом, выявленные особенности могут указывать на вовлеченность этих микроРНК в общие биологические механизмы регуляции и пути взаимодействия при РЯ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-15-00368).

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
ТОЛСТОЙ КИШКИ: О ЧЕМ НУЖНО ЗНАТЬ
ПРИ ПЛАНИРОВАНИИ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВМ.Ю. Мещерякова, Е.Н. Колесников, Н.Н. Тимошкина,
Д.Ю. ГвалдинФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России,
Ростов-на-Дону

e-mail: mesheryakovamilana@mail.ru

Ключевые слова: нейроэндокринные новообразования толстой кишки, эпигенетика, CpG-метилирование, прогноз

Введение. Нейроэндокринные новообразования толстой кишки (НЭН ТК) составляют гетерогенную группу опухолей с различным молекулярно-генетическим портретом, изучение которого необходимо для оптимизации лечения пациентов.

Цель исследования — изучение паттерна CpG-метилирования НЭН ТК, разработка математической модели прогнозирования исходов заболевания для планирования тактики лечения.

Материалы и методы. В основу исследования легло ретроспективное изучение 65 историй болезни пациентов, которым было выполнено хирургическое лечение по поводу НЭН ТК в период с 2008 по 2021 г. на базе НМИЦ онкологии (Ростов-на-Дону). Были включены 37 женщин и 28 мужчин в соотношении 1,3:1; средний возраст пациентов составил 62,5 года. Для процедуры бисульфитного конвертирования ДНК отбирали препараты тотальной ДНК, содержащие не менее 0,5–2 мкг нуклеиновой кислоты. Выделенная ДНК была подвергнута реакции бисульфитной конверсии с помощью набора EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Fisher Scientific, США) для анализа CpG-метилирования генов-онкосупрессоров *RUNX3*, *RASSF1A*, *MGMT*, *P16*, *MLH1*, *DAPK*, *APC1*, AHR-репрессора и ретротранспозона LINE1. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft Inc., США) в среде операционной системы Windows 10.

Результаты. Ген *RUNX3* был гиперметилирован в 43 (66,2 %) образцах, *RASSF1A* — в 26 (40 %), *MGMT* — в 18 (27,7 %) и *P16* — в 12 (18,5 %). Высокие уровни метилирования генов *MLH1*, *DAPK* и *APC1* нами были зарегистрированы в 9 (13,8 %), 7 (10,8 %) и 6 (9,2 %) образцах соответственно. В изученных образцах опухолей снижение уровня метилирования ниже границы условной нормы выявлено в 34 (52,3 %) и 26 (40 %) случаях для ретротранспозона LINE1 и AHR-репрессора. Установлено, что гипометилирование ретротранспозона LINE1 ($p < 0,001$), AHR-репрессора ($p < 0,001$), гиперметилирование *RASSF1A* ($p < 0,001$), *RUNX3* ($p < 0,001$), *MGMT* ($p < 0,001$) ассоциированы с неблагоприятным течением заболевания. Разработана логистическая регрессионная модель для определения вероятности

неблагоприятного исхода заболевания на основании паттернов CpG-метилирования генов-онкосупрессоров.

Заключение. Разработанная логистическая регрессионная модель, основанная на изучении паттернов CpG-метилирования генов *RUNX3*, *RASSF1A*, *MGMT*, *P16*, *MLH1*, *DAPK*, *APC1*, AHR-репрессора и ретротранспозона LINE1, позволяет планировать тактику хирургического лечения, определяя показания к выполнению органосохраняющих оперативных вмешательств при НЭН ТК.

ГЕРМИНАЛЬНАЯ МУТАЦИЯ ГЕНА *MUTYH* У МОЛОДЫХ ПАЦИЕНТОК ЯКУТСКОГО ЭТНОСА С ДИАГНОЗОМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.Ю. Молоков¹, П.А. Гервас¹, А.А. Зарубин¹, Д.Г. Тихонов², Н.В. Чердынцева³

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

²ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», Якутск;

³НИИ медицинской генетики ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: amolokov@inbox.ru

Ключевые слова: *MUTYH*, рак молочной железы, якутский этнос, наследственный рак молочной железы, этноспецифические мутации

Введение. РМЖ занимает лидирующие позиции по уровню заболеваемости в мире. Ген *MUTYH* вовлечен в процессы эксцизионной репарации ДНК. Известна связь гена *MUTYH* с КРР и РМЖ, также данный ген вызывает наследственное заболевание *MUTYH*-ассоциированного полипоза.

Цель исследования — классификация варианта неизвестного значения гена *MUTYH* с помощью программ, предсказывающих вероятность повреждения функции белка (*in silico*).

Материалы и методы. Проведено NGS-секвенирование геномной ДНК, выделенной из периферической крови 27 пациенток якутской этнической группы с диагнозом РМЖ в возрасте моложе 50 лет (возраст варьировал от 43 до 49 лет) с семейным анамнезом. ДНК-библиотеки приготавливали с использованием набора Hereditary Cancer Solution™ (Sophia Genetics, Швейцария) для изучения статуса 27 генов (*ATM*, *APC*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *FAM175A*, *MLH1*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PIK3CA*, *PMS2*, *PMS2CL*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53* и *XRCC2*). Секвенирование (2 × 150 п. н.) проводили с использованием системы MiSeq (Illumina Inc., США).

Результаты. По результатам биоинформатического анализа данных NGS у 5 пациенток обнаружена герминальная мутация гена *MUTYH* (rs199840380: NM_001048171: exon10: c.C838T: p.R280C). По данным литературы, эта мутация ранее была описана у пациентов с КРР и трижды негативным РМЖ. В соответствии с db ClinVar данная мутация имеет

неизвестное клиническое значение (uncertain significance). Обнаруженная нами мутация была проанализирована разными программными инструментами. Программа NetGene2 показала, что данная мутация находится в сайте сплайсинга, а программы PolyPhen2 (possibly damaging), SIFT (deleterious), MutationTaster (disease causing), MSC (high) и CADD (PHRED = 24,6) характеризовали rs199840380 как возможно повреждающую функцию белка. Это говорит о высокой вероятности патогенности данной мутации. Все результаты программных методов показывают высокую вероятность влияния данной мутации на сплайсинг, что говорит о дальнейшей необходимости проверки данной мутации *in vitro*.

Заключение. Впервые у 5 пациенток, принадлежащих к якутской этнической группе, с диагнозом РМЖ обнаружена герминальная мутация гена *MUTYH* (rs199840380).

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-25-20032).

ОЦЕНКА СПЕКТРА МУТАЦИЙ ГЕНОВ *BRCA1* И *BRCA2* У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЯИЧНИКА В МИРЕ, А ТАКЖЕ НА ТЕРРИТОРИИ АЗЕРБАЙДЖАНА

Г.В. Набиева

Национальный центр онкологии Минздрава Азербайджанской Республики, Баку, Азербайджанская Республика
e-mail: gulnar.nebiyeva.1998@mail.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, рак яичника, *BRCA1*, *BRCA2*

Введение. Наследственный РМЖ и РЯ вызывается зародышевой мутацией в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Частота носителей мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* и соотношение мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком, связанным с *BRCA*, варьируют в зависимости от популяции.

У евреев-ашкенази самыми распространенными мутациями являются 187delAG и 5385insC в гене *BRCA1*, а также 6174delT в *BRCA2*, в японской популяции чаще выделяют мутации L63X и Q934X в гене *BRCA1*.

Самыми распространенными мутациями среди популяции Азербайджанской Республики в гене *BRCA1* являются 5382insC, 185delAG и 4154delA, а в гене *BRCA2* — 6174delT.

Цель исследования — изучить распространенность мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у женщин в мире, а также сопоставить эти результаты с данными женщин, проживающих на территории Азербайджанской Республики.

Материалы и методы. Был проведен аналитический обзор мировой литературы за 2007–2022 гг. Использовали базы данных PubMed и Google Scholar. Поиск осуществляли с помощью ключевых слов: «рак

молочной железы», «рак яичника», «ген *BRCA1*», «ген *BRCA2*».

Результаты. В крупномасштабных эпидемиологических исследованиях пенетрантность генов *BRCA1/2* для РМЖ у женщин составляла около 70 % и практически не было различий между генами *BRCA1* и *BRCA2*. Однако пенетрантность генов *BRCA1* и *BRCA2* при РЯ, по имеющимся данным, составляет около 40 и 20 % соответственно.

Частота зародышевой мутации *BRCA* в США, Канаде, Австралии и Японии в среднем составляет около 15 %. С другой стороны, частота зародышевой мутации *BRCA* варьирует в европейских странах, но в Финляндии, Швеции, Дании и Исландии она относительно низкая.

На основе ПЦР-исследования, проведенного в Национальном центре онкологии (Баку) академиком Д.А. Алиевым и кандидатом биологических наук Л.А. Меликовой, было выявлено, что преобладающими мутациями гена *BRCA1* в Азербайджане являются 5382insC (34,5 %), 5622T (24 %) и 185delAG (17,2 %). В исследовании принимали участие 263 пациента с РМЖ и РЯ в возрасте от 21 до 87 лет, у 29 (11 %) из которых были обнаружены мутации генов *BRCA1/2*.

У гена *BRCA2* были проанализированы 2 мутации в позиции 6174delT и 9254del5, что привело к обнаружению мутации 6174delT (17,2 %) у большинства пациентов.

Закключение. Соотношение мутаций *BRCA1* и *BRCA2* варьирует от популяции к популяции. Однако это соответствует предыдущим сообщениям о том, что мутация зародышевой линии *BRCA1* в мире, а также на территории Азербайджанской Республики встречается чаще, чем мутация зародышевой линии *BRCA2* в случаях РМЖ и РЯ.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАКА ЖЕЛУДКА В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН

А.Х. Нургалиева¹, Л.Ф. Галлямова¹, С.Г. Петрова¹,
Д.С. Прокофьева¹, Ю.Ю. Федорова¹, Р.Р. Рахимов²,
А.В. Султанбаев², Д.Д. Сакаева³, Ш.М. Хуснутдинов³,
Э.К. Хуснутдинова¹

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа;

²ГБУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Башкортостан, Уфа;

³ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа
e-mail: alfiyakh83@gmail.com

Ключевые слова: рак желудка, генетический вариант, секвенирование, ассоциация

Введение. РЖ является одним из тяжелейших заболеваний, занимает лидирующие позиции среди причин смерти от ЗНО в мире. В Республике Башкортостан также зарегистрированы высокие показатели заболеваемости ЗНО желудка и смертности от них.

Цель исследования — поиск ключевых молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с развитием РЖ.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы ДНК, выделенной из венозной крови больных РЖ ($n = 379$) и здоровых доноров ($n = 400$), из опухолевой и прилежащей к ней нормальной ткани желудка 9 больных с аденокарциномой желудка III стадии. Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Амплификацию проводили с использованием специфичных праймеров. Исследование экзонных на наличие изменений нуклеотидной последовательности осуществляли с помощью HRM-анализа. Для верификации молекулярно-генетических изменений использовали метод секвенирования по Сэнгеру. Полногеномное секвенирование экзона проводили по технологии Illumina на приборе HiSeq 2000.

Результаты. Проведен анализ ассоциаций с риском развития РЖ 20 полиморфных локусов в генах *IL1β*, *IL1RN*, *IL8*, *IL10*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP9*, *MMP12*, *TIMP2*, *TIMP3*, *PGC*, *TP53*, *CDH1*, *MLH1*, *MSH2*. Выявлены маркеры, ассоциированные с повышенным риском развития РЖ: rs9619311*T/T, rs1799750*1G/2G, rs2276109*A/A, rs16260*A/A. Проведен поиск изменений нуклеотидной последовательности гена *CDH1*. В результате проведенного исследования нами обнаружены изменения нуклеотидной последовательности в экзонах 11, 12 и 14 гена *CDH1* у больных РЖ (1,15; 1,15 и 7,49 % соответственно) и здоровых доноров (0,70; 0,70 и 4,91 % соответственно). Однако ни одно из выявленных изменений (rs35741240, rs33969373 и rs33964119) не является патогенным.

Полное экзомное секвенирование по технологии NGS 18 образцов ДНК опухолевой ткани и прилежащей к ней гистологически нормальной ткани, полученных от пациентов с РЖ, выявило 3 патогенных варианта: с.1320+1G>A гена *CDH1* и с.27_28insCCCAGCCCCAGCTACCA (p.Ala9fs) гена *VEGFA* обнаружены только в опухолевой ткани, с.G1874C (p.Cys625Ser) гена *FANCA* — в опухолевой и нормальной тканях. Все изменения выявлены у пациентов с диффузным типом РЖ.

Закключение. Установленные нами данные и полученные результаты вносят вклад в копилку знаний о генетической природе предрасположенности к ЗНО желудка и могут быть востребованы для разработки новых подходов к ранней диагностике.

Работа выполнена по государственному заданию Минобрнауки России (№ 075-03-2021-193/5).

ВЛИЯНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ РАСТЕНИЙ ГЕНИСТЕИНА, КУРКУМИНА, НАРИНГЕНИНА И КЕМПФЕРОЛА НА МЕТИЛИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ H3 И H4 В КЛЕТКАХ HeLa

А.Ю. Прус^{1,2}, В.П. Максимова¹, О.Г. Усалка^{1,3},
В.Г. Попова^{1,4}, С.А. Хазанова², М.Г. Якубовская¹,
К.И. Кирсанов^{1,5}

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

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

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России (Сеченовский Университет), Москва;

⁴ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический
университет им. Д.И. Менделеева», Москва;

⁵ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва
e-mail: aikaprus2000@gmail.com

Ключевые слова: эпигенетическая регуляция транскрипции, метилирование гистонов, гистоновые метилтрансферазы, вторичные метаболиты растений

Введение. Одним из ключевых факторов развития ЗНО является нарушение механизмов эпигенетической регуляции транскрипции, в частности нарушение паттернов метилирования гистонов H3 и H4. В последнее время в противоопухолевой терапии широкое применение получили модуляторы активности ферментов, модифицирующих гистоны и ДНК. Для генистеина, куркумина, нарингенина и кемпферола была показана способность влиять на компоненты эпигенетической системы регуляции транскрипции, такие как гистоновые деацетилазы и ДНК-метилтрансферазы. В то же время эффекты соединений на гистоновые метилтрансферазы были изучены лишь для небольшого числа соединений.

Цель исследования — анализ влияния генистеина, куркумина, нарингенина и кемпферола на метилирование гистонов H3 и H4.

Материалы и методы. Анализ уровня гистоновых меток H3K9me3/2, H3K79me3, H3K27me3, H4K20me3, а также экспрессии гистоновых метилтрансфераз, ассоциированных с данными метками (SUV39H1/2, GLP, G9a, DOT1L, EZH2, SUV420H1/2), проводили с помощью метода вестерн-блоттинга. Исследование осуществляли на клетках РШМ HeLa. Значимые различия результатов определяли с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) при значении $p < 0,05$.

Результаты. Показано, что при действии нарингенина (600 мкМ) возрастает уровень модификации H3K9me3 (в 2,3 раза), при действии кемпферола (10 мкМ) повышается количество меток H3K9me2 (в 1,8 раза) и H3K79me3 (в 1,6 раза). При обработке генистеином (120 мкМ) повышается уровень H3K9me2 (в 1,5 раза) и снижается уровень H3K79me3 (в 2,6 раза). Анализ влияния соединений на экспрессию гистоновых ме-

тилтрансфераз показал, что при действии генистеина снижается уровень ферментов EZH2 и GLP в 1,4 раза. При действии нарингенина было зарегистрировано снижение экспрессии ферментов SUV39H2 (в 3,2 раза), GLP (в 2,1 раза), EZH2 (в 1,3 раза) и DOT1L (в 2,2 раза). Также было показано, что куркумин (15 мкМ) способствует увеличению экспрессии метилтрансферазы SUV39H1 (в 1,2 раза) и подавляет метилтрансферазы SUV39H2 (в 1,5 раза), GLP (в 1,6 раза), EZH2 (в 1,2 раза) и DOT1L (в 2,8 раза). При обработке кемпферолом возрастает содержание белка SUV39H1 (в 1,7 раза) и снижается уровень белков SUV39H2 (в 1,5 раза) и EZH2 (в 1,3 раза).

Заключение. Выявлено, что генистеин, куркумин, нарингенин и кемпферол модулируют экспрессию гистоновых метилтрансфераз EZH2, GLP, SUV39H1, SUV39H2 и DOT1L, а также оказывают интегральный эффект на гистоновые метки H3K9me2/3 и H3K79me3 в клетках HeLa. При этом нарингенин и куркумин продемонстрировали ингибирующее действие в отношении наиболее широкого спектра гистоновых метилтрансфераз. Эти данные позволяют рассматривать исследуемые фитонутриенты в качестве перспективных для разработки препаратов в терапии опухолей с аберрантным эпигенетическим профилем.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-75-10163).

ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ PD-L1 КЛОНОВ SP142 И SP263 ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Т.Н. Сотникова¹, Н.В. Данилова², П.Г. Мальков²,
Д.В. Калинин³, Т.В. Полушкина¹

¹ГБУЗ г. Москвы «ГКБ им. И.В. Давыдовского ДЗМ», Москва;

²Медицинский научно-образовательный центр ФГБОУ
ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского»
Минздрава России, Москва
e-mail: docsotnikova@mail.ru

Ключевые слова: иммуногистохимия, PD-L1, антитело, уровень экспрессии, опухолевые клетки, рак желудка

Введение. Способность некоторых опухолей экспрессировать на своей поверхности лиганды PD-1 представляет собой самостоятельный механизм опухолевой иммунорезистентности, наблюдаемой даже при развитии эффективного Т-клеточного ответа на опухолевые антигены. Грамотная оценка PD-L1-статуса опухолевой ткани позволяет подобрать препараты для таргетной иммунотерапии и повысить эффективность лечения.

Цель исследования — оценить уровень экспрессии двух клонов PD-L1 — SP142 и SP263 — при РЖ двумя методами: в клетках опухоли (процент опухолевых клеток, демонстрирующих мембранное окрашивание любой степени интенсивности, TPS) и среди всех клеток (процент окрашенных опухолевых и иммунных

клеток от общего числа клеток, CPS). Известно, что один и тот же клон антител может иметь разную способность экспрессироваться PD-L1 в клетках различных видов опухолей. В свою очередь, наша задача наглядно показать, что разные клоны могут демонстрировать разный паттерн окрашивания в одной и той же опухоли.

Материалы и методы. Для исследования было отобрано 127 клинических случаев для клона PD-L1 SP263 и 126 — для клона PD-L1 SP142 при наличии различных морфологических вариантов, типов и прочих характеристик опухолевой ткани, которые включали размер, локализацию, степень дифференцировки, а также распространенность процесса по классификации TNM и клиническую стадию.

Результаты. Уровень экспрессии PD-L1 SP263 (CPS) в 15 случаях был оценен в 0 баллов, в 71 случае — в 1 балл, в 20 — в 2 балла, в 15 — в 3 балла и в 5 — в 4 балла.

Уровень экспрессии PD-L1 SP263 (TPS) в 80 случаях был оценен в 0 баллов, в 31 — в 1 балл, в 11 — в 2 балла, в 3 — в 3 балла и в 2 — в 4 балла.

Уровень экспрессии PD-L1 SP142 (CPS) в 37 случаях был оценен в 0 баллов, в 63 — в 1 балл, в 20 — в 2 балла, в 5 — в 3 балла и в 1 — в 4 балла.

Уровень экспрессии PD-L1 SP142 (TPS) в 117 случаях был оценен в 0 баллов, в 8 — в 1 балл, в 1 — в 2 балла.

Заключение. При использовании клона SP263 экспрессия и опухолевых, и иммунных клеток была более яркая и интенсивная, окрасилось значительное количество клеток, а также положительный результат отмечался более чем в половине случаев. Напротив, при использовании другого клона — SP142 — окрашивание имело более слабую интенсивность и в значительном количестве случаев не отмечалось и было оценено в 0 баллов. Примечательно, что во всех случаях при наличии положительного результата в исследовании с клоном SP142 интенсивность и яркость окрашивания, а также количество главным образом опухолевых клеток были слабыми и незначительными и оценить их в 3, тем более в 4 балла не представилось возможным.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЭКСЦИЗИОННЫХ КОЛЕЦ TREC И KREC ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

А.В. Султанбаев¹, Ш.И. Мусин¹, К.В. Меньшиков¹,
Ф.С. Билалов², Н.И. Султанбаева¹, А.Ф. Насретдинов¹,
И.А. Меньшикова³, В.Е. Аскаров¹, М.В. Султанбаев³,
Д.А. Кудлай^{4,5}

¹ГАОУ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Башкортостан, Уфа;

²ГБУЗ «Республиканский медико-генетический центр», Уфа;

³ФБГОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

⁴ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва;

⁵ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва
e-mail: sova@rambler.ru

Ключевые слова: эксцизионные кольца, TREC, KREC, злокачественное новообразование, иммунодефицит

Введение. Эксцизионные кольца реаранжировки Т-клеточного рецептора (TREC) и κ-делеционного элемента (KREC) представляют собой внехромосомные структуры ДНК, образующиеся в процессе V (D) J-рекомбинации. Снижение количества TREC и KREC ниже возрастных значений может быть проявлением иммунодефицитных состояний, причиной которых могут являться онкологические и гематологические заболевания, а также терапия иммуносупрессивными препаратами. У онкологических пациентов в зависимости от мутационной нагрузки и, как следствие, антигенной нагрузки опухоли наблюдается разнообразие антигенного профиля Т- и В-клеток.

Цель исследования — изучить изменение количества TREC и KREC при ЗНО.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе Республиканского медико-генетического центра (Уфа) и Республиканского клинического онкологического диспансера (Уфа) в рамках протокола «ИО-001» одноцентрового нерандомизированного открытого клинического исследования, одобренного локальным этическим комитетом. Все пациенты, включенные в исследование, дали письменное согласие на участие. Выполнялся забор крови у пациентов со ЗНО в основной группе и у здоровых лиц различного возраста. На этапе промежуточной оценки полученных результатов из 700 запланированных в исследование включены 206 пациентов, из них 26 здоровых лиц и 180 пациентов со ЗНО. Распределение по полу: 22,8 % (46/206) мужчин, 77,2 % (159/206) женщин; медиана возраста 54 года (Q_1 – Q_3 : 44–66 лет). Распределение ЗНО по локализациям: РМЖ — 35 % (63/180), РЯ — 21,1 % (38/180), меланома кожи — 15,6 % (28/180), лимфома — 11,1 % (20/180), РЛ — 8,9 % (16/180), КРР — 8,3 % (15/180) пациентов. Количественная оценка TREC и KREC выполнена методом ПЦР в реальном времени с применением набора реагентов «ИММУНО-БИТ» (АБВ-тест, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Экстракцию ДНК из цельной крови проводили с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» (Некст-Био, Россия).

Результаты. По данным нашего исследования, у здоровых лиц уровень TREC — 75,6/105 PBMC (Q – Q_3 : 19,2–135,3), уровень KREC — 317,3/105 (Q_1 – Q_3 : 118,1–565,9), тогда как у пациентов со ЗНО уровень TREC — 4,6/105 PBMC (Q_1 – Q_3 : 0,9–17,3), уровень KREC — 111,9/105 (Q_1 – Q_3 : 29,3–339,28). При сравнении показателей TREC и KREC установлены статистически значимые различия ($p < 0,001$, $p = 0,006$). Уровни TREC и KREC у здоровой популяции были существенно выше, чем среди пациентов со ЗНО (медианы TREC составляли 75,6 и 4,6, медианы KREC — 317,3 и 111,9 соответственно).

Заключение. Полученные данные демонстрируют существенные изменения лимфопоэза Т- и В-клеток у пациентов со ЗНО. Количественное определение TREC и KREC дает возможность оценивать состояние Т- и В-клеточного звена иммунной системы у пациентов со ЗНО. Полученные данные позволяют планировать дальнейшие исследования иммунитета при ЗНО и их прогностическую значимость.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АБЕРРАНТНО ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ТКАНЯХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Е.А. Филиппова¹, И.В. Пронина¹, С.С. Лукина¹,
В.И. Логинов¹, Т.П. Казубская², Э.А. Брага¹

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

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава

России, Москва

e-mail: p.lenyxa@yandex.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, аберрантная экспрессия, длинные некодирующие РНК

Введение. РМЖ остается одной из основных причин смерти от ЗНО среди женщин в мире. Однако до сих пор очень мало известно о точных механизмах возникновения этого вида рака и регуляции канцерогенеза, что осложняет диагностику, прогноз и терапию. В последнее время все большую актуальность приобретают исследования днРНК, участвующих в регуляции различных сигнальных путей в клетках, поскольку они демонстрируют большой прогностический потенциал при онкологических заболеваниях.

Цель исследования — выявить новые аберрантно экспрессируемые днРНК при РМЖ.

Материалы и методы. Тотальную РНК из парных образцов РМЖ выделяли по стандартной методике. Анализ уровня экспрессии 84 днРНК в опухолевой и гистологически нормальной прилежащей ткани молочной железы проводили с помощью RT² IncRNA PCR Arrays (LAHS-002Z, QIAGEN). Дополнительно были проанализированы данные об экспрессии днРНК при РМЖ из базы данных GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>).

Результаты. Нами было идентифицировано 30 аберрантно экспрессируемых днРНК при РМЖ. Для большинства днРНК было отмечено снижение уровня экспрессии в 2,34–13,2 раза ($p < 0,05$), и только для днРНК TERC выявлено увеличение уровня экспрессии в 2,24 раза ($p = 0,034$). Наибольший интерес представляют результаты, полученные для днРНК ADAMTS9-AS2, EMX2OS, HOTAIRM1 и MEG3, так как они согласуются с данными биоинформатического анализа. Однако необходимы дальнейшие исследования на больших группах, чтобы оценить биомаркерный потенциал найденных днРНК при РМЖ.

Заключение. При проведении экспериментального и биоинформатического анализа изменений экспрессии днРНК при РМЖ были выявлены обладающие биомаркерным потенциалом днРНК TERC, ADAMTS9-AS2, EMX2OS, HOTAIRM1 и MEG3.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-75-00132).

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ ВАРИАНТА C.1187G>A В ГЕНЕ *MUTYH* С РИСКОМ РАЗВИТИЯ РАКА ЯИЧНИКА

О.К. Харина¹, Я.В. Валова^{1,2}, А.В. Коростелева¹,
Э.Т. Мингажева¹, Д.С. Прокофьева¹, Э.К. Хуснутдинова^{1,3}

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа;

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

³Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Уфимский федеральный исследовательский центр РАН», Уфа
e-mail: ha.oly@mail.ru

Ключевые слова: рак яичника, гены репарации

Введение. РЯ наряду со злокачественными опухолями шейки и тела матки является одним из наиболее распространенных типов новообразований в структуре онкогинекологической патологии. Несмотря на существенные успехи в области ранней диагностики и лечения заболевания, показатели смертности не имеют тенденции к снижению. Более того, 2/3 случаев РЯ выявляются на поздних стадиях, что значительно уменьшает шансы на благоприятный исход лечения.

Ген *MUTYH* кодирует одноименный белок, который участвует в репарации окислительного повреждения ДНК. Замена гуанина на аденин в 1187-м положении кДНК (p.Gly396Asp) приводит к неконсервативной аминокислотной замене глицина на аспарагиновую кислоту в гидролазном домене NUDIX (IPR000086) кодируемой белковой последовательности.

Цель исследования — изучение роли варианта c.1187G>A в гене *MUTYH* в патогенезе РЯ у женщин, проживающих в Республике Башкортостан.

Материалы и методы. В качестве материала исследования были использованы образцы ДНК, выделенные методом фенол-хлороформной экстракции из венозной крови больных наследственными формами РЯ ($n = 65$), больных спорадическим РЯ ($n = 214$) и женщин без онкологических заболеваний на момент забора крови (контрольная группа; $n = 315$), проживающих в Республике Башкортостан. Генотипирование осуществляли методом ПДРФ — анализа с использованием эндонуклеазы рестрикции BstMB I.

Результаты. В результате рестрикционного анализа нами были выявлены 1 (0,46 %) носительница исследуемого варианта среди больных РЯ, 1 (1,53 %) носительница среди больных наследственными формами РЯ и 2 (0,63 %) носительницы среди здоровых женщин в гетерозиготном состоянии. По этнической

принадлежности женщины с вариантом с.1187G>A в гене *MUTYH* принадлежат к разным группам: русские — 75 %, башкиры — 25 %. У 1 пациентки в период постменопаузы установлен диагноз умеренно-дифференцированной серозной цистаденокарциномы яичника с метастазами в сальник. У другой носительницы варианта обнаружена папиллярная аденокарцинома яичника. Заболевание возникло в пременопаузе. Одна носительница из контрольной группы имеет отягощенный онкологический семейный анамнез.

Закключение. Таким образом, нами не выявлено ассоциации варианта с.1187G>A в гене *MUTYH* с риском развития РЯ у женщин, проживающих в Республике Башкортостан.

Исследование поддержано программой развития биоресурсных коллекций ФАНО.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-34-90003, гранта РБ № 210/1, гранта РФ МК-3208.2022.1.4, по государственному заданию Минобрнауки России (FZWU2020-0027).

ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА НА РОСТ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МИЕЛОМНЫХ И ЛИМФОБЛАСТОИДНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

С.С. Шушанов¹, А.А. Калинина¹, Т.А. Захарова¹,
Н.П. Актетьева², Ю.Б. Черных³

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

²ФГБУН «ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН», Черноголовка;

³ГБУЗ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», Москва
e-mail: sainHershy@yandex.ru

Ключевые слова: инсулин, INS, множественная миелома

Введение. В эпидемиологических исследованиях показано, что хроническая резистентность к инсулину (INS) является потенциальным фактором риска развития рака эндометрия, РМЖ, КРП и ряда других ЗНО. Также имеются данные, свидетельствующие о том, что у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа (T2DM) сахароснижающая терапия с использованием INS и сульфонилируеазы, а также аналогов INS увеличивает риск возникновения различных ЗНО. Что касается множественной миеломы (ММ) человека, установлено, что INS-терапия вызывает повышенную смертность пациентов с ММ, у которых был предсуществующий или индуцированный стероидами T2DM (пациенты с ММ⁺/T2DM⁺). Однако молекулярные механизмы, объясняющие отрицательное действие INS на общую выживаемость больных с ММ⁺/T2DM⁺, не раскрыты.

Цель исследования — изучить влияние INS на рост и жизнеспособность миеломных и лимфобластоидных клеток человека.

Материалы и методы. В работе использованы линии клеток ММ человека, отличающиеся по степени диф-

ференцировки: RPMI8226, RPMI1640, H929 и лимфобластоидные клетки человека IM-9. Происхождение линий клеток ММ: человек, костный мозг, миелома. Происхождение линии клеток IM-9: В-клетки, иммортализованные путем трансфекции ВЭБ. Способ культивирования: суспензионный в среде RPMI1640 с 10 % телячьей эмбриональной сывороткой (ТЭС) при температуре 37 °С, 5 % CO₂.

Апоптоз исследовали методом проточной цитометрии с использованием Annexin V-FITC. Оценку экспрессии мРНК Cas-3 и Bcl-2 проводили с помощью ПЦР в реальном времени; количество жизнеспособных клеток определяли колориметрическим методом (МТТ-тест).

Результаты. Результаты наших исследований показали, что INS может по-разному влиять на рост и жизнеспособность клеток ММ человека. В среде с ТЭС (в присутствии факторов роста) INS увеличивает численность клеток ММ, а при отсутствии факторов роста — уменьшает. Нами установлено, что причиной уменьшения численности клеток является INS-индуцированный апоптоз, сопровождающийся гиперэкспрессией мРНК Cas-3 и подавлением экспрессией мРНК Bcl-2. Мы также показали, что INS при отсутствии факторов роста вызывает некротическую гибель клеток ММ.

Закключение. Активация INS-зависимых сигналов — неблагоприятный прогностический фактор для пациентов с ММ⁺/T2DM⁺. С одной стороны, INS является выраженным фактором роста для клеток миеломы, с другой — INS может отрицательно влиять на жизнеспособность нормальных клеток с нарушенным метаболизмом и, как следствие, с нарушенным ответом на факторы роста у больных хронической гипергликемией при T2DM.

МЕХАНИЗМ ЭКЗОСОИНДУЦИРОВАННОЙ ПЕРЕДАЧИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНГИБИТОРАМ МТОР В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ю.Ю. Щеголев, О.Е. Андреева, Д.В. Сорокин,
А.М. Щербаков, М.А. Красильников

НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва
e-mail: krasilnikovm1@yandex.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, экзосоминдуцированная резистентность, DNMT3a

Введение. Устойчивость к химиотерапии и облучению остается одной из ключевых особенностей злокачественных опухолей, что в значительной степени ограничивает эффективность противоопухолевой терапии. Основной задачей работы явилось изучение механизма развития резистентности клеток РМЖ к таргетным препаратам, в частности к ингибиторам mTOR рапамицину и метформину.

Ранее в экспериментах на рапамицин- и метформин-резистентных сублиниях клеток РМЖ MCF7 мы продемонстрировали способность экзосом резистентных клеток индуцировать аналогичную устойчивость к ингибиторам mTOR в родительских клетках MCF7.

Цель исследования — дальнейшее изучение механизма экзосоминдуцированной передачи резистентности к таргетным препаратам в клетках РМЖ.

Материалы и методы. Уровень экспрессии DNMT3a определяли методом вестерн-блоттинга; экзосомы выделяли из кондиционированной культуральной среды по стандартной методике дифференциального ультрацентрифугирования; трансфекцию siRNA выполняли с использованием реагента Lipofectamine 2000 PRO; подготовку библиотек и сиквенс микроРНК проводили в ЗАО «Геноаналитика» (Россия).

Результаты. Мы показали, что как резистентные к ингибиторам mTOR сублинии клеток MCF7, так и клетки с индуцированной экзосомами резистентностью ха-

рактеризуются стабильным снижением экспрессии DNMT3a, ключевого фермента, ответственного за метилирование ДНК. Анализ профиля микроРНК в экзосомах и клетках резистентных сублиний выявил повышенную экспрессию микроРНК — супрессоров DNMT3a, в том числе miR-29, miR-193, miR-199, miR-203 и miR-181. Нокдаун DNMT3a в клетках MCF7 с помощью siRNA приводил к частичной устойчивости к ингибиторам mTOR, что позволяет рассматривать супрессию DNMT3a как один из необходимых шагов в развитии приобретенной устойчивости к препаратам — ингибиторам mTOR.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют об участии экзосомальных микроРНК — ингибиторов DNMT3a в межклеточной передаче и развитии экзосоминдуцированной резистентности в опухолевых клетках-реципиентах.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 19-15-00245),
<https://rscf.ru/project/22-15-35008/>.*

Молекулярные механизмы прогрессии и метастазирования опухолей

ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ СИНДЕКАНА 1 С ЭСТРОГЕНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ В ЭНДОМЕТРИОИДНОМ РАКЕ ЯИЧНИКА

С.В. Айдагулова, Д.В. Морозов, Ю.С. Тимофеева,
И.О. Маринкин

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Новосибирск
e-mail: asvetvlad@yandex.ru

Ключевые слова: эндометриоидный рак яичника, синдекан 1, эстрогеновые рецепторы, иммуногистохимия

Введение. РЯ занимает 3-е место среди всех гинекологических новообразований, но является одной из ведущих причин смерти в структуре гинекологической онкологии во всем мире. Показано, что состояние эстрогеновых рецепторов играет решающую роль в прогрессировании эндометриоидного РЯ и считается предиктором ответа на гормональную терапию. Имеются предпосылки, что по мере перехода лечения рака от монотаргетной к комбинированной терапии одним из новых направлений терапии рака станет управление биосинтезом и деградацией молекул семейства гепарансульфатов, одним из представителей которого является синдекан 1. Сообщалось о гиперэкспрессии синдекана 1 при РМЖ, раке предстательной железы (РПЖ), раке мочевого пузыря, поджелудочной железы, РЯ и раке эндометрия.

Цель исследования — изучение корреляции экспрессии синдекана 1 с эстрогеновыми рецепторами в операционном материале у женщин с эндометриоидным РЯ.

Материалы и методы. Проведено ИГХ-исследование опухолей 17 женщин с эндометриоидным РЯ (средний возраст $53,5 \pm 9,8$ года). Во всех случаях пациентки подписывали информированное согласие. Для ИГХ в качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела (МА) к коровому белку синдекана 1 и кроличьи МА к эстрогеновым рецепторам (Thermo Fisher Scientific, кат. № MS-1793RQ и RM-91-50 соответственно); системой визуализации служила UltraVision Quanto Detection System HRP. Использовали микроскоп Axio Scope. A1 и программное обеспечение ZEN blue. Статистическую обработку результатов проводили с помощью StatSoft Inc. (2011). Корреляцию рассчитывали по Спирмену.

Результаты. После хирургического стадирования по классификации FIGO II стадия эндометриоидного РЯ диагностирована у 5 больных, III стадия — у 11, IV стадия — у 1. Микроскопически образцы эндометриоидного РЯ представлены веретенообразными клетками, овальными или трубчатыми псевдожелезами с многослойным эпителием; отдельные участки имели деструктивный рост с выраженной стромальной инвазией. Секреторные изменения сопоставимы с ранней фазой секреции эндометрия, иногда в строме обнаруживались лютеинизированные клетки. По данным автоматического анализа изображения, в операционном материале эндометриоидного РЯ интенсивность ИГХ-окрашивания корового белка синдекана 1 составила 1310 ± 68 единиц, экспрессия эстрогеновых рецепторов в опухолевой ткани — 1138 ± 134 . При парном сравнении выявлена умеренная статистически значимая обратная корреляция экспрессии синдекана 1 с эстрогеновыми рецепторами ($r_s = -0,51$). Прогрессирование рака обусловлено взаимодействиями между раковыми клетками, микроокружением опухоли и перифокальной тканью, которые регулируются молекулами ВКМ.

Заключение. Выявлена умеренная отрицательная корреляция иммуноокрашивания синдекана 1 с эстрогеновыми рецепторами в операционном материале пациенток с эндометриоидным РЯ, что требует дальнейших исследований.

РАСЩЕПЛЕНИЕ КОМПЛЕКСА HSP70–HMGB1 ПОДАВЛЯЕТ РЕПОПУЛЯЦИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И РЕЦИДИВ РАКА ПОСЛЕ ХИМИОТЕРАПИИ

Б. Алхасан, Д.В. Сверченский, И.В. Гузова, Б.А. Маргулис
ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: alhassan.bashar.1994@gmail.com

Ключевые слова: рецидив рака, химиотерапия, репопуляция опухолевых клеток, HSP70, HMGB1, DAMP

Введение. Рецидив рака является наиболее проблематичным последствием любого метода лечения опухоли. Это происходит в результате устойчивости подмножества раковых клеток к терапевтическому вмешательству и последующей репопуляции через определенный период времени. Интересно, что репопуляция

опухолевых клеток может быть вызвана факторами, полученными из соседних клеток, умирающих в результате терапии. Остатки последних, так называемые DAMP (damage-associated molecular patterns, ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны), или алармины, включая HSP70 и HMGB1, могут находиться в комплексе во ВКМ в результате гибели опухолевых клеток и индуцировать репопуляцию соседних устойчивых опухолевых клеток и, таким образом, рецидив рака.

Цель исследования — оценка эффективности расщепления комплекса HSP70–HMGB1 для ингибирования опухолевой репопуляции и, следовательно, рецидива рака.

Результаты. Для расщепления комплекса HSP70–HMGB1 мы использовали ряд методов, включая малые молекулы и пептиды, подавляющие функцию HSP70 или HMGB1, а также иммунопреципитацию одной из компонент комплекса и иммуноблоттинга. В целях оценки влияния разделения комплекса HSP70–HMGB1 на репопуляционную активность мы использовали такие методы, как МТТ и xCELLigence, а также поставили эксперименты на животных моделях.

Заключение. Мы показали, что вытаскивание одной из компонент комплекса с помощью иммунопреципитации или ингибирование активности HSP70 или HMGB1 приводит к расщеплению комплекса HSP70–HMGB1, значительному снижению опухолевого роста и репопуляции раковых клеток в клеточных моделях РЛ и КРР, что мы также подтвердили по сниженной активности маркера репопуляции простагландин Е и подавлению аутофагии. Более того, разделение комплекса HSP70–HMGB1 привело к серьезному подавлению роста опухолей в животных моделях.

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В *EGFR*, ВЫЗЫВАЮЩИХ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ТИРОЗИНКИНАЗНЫМ ИНГИБИТОРАМ, НА ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Н.А. Барлев¹, Е.В. Байдюк²

¹Университет Назарбаева, Астана, Республика Казахстан;

²ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: nick.a.barlev@gmail.com

Ключевые слова: *EGFR*, ингибиторы тирозинкиназной активности, эпителиально-мезенхимальный переход

Введение. Возникновение точечных мутаций в тирозинкиназном домене гена рецептора эпидермального фактора роста (*EGFR*) приводит к его постоянной активации и, соответственно, к запуску пролиферативных сигнальных путей. Для лечения таких опухолей применяются препараты, ингибирующие киназную активность *EGFR*, — тирозинкиназные ингибиторы.

В ответ на терапию тирозинкиназными ингибиторами у пациентов быстро развивается резистентность, обусловленная появлением дополнительных мутаций в гене *EGFR*. Постоянная активация сигналов пролиферации коррелирует с повышением метастатического потенциала клеток немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Метастазы часто связывают с процессом эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). ЭМП ассоциируется с обширными изменениями в экспрессии ряда генов, включая гены, отвечающие за метаболизм.

Цель исследования — изучение взаимовлияния мутаций в гене *EGFR* и ЭМП, а также их совместного влияния на морфофункциональное состояние митохондрий и метаболизм клеток НМРЛ.

Материалы и методы. Работа проведена на клеточной линии НМРЛ, несущей двойную мутацию в гене *EGFR*, — Н1975 (L858R/T790M) и генно-модифицированной с помощью CRISPR/Cas9 клеточной линии Н1299. Оценку энергетического статуса митохондрий и митохондриальной массы проводили с применением проточной цитометрии. Изменения морфологии митохондрий оценивали с помощью конфокальной и электронной микроскопии. В качестве препарата, повреждающего митохондрии, использовали Benzethonium. Выживаемость клеток оценивали с помощью МТТ-теста.

Результаты. В результате проведенного исследования было получено, что митохондриальный потенциал клеток Н1975 в 4 раза выше, чем таковой у клеток линии Н1299 с «диким» типом *EGFR*. При этом внесение точечных мутаций в гене *EGFR* в клетках Н1299 также приводило к активации митохондрий. Мембранный потенциал митохондрий клеток Н1299 с «диким» типом *EGFR* был в 3 раза ниже, чем в клетках с мутацией в экзоне 21 *EGFR* (L858R), и в 3,5 раза ниже, чем в клетках с двойной мутацией *EGFR* (L858R/T790M). Также клетки с двойной мутацией *EGFR* (Н1299 L858R/T790M и Н1975) были более чувствительны к воздействию препарата Benzethonium Chloride, повреждающему митохондрии, что проявлялось в снижении митохондриального потенциала, продукции активных форм кислорода (АФК) и гибели клеток на меньших концентрациях препарата. Искусственная активация ЭМП за счет сверхэкспрессии регулятора ЭМП (ZEB1) приводила к повышению устойчивости к обработке митоканнами.

Заключение. Таким образом, возникновение точечной мутации L858R в гене *EGFR*, а также двойной мутации L858R/T790M приводит к значительному повышению митохондриальной активности клеток НМРЛ и большей чувствительности к препаратам, повреждающим митохондрии, а активация процесса ЭМП снижает чувствительность клеток к этим препаратам.

РОЛЬ АКТИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ЭЗРИНА В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ГОЛОВЫ И ШЕИ

И.А. Бахронов^{1,2}, Е.Е. Середа^{1,2}, М.Н. Стахеева¹,
В.В. Великая¹, О.В. Черемисина¹, И.В. Кондакова¹,
Е.Л. Чойнзонов¹, Г.В. Какурина^{1,2}

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

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Томск
e-mail: biochem@oncology.tomsk.ru

Ключевые слова: плоскоклеточный рак головы и шеи, эзрин, циркулирующие опухолевые клетки, прогрессия опухоли, метастазирование

Введение. Агрессивность плоскоклеточного рака головы и шеи (ПРГШ) связана с высоким метастатическим потенциалом. Белок-адаптер цитоскелета эзрин (EZR) участвует в образовании фокальных контактов и инвадоподий, опосредуя процессы инвазии и метастазирования. Поэтому актуально определить роль EZR в прогрессировании ПРГШ.

Цель исследования — в сыворотке крови и ткани больных ПРГШ оценить уровень EZR, определить количество EZR-содержащих (EZR⁺) циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и количество EZR⁺-клеток опухоли. Оценить возможность использования EZR в качестве маркера прогрессирования ПРГШ.

Материалы и методы. Образцы от 24 больных ПРГШ (T1–4N0–2M0) были взяты до противоопухолевой терапии. Уровень EZR в сыворотке крови и тканевом материале определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа (ИФА). Количество EZR⁺ ЦОК (CD326⁺) и лейкоцитов (CD45⁺) оценивали методом проточной цитометрии в цельной крови; количество EZR⁺-клеток опухоли — методом TSA-модифицированного иммунофлуоресцентного окрашивания (TSA — tyramide signal amplification). Период наблюдения составил 1 год после проведения противоопухолевого лечения. Для статистического анализа использовали IBM SPSS Statistics 22.0.

Результаты. У больных ПРГШ сывороточный уровень EZR был выше в группе с прогрессированием (52 %), чем в группе без прогрессии ($p = 0,05$). Содержание EZR в опухолевой ткани было значительно выше, чем в морфологически не измененном материале — 20,4 (2,99–41,1) и 2,8 (0,13–12,7) нг/мл соответственно. Количество EZR⁺ ЦОК было в 2 раза выше, чем количество EZR⁺-лейкоцитов ($p = 0,02$), при этом между показателями наблюдалась связь ($r = 0,5$). В ткани первичной опухоли количество опухолевых клеток EZR⁺ было выше в среднем в 3 раза, чем других клеток опухоли, экспрессирующих этот белок: опухолеассоциированных В-лимфоцитов, макрофагов и фибробластов ($p = 0,05$).

Заключение. Впервые дана комплексная оценка содержания EZR в различных биологических образцах

пациентов с ПРГШ: в сыворотке крови, опухолевом и морфологически не измененном материале, в ЦОК, опухолевых клетках, опухолеассоциированных В-лимфоцитах, макрофагах и фибробластах. Полученные данные демонстрируют участие EZR в прогрессировании ПРГШ. Однако для окончательного решения о возможности использования EZR как маркера прогрессирования ПРГШ необходимы дальнейшие исследования.

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ ИЗОФОРМ АКТИНА НА ЯДЕРНЫЕ СТРУКТУРЫ НОРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА: ЯДЕРНУЮ ЛАМИНУ, ХРОМАТИН, ЯДРЫШКО

Л.Д. Бахурина¹, В.Б. Дугина², Н.В. Хромова³, П.Б. Копнин³

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

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва
e-mail: bakhurinalubov@gmail.com

Ключевые слова: изоформы актина, фибробласты, ядро

Введение. Актин принимает участие в мышечной и немusкельной сократимости, клеточной адгезии, миграции и процессах деления клетки. Цитоплазматические изоформы актина, в отличие от мышечных, присутствуют во всех клетках организма. Изучены различия функций β - и γ -изоформ: β -актин участвует в межклеточной адгезии, контрактильности и натяжении, а γ -актин отвечает за подвижность клеток и пластичность кортекса. При этом актин обнаруживается не только в цитоплазме клеток, но еще и в ядре клеток. Актин связан со следующими функциями в ядре: ремоделированием хроматина, транскрипцией, репликацией, репарацией ДНК, а также с движением хромосомных локусов и ядерно-цитоплазматическим транспортом. Роли различных изоформ актина в этих процессах изучены мало.

Цель исследования — изучение влияния реорганизации актина на структуру ядра нормальных фибробластов при изменении соотношения цитоплазматических изоформ.

Материалы и методы. Работу проводили на первичных культурах нормальных фибробластов человека. Для избирательного снижения экспрессии β - и γ -изоформ актина использовали метод РНК-интерференции с помощью лентивирусных генно-инженерных конструкций. Применяли следующие методы: иммунофлуоресцентный анализ, вестерн-блоттинг и морфометрию.

Результаты. В ходе данной работы был проведен поиск ядерных мишеней, на которые влияют изменения экспрессии изоформ актина. Выявлены иммуноцитохимические и морфологические различия ядер

и ядерных структур клеток с пониженной экспрессией β - или γ -актина. Описаны изменения морфологии ядра и хроматина, накопление ламинов в ядерной оболочке, морфология и распределение ядерных телец, а также уровень экспрессии и накопления ядрышковых белков.

Заключение. Обнаружено, что изменение соотношения изоформ актина влияет на морфологию и площадь ядра фибробластов: при снижении экспрессии β -СУА площадь ядра увеличивается более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Иммунофлуоресцентный анализ и белковый иммуноблоттинг показали, что снижение уровня экспрессии β - и γ -изоформ актина вызывает различные качественные и количественные изменения ядерной ламины нормальных фибробластов человека: интенсивность флуоресценции ламинов А и В значительно возрастает в клетках со сниженной экспрессией γ -СУА. Иммуноцитохимическое окрашивание фибрилларина выявило морфологические различия организации ядрышек в фибробластах с разными уровнями экспрессии цитоплазматических изоформ. Изменения в ремоделировании хроматина ярче выражены в клетках со сниженной экспрессией γ -цитоплазматического актина: в таких клетках наблюдается значительное увеличение флуоресценции корового гистона H3 и линкерного гистона H1.

Таким образом, показано, что цитоплазматические изоформы актина выполняют различные функции в процессах ремоделирования хроматина и поддержания функциональной архитектуры ядра в нормальных фибробластах человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 20-15-00321).

СЕЛЕКТИВНАЯ РОЛЬ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ α И ИНТЕРЛЕЙКИНА 10 В РЕГУЛЯЦИИ БАРЬЕРНЫХ СВОЙСТВ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ 1,2-ДИМЕТИЛГИДРАЗИНОМ

В.В. Бекусова, Т.И. Зудова, И.Р. Фатыйхов,
А.А. Федорова, А.Г. Марков

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург
e-mail: v.bekusova@spbu.ru

Ключевые слова: толстая кишка, гетерогенность, колоректальный рак, барьерные свойства, белки плотных контактов, фактор некроза опухолей α , интерлейкин 10, 1,2-диметилгидразин, крыса

Введение. Ранее нами было установлено, что при канцерогенезе, индуцированном 1,2-диметилгидразином (ДМГ), у крыс парацеллюлярная проницаемость прилежащих к опухолям участков толстой кишки увеличена по сравнению с контролем (Bekusova et al., 2018). КРР сопровождается повышенным уровнем

цитокинов, в частности фактора некроза опухолей α (ФНО- α) и интерлейкина 10 (ИЛ-10), которые оказывают регуляторное действие на ее барьерную функцию. Барьерные свойства проксимального отдела толстой кишки выражены лучше по сравнению с ее дистальным отделом (Bekusova et al., 2021). Мы предположили, что цитокины могут оказывать неодинаковое действие на барьерные свойства разных отделов толстой кишки, способствуя развитию право- или левостороннего рака.

Цель исследования — проанализировать уровень ФНО- α и ИЛ-10 в проксимальных и дистальных сегментах толстой кишки крысы при ДМГ-индуцированном канцерогенезе в зависимости от стороны локализации опухолей и изучить влияние ФНО- α и ИЛ-10 на барьерные свойства проксимальных и дистальных сегментов толстой кишки у здоровых крыс.

Материалы и методы. Использовали следующие методы: ИФА, регистрацию электрофизиологических параметров в камере Уссинга, спектрофлуориметрию, вестерн-блоттинг.

Результаты. Посегментный ИФА содержания цитокинов в толстой кишке показал, что у ДМГ-крыс с опухолями в дистальном отделе толстой кишки концентрация ФНО- α в опухолях была снижена по сравнению с контролем. При локализации опухолей не только в дистальном, но и в проксимальном отделе толстой кишки концентрация ИЛ-10 была повышена во всех участках ее проксимального отдела (число контрольных крыс 6, число экспериментальных крыс 14). Анализ трансэпителиального электрического сопротивления, тока короткого замыкания и парацеллюлярной проницаемости для флуоресцеина натрия сегментов толстой кишки в камере Уссинга после интралюминальной инкубации изолированных участков толстой кишки с цитокинами *in vivo* в течение 4 ч показал избирательное действие цитокинов на барьерные свойства толстой кишки. Вестерн-блот-анализ уровня белков плотных контактов выявил изменения их экспрессии только в проксимальном отделе толстой кишки: снижение уровня клаудина 1 при действии ФНО- α и снижение уровня клаудина 1, 2 и 4, а также увеличение уровня окклюдина при действии ИЛ-10.

Заключение

1. Цитокины оказывали селективное действие на регуляцию барьерных свойств проксимального и дистального отделов толстой кишки, причем ФНО- α снижал барьерные свойства преимущественно дистального отдела, а ИЛ-10 — только проксимального отдела толстой кишки.

2. Молекулярные изменения уровня белков плотных контактов при действии цитокинов проявились только в проксимальном отделе толстой кишки, что может свидетельствовать о высокой чувствительности этого отдела к действию цитокинов и относительно высокой способности его к перестройкам на молекулярном уровне.

3. ФНО- α не оказывал влияния на барьерные свойства толстой кишки у ДМГ-крыс, а ИЛ-10 играл

существенную роль в регуляции барьерной функции проксимального отдела толстой кишки при ДМГ-индуцированном канцерогенезе.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-01050.

УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ ХЕМОКИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ CXCR1 И CXCR2 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.И. Белевич, В.И. Прохорова, Т.П. Цырусь, О.В. Готько, Л.А. Державец, Н.А. Мавричева, А.А. Романчик

*ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Минск, Республика Беларусь
e-mail: Catherina_Bel_@tut.by*

Ключевые слова: рак молочной железы, хемокиновые рецепторы, лейкоциты

Введение. Одной из самых актуальных проблем в современной онкологии является РМЖ. Сохраняет значимость изучение роли иммунных механизмов в процессе канцерогенеза. Продуцируемый опухолевыми клетками ИЛ-8 взаимодействует с экспрессированными на поверхности клеток-мишеней (лейкоциты периферической крови) хемокиновыми рецепторами CXCR1 и CXCR2. Активацию CXCR1/CXCR2-путей связывают с агрессивностью опухоли и неблагоприятным прогнозом течения заболевания. Однако роль рецепторов CXCR1 и CXCR2 в развитии иммунного ответа и их прогностическая значимость при РМЖ все еще остаются предметом дискуссии.

Цель исследования — определить уровни экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR1 (CD181) и CXCR2 (CD182) на поверхности лейкоцитов крови пациентов с установленным диагнозом РМЖ и здоровых лиц.

Материалы и методы. В исследовании были использованы образцы крови пациентов с верифицированным РМЖ, полученные до начала лечения (группа РМЖ; $n = 60$), и образцы крови здоровых лиц (контрольная группа; $n = 30$). Определение экспрессии рецепторов CXCR1 и CXCR2 проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Об уровнях экспрессии рецепторов на поверхности клеток крови судили по средним значениям интенсивности флуоресценции флуоресцентно меченных антител против CD181 и CD182 соответственно. Статистический анализ результатов проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. В группе РМЖ, по сравнению с контрольной группой, обнаружено статистически значимое увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности как рецептор CXCR1, так и рецептор CXCR2, в 1,8 и 1,4 раза соответственно. Кроме этого, в группе РМЖ показано значимое увеличение уровня экспрессии рецептора CXCR1 на поверхности

лимфоцитов в 1,6 раза и гранулоцитов в 1,3 раза по сравнению с популяцией CXCR1-положительных клеток крови здоровых лиц. Статистически значимое увеличение в 1,4 раза уровня экспрессии CXCR2 установлено у CXCR2-положительных моноцитов крови пациентов группы РМЖ по сравнению с контрольной группой.

Заключение. Выявлены статистически значимые различия как уровней экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR1 и CXCR2, так и относительного содержания CXCR1- и CXCR2-положительных клеток крови пациентов, страдающих РМЖ, по сравнению с контрольной группой. При дальнейшем сопоставлении изученных показателей с выживаемостью пациентов будет оценена их прогностическая значимость.

РОЛЬ ACTN4 В ПОДВИЖНОСТИ РАКОВЫХ КЛЕТОК

Г.В. Васильева, К.С. Новицкая, Д.В. Кригер, Д.Г. Тентлер
*ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: vip.giomar@mail.ru*

Ключевые слова: ACTN4, актинин 4, клеточная миграция, рак легкого

Введение. ACTN4 (α -актинин 4) — актинсвязывающий белок, участвующий в различных клеточных процессах, включая характерные для опухолей. Экспрессия ACTN4 повышена в инвазивных участках некоторых солидных опухолей, при этом подавление ACTN4 замедляет миграционные способности раковых клеток, т.е. выяснение механизмов участия ACTN4 в подвижности клеток важно для развития новых методов терапии рака. В ряде работ было показано, что ACTN4 влияет на активность транскрипционного фактора NF- κ B. Наши данные указывают на то, что эффект ACTN4 на миграционную активность раковых клеток может частично быть результатом влияния на NF- κ B-зависимую транскрипцию генов.

Цель исследования — изучение роли ACTN4 в подвижности раковых клеток HMP1. Основным подходом в работе является получение линий с CRISPR/Cas9 нокаутом (KO) и с сверхэкспрессией (OE) ACTN4. В качестве объекта были выбраны линии клеток с эпителиальным (H460) и более подвижным, мезенхимным (H1299) фенотипом.

Материалы и методы. Оценку подвижности клеток в результате нокаута и сверхэкспрессии ACTN4 проводили с помощью тестов на «заращение раны», а также с использованием системы анализа клеток в реальном времени xCELLigence. Мы также изучили траекторию движения клеток в реальном времени с помощью конфокальной системы CQ1 (Yokogawa). Для описания морфологии использовали метод иммуцитохимического окрашивания клеток.

Результаты. Наши предварительные данные показывают, что замедление движения раковых клеток при нокауте ACTN4 не связано с программой ЭМП,

а происходит в результате нарушения способности клеток двигаться направленно. В ходе поиска механизма такого нарушения мы обнаружили, что в нокаутных клонах снижена экспрессия ICAM. Это говорит о том, что ACTN4 может влиять на направленное движение клеток, возможно, через подавление NF-κB-сигналинга. Для того чтобы выяснить, происходит ли подавление NF-κB-пути на уровне передачи сигнала в цитоплазме клетки или транскрипционной активности RelA в ядре, мы активировали NF-κB с помощью ФНО-α, а также экзогенной экспрессией RelA. На следующем этапе мы планируем сделать ChIP, чтобы убедиться в совместном присутствии ACTN4 и RelA на промоторе ICAM. Также планируется получить клеточные линии РЛ со сверхэкспрессией ICAM1, чтобы проверить, восстановится ли направленность движения клеток.

Заключение. Таким образом, изменение экспрессии ACTN4 может влиять на подвижность раковых клеток за счет изменения клеточного сигналинга через NF-κB-путь.

ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМА ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ЛИНИИ BT549 С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА MYC

К.А. Гаптулбарова^{1,2}, Е.В. Сухинина³, М.К. Ибрагимова¹⁻³,
М.М. Цыганов¹⁻³, К.В. Невская³,
И.А. Цыденова^{1,2}, Д.С. Долгашева^{1,2}, А.Г. Першина³,
Н.В. Литвяков¹⁻³,

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

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

³ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск
e-mail: xenia.gaptulbarova@yandex.ru

Ключевые слова: дедифференцировка клеток, гиперэкспрессия MYC, BT549

Введение. Ранее нами была показана ассоциация способности опухолевых клеток к дедифференцировке до стволовых клеток в зависимости от количества амплификаций генов стволовости, которые обуславливают их гиперэкспрессию. Клеточная линия РМЖ BT549 имеет только 1 амплификацию гена стволовости KLF5 и самую низкую из всех стандартных опухолевых линий молочной железы способность к дедифференцировке с образованием маммосфер. С помощью метода CRISPER/Cas9 SAM-активации была получена генетически модифицированная клеточная линия BT549 с эктопической экспрессией гена MYC.

Цель исследования — оценка изменений транскриптома модифицированной линии и ее способности к дедифференцировке по сравнению с исходной.

Материалы и методы. Исходная и модифицированная клеточные линии были культивированы в полных питательных средах. Полнотранскриптомный микроматричный анализ проводили на микрочипах Clariom™

S Assay, human (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ данных осуществляли с помощью программы Transcriptome Analysis Console (TAC) software 4.0.

Результаты. Проведено сравнение экспрессионного профиля модифицированной и исходной линий BT549. Гиперэкспрессия белка Myc была подтверждена с помощью антител, и по данным микроматричного анализа экспрессия гена MYC повышалась в 5 раз, также значительно повышалась экспрессия еще 3 генов стволовости (SMO, GATA3 и LIFR). В модифицированной линии была повышена экспрессия 2957 генов (почти 2 тыс. из них — гены-мишени MYC) и снижена экспрессия 948 генов. Топ 10 по FoldChange up-regulated генов — CSAG1, SLC7A2, BMP5, PDGFRL, SULF2, MTUS1, LGALS1, FAM69A, LPAR3, MSII; топ 10 генов down-regulated — BMP4, CFB, PRRX1, MX1, KRT7, OAS1, BST2, LRRN1, TMEM47, SRGN. Топ сигнальных путей — Malignant pleural mesothelioma, VEGFA-VEGFR2 signaling pathway, miR-targeted genes in muscle cell, PI3K-Akt-mTOR-signaling pathway, Chemokine signaling pathway. Кроме генов стволовости для дедифференцировки критически важен WNT-сигналинг. Из 172 генов этого pathway активировалась экспрессия 33 генов, а ингибировалась активность 7 генов. Исходная клеточная линия образовывала единичные маммосферы на лунку, частота маммосфер модифицированной линии колебалась от 7 до 15.

Заключение. Это исследование доказывает критически важную роль эктопической экспрессии генов стволовости, в частности MYC, для способности опухолевых клеток к дедифференцировке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 075-15-2021-1073).

ДИНАМИКА ПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ИММУННЫХ КЛЕТОК В КРОВИ И ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ ХИМИОТЕРАПИИ

Т.С. Герашенко, М.Р. Патышева, А.А. Фролова,
А.А. Федоров, П.С. Ямщиков, Е.Ю. Гарбуков,
О.Д. Брагина, Е.В. Денисов

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: t_gerashenko@list.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, химиотерапия, иммунная система, секвенирование единичных клеток

Введение. Трижды негативный РМЖ — высокоиммуногенный подтип, характеризующийся агрессивным течением. Ввиду отсутствия мишеней для воздействия гормональной (ER, PR) или таргетной (HER2/neu) терапии неoadъювантная ХТ (НХТ) является основным методом системного лечения пациенток с трижды негативным РМЖ, тем не менее ее эффективность остается низкой. Известно, что компоненты иммунной

системы динамически реагируют на противоопухолевое лечение, играя важную роль в реализации химиотерапевтического ответа. Изучение вовлеченности иммунных клеток в реализацию ответа на НХТ является актуальной задачей, решение которой необходимо для определения тактики лечения и персонализации терапевтического подхода.

Цель исследования — изучение изменений популяционного состава мононуклеаров периферической крови и компонентов опухолевого микроокружения в процессе НХТ при трижды негативном РМЖ.

Материалы и методы. Парные образцы венозной крови и ткани трижды негативного РМЖ получены до начала химиотерапевтического лечения и на 3-и и 21-е сутки после проведения 1 курса НХТ. Оценка концентрации и жизнеспособности клеток проведена с помощью красителей Calcein/DRAQ7 и проточной цитофлуориметрии (CytoFLEX, Beckman Coulter, США), селекция жизнеспособных клеток — с помощью проточной сортировки (Sony SH800, Sony Biotechnology, США). Секвенирование РНК единичных клеток выполнено с использованием таргетной панели Immune Response по технологии Rhapsody Express (Becton Dickinson, США) на платформе Genolab M (GeneMind Biosciences, Китай). Биоинформатический анализ данных выполняли с применением программ Seurat и SingleR.

Результаты. В крови и опухолевой ткани идентифицированы основные популяции иммунных клеток: В-(CD79⁺), NK-(KIR2DL⁺), DC-(CD135⁺), Т-(CD4⁺), Т-(CD8⁺), Т-регуляторные (CD25⁺, FOXP3⁺) клетки и моноциты (CD14⁺CD16⁻ и CD14⁺CD16⁺). Под действием НХТ в крови наблюдались следующие изменения состава мононуклеаров: на 3-и сутки истощался пул моноцитов с последующим их увеличением к 21-м суткам, исчезала популяция Т-регуляторных клеток, увеличивалась популяция NK-клеток; наблюдалась гиперэкспрессия генов *TRAC*, *S100A9*, *CD2*, *SELPLG*, *CX3CR1*, вовлеченных в процессы хемотаксиса лимфоцитов, миграции моноцитов в ткани, презентации антигенов и иммунное распознавание. В опухолевой ткани под влиянием НХТ увеличивалось количество Т-цитотоксических, Т-регуляторных и Т-клеток памяти, повышалась экспрессия генов *CXCL13*, *GZMB*, *CTLA4*, *HAVCR2*, участвующих в хемотаксисе В-лимфоцитов, индукции апоптоза в опухолевых клетках и иммунном ответе.

Заключение. Под влиянием ХТ происходит обновление популяционного состава иммунных клеток в крови и ткани трижды негативного РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-75-10128).

ЗНАЧИМОСТЬ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЕЙ ОНКОМАРКЕРОВ CYFRA 21-1, PROGRP И СЕА У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО ДО И ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ

О.В. Готько, В.И. Прохорова, А.А. Царик, Т.П. Цырусь, Е.И. Белевич, О.А. Грицкова, А.М. Романчик

ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Минск, Республика Беларусь
e-mail: babuka_05@mail.ru

Ключевые слова: онкомаркер, CYFRA 21-1, ProGRP, СЕА, немелкоклеточный рак легкого

Цель исследования — оценить значимость изменений уровней онкомаркеров CYFRA 21-1, ProGRP и СЕА у пациентов, страдающих НМРЛ, до и после проведенного лечения.

Материалы и методы. В основу работы положены данные о 24 пациентах (19 мужчинах и 5 женщин) с НМРЛ (12 пациентов с I, 5 — со II, 7 — с III стадией заболевания). Средний возраст составил $58,1 \pm 10,6$ (28–81) года. У 6 пациентов диагностировано прогрессирование опухолевого процесса в течение первого года наблюдения.

Уровни CYFRA 21-1, ProGRP, СЕА в сыворотке крови определяли до начала лечения, через 3 нед и 3 мес после окончания лечения. Полученные данные обработаны непараметрическими методами с использованием компьютерного пакета программ Statistica 10.0.

Результаты. Установлены статистически значимые различия уровней CYFRA 21-1 и ProGRP через 3 нед после окончания лечения ($p = 0,002$ и $p = 0,02$ соответственно), а также CYFRA 21-1 и СЕА через 3 мес после окончания лечения ($p = 0,009$ и $p = 0,03$ соответственно) по сравнению с исходными.

При сравнении изменений изучаемых показателей в зависимости от наличия или отсутствия прогрессирования установлено, что без прогрессирования значения CYFRA 21-1 через 3 нед и через 3 мес после лечения снизились в 1,9 и 2,1 раза по сравнению с исходными ($p = 0,006$ и $p = 0,005$ соответственно), у пациентов с прогрессированием — в 1,7 раза через 3 нед и на 25 % через 3 мес после лечения по сравнению с исходными, однако различия не были статистически значимыми ($p = 0,14$ и $p = 0,6$ соответственно).

Значения ProGRP у пациентов без прогрессирования через 3 нед и 3 мес после лечения снизились по сравнению с исходными в 1,2 и 1,3 раза ($p = 0,047$ и $p = 0,1$ соответственно). У пациентов с прогрессированием уровень маркера через 3 нед после лечения снизился на 28 %, а через 3 мес повысился на 7,4 %, однако различия не были статистически значимыми.

Через 3 нед после окончания лечения значения СЕА у пациентов без прогрессирования снизились в 1,4 раза, с прогрессированием — в 1,2 раза по сравнению

с исходными, а через 3 мес после лечения — в 1,6 и 1,3 раза ($p = 0,039$ и $p = 0,052$ соответственно).

Заключение. Установлено статистически значимое снижение уровней CYFRA 21-1, CEA и ProGRP в динамике у пациентов с НМРЛ. Также отмечено статистически значимое снижение уровня CYFRA 21-1 у пациентов без прогрессирования, в то время как в группе с прогрессированием его снижение было незначимым. Исследование продолжается.

ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ НА ЭСТРОГЕНОВЫЙ СИГНАЛИНГ В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.В. Гудкова, В.Е. Разуваева, Ю.Ю. Щеголев,
О.Е. Андреева, Д.В. Сорокин, А.М. Щербаков,
М.А. Красильников

НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва
e-mail: krasilnikovm1@yandex.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, облучение, рецептор эстрогенов ER α , Akt

Введение. Радиотерапия ЗНО занимает центральное место в консервативном лечении опухолей, и исследование механизма индуцированных облучением изменений в клетках, природы клеточной гибели является одной из актуальных задач современной онкологии. Вопрос об эффективности сочетания различных видов консервативной терапии РМЖ, в том числе облучения и гормональной терапии, во многом остается открытым и практически не исследовался на экспериментальном уровне. Большинство работ в этом направлении основаны на изучении клинических данных, и результаты таких исследований зачастую оказываются противоречивыми.

Цель исследования — изучение влияния ДНК-повреждающего облучения на гормональный аппарат клеток РМЖ и молекулярного механизма, лежащего в основе индуцированных облучением изменений гормонального сигналинга опухолевых клеток.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на культивируемых *in vitro* клетках эстрогензависимого РМЖ MCF7. В качестве экспериментальной модели для моделирования ответа опухолевых клеток на ДНК-повреждающие воздействия использовали ультрафиолетовое облучение в диапазоне 254 нм с интенсивностью от 25 до 50 J/m². Для анализа выживаемости клеток использовали колониеобразующий тест; уровень экспрессии белков определяли методом вестерн-блоттинга; анализ транскрипционной активности рецептора эстрогенов проводили с помощью репортерного анализа.

Результаты. Мы показали, что однократное облучение клеток MCF7 приводит к резкому снижению экспрессии и активности рецептора эстрогенов ER α , развивающемуся на фоне выраженной активации клю-

чевого антиапоптотического белка — протеинкиназы Akt — активации, носящей, вероятно, компенсаторный характер. Описанные изменения носили кратковременный характер и исчезали в течение 10 сут культивирования клеток после облучения. В то же время хроническое облучение клеток приводило к формированию пула радиорезистентных клеток, характеризующихся необратимым снижением активности ER α , конститутивной активацией протеинкиназы Akt и демонстрирующих перекрестную резистентность к облучению и антигормональным соединениям.

Заключение. Длительное облучение клеток эстрогензависимого РМЖ приводит к необратимому подавлению эстрогенового сигналинга и развитию резистентности к антигормональным препаратам, что свидетельствует о возможном снижении чувствительности опухолей молочной железы к гормонотерапии в зависимости от продолжительности и дозы облучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 22-25-00368).

РОЛЬ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ Set7/9 В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К ГЕНОТОКСИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

А.А. Дакс, Д.А. Мяделец, Ю.Д. Васильева, С.Е. Парфеньев,
А.В. Жарова, О.Ю. Шувалов, О.М. Семенов,
О.А. Федорова, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: alexandra.daks@gmail.com

Ключевые слова: рак молочной железы, Set7/9, эксцизионная репарация, цисплатин, лекарственная устойчивость, ABC-транспортеры

Введение. РМЖ — наиболее часто диагностируемое ЗНО у женщин во всем мире. Несмотря на значительный прогресс в разработке методов диагностики и терапии данного заболевания, приобретение устойчивости клеток РМЖ к препаратам, оказывающим генотоксическое действие, является актуальной проблемой современной онкологии.

Метилтрансфераза Set7/9 — фермент, метилирующий остатки лизинов как гистонов, так и негистоновых белков. Так, осуществляя посттрансляционные модификации различных вариантов гитонов H1, H2 и H3, Set7/9 принимает участие в ремоделировании хроматина и регуляции экспрессии генов. Кроме этого, среди белковых мишеней Set7/9 можно выделить такие онкоассоциированные факторы, как p53, NF- κ B, E2F1, HIF-1 α и многие другие, что позволяет предположить участие Set7/9 в опухолевой трансформации клеток и приобретении раковыми клетками лекарственной устойчивости.

Цель исследования — изучить влияние Set7/9 на чувствительность клеток РМЖ к цисплатину, а также

определить роль данной метилтрансферазы в регуляции факторов эксцизионной репарации и генов множественной лекарственной устойчивости (МЛУ).

Материалы и методы. Чувствительность клеток РМЖ с различным статусом Set7/9 к цисплатину оценивали с помощью теста на цитотоксичность и МТТ-теста. Уровень апоптоза определяли методом окраски Annexin V/PI с последующей проточной цитофлуориметрией. Уровень экспрессии факторов репарации и генов МЛУ определяли с помощью Microarray-анализа, ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга. Также проводили биоинформатический анализ зависимости выживаемости пациентов с РМЖ от уровня экспрессии метилтрансферазы Set7/9.

Результаты. В результате было показано, что подавление Set7/9 в клетках РМЖ различных субтипов вызывало активацию экспрессии генов, кодирующих факторы эксцизионной репарации и МЛУ. Активация данных факторов также подтвердилась и на белковом уровне. Кроме того, было продемонстрировано, что подавление Set7/9 приводит к повышению устойчивости клеток РМЖ к обработке цисплатином, что соответствует данным о Set7/9-зависимой негативной регуляции факторов, участвующих в нейтрализации генотоксического действия препарата платины на клетки.

Закключение. На сегодняшний день известно, что и факторы репарации, и гены МЛУ участвуют в формировании резистентности раковых клеток к генотоксической терапии. Полученные нами данные позволяют рассматривать Set7/9 как биомаркер и потенциальную мишень для разработки подходов к преодолению устойчивости клеток РМЖ к ХТ.

ХАРАКТЕР КОЛЛЕКТИВНОЙ МИГРАЦИИ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ MCF10A ЗАВИСИТ ОТ МУТАЦИЙ *PTEN* И *ZFHX3*, ОБНАРУЖЕННЫХ У ПАЦИЕНТОК С РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А. Даюб^{1,2}, М.Е. Ломакина², А.И. Фокин³, Н.М. Новиков⁴,
Р.С. Воробьев⁵, Е.В. Денисов⁵, А.М. Готро⁴,
А.Ю. Александрова²

¹ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт
(Национальный исследовательский университет)»,
Долгопрудный;

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

³Institut Curie, Париж, Франция;

⁴Ecole Polytechnique, Париж, Франция;

⁵НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: ali7r7dayoub@gmail.com

Ключевые слова: эпителиально-мезенхимальный переход, коллективная миграция

Введение. В настоящее время РМЖ — наиболее распространенный рак у женщин. Методом полноэкзомного секвенирования было показано, что у пациенток

с РМЖ встречаются мутации, подавляющие активность *PTEN* и *ZFHX3*. Мало изучено, оказывают ли эти мутации влияние на миграцию и инвазию опухолевых клеток, а также на проявление ЭМП.

Цель исследования — проанализировать влияние каждой из мутаций (*PTEN* и *ZFHX3*) и их комбинации на развитие подвижных фенотипов эпителиальных клеток молочной железы.

Материалы и методы. Методом CRISPR/Cas9 мутации *PTEN* и *ZFHX3* реконструировали в эпителиальных клетках молочной железы MCF10A. Были получены клеточные линии с нокаутом этих генов *PTENKO* и *ZFHX3KO* и линия с двойным нокаутом *PTEN* и *ZFHX3* — *DKO*. С помощью прижизненной видеомикроскопии исследовали движения островков (7–10 клеток) и «заращение экспериментальной раны» полученных клеточных линий. С использованием метода PIV (Particle Image Velocimetry) анализировали коллективную миграцию клеток внутри монослоя. С помощью вестерн-блоттинга оценивали количество маркеров ЭМП белка виментина, Е-кадгерина и Р-кадгерина. Морфологию межклеточных контактов исследовали с помощью конфокальной микроскопии и иммунофлуоресцентного окрашивания Е-кадгерина.

Результаты

1. Видеоанализ показал, что нокаут *PTEN* стимулирует групповую миграцию клеток, организованных в небольшие островки. Нокаут *ZFHX3* вызывает увеличение скорости миграции отдельных клеток и способствует их расползанию из островков, но не стимулирует направленную подвижность самих островков.

2. Внутри монослоя *ZFHX3KO* и *PTENKO* демонстрировали противоположные миграционные характеристики. Клетки *PTENKO* показывали высокоскоординированное коллективное движение и ускоренное «заращение экспериментальной раны»; клетки *ZFHX3KO* демонстрировали плохую координацию движения во время миграции монослоя и плохое «заращение экспериментальной раны». Комбинация *DKO* приводила к усилению коллективного поведения клеток и увеличению скорости «заращения раны», но эти эффекты были проявлены на среднем уровне.

3. Вестерн-блоттинг показал, что нокаут *ZFHX3* и двойной нокаут обоих генов приводили к увеличению уровня экспрессии виментина (маркер ЭМП), в отличие от нокаута *PTEN*. Не было различий в содержании Е-кадгерина и Р-кадгерина между исследуемыми клеточными линиями, но конфокальная микроскопия показала, что у клеток *ZFHX3KO* межклеточные контакты радиального типа, а у клеток *PTENKO* сохраняются как тангенциальные, так и радиальные контакты, как в контроле.

Закключение. Нокауты *PTEN* и *ZFHX3* вызывают гибридный ЭМП, причем фенотип клеток *ZFHX3KO* ближе к мезенхимальному состоянию по сравнению с *PTENKO*. Групповая миграция клеток *PTENKO* более эффективна, чем миграция более мезенхимальных

ZFNХЗКО. DKO демонстрируют промежуточный характер миграции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 22-25-00571).

АНТИКАНЦЕРОГЕННЫЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ КАНЦЕРОГЕНЕЗА *IN VIVO*

В.П. Дерягина, Н.И. Рыжова, Л.А. Савлущинская,
И.С. Голубева, К.И. Кирсанов

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: derygina@inbox.ru

Ключевые слова: галловая кислота, антиканцерогенное действие, противоопухолевый эффект

Введение. Результаты эпидемиологических исследований свидетельствуют о том, что растительная диета снижает риски онкологических заболеваний. В состав растительных продуктов входят биологически активные соединения, обладающие антиканцерогенным действием. Одним из таких агентов является содержащаяся в овощах и фруктах галловая кислота (ГК), для которой была продемонстрирована способность влиять на скорость пролиферации, уровень активации апоптоза, ангиогенез и способность опухолевых клеток к метастазированию.

Цель исследования — изучение противоопухолевой активности ГК и механизмов ее действия на перевиваемых моделях опухолей с разной метастатической активностью, а также антиканцерогенной активности ГК на модели индуцированного ДМГ канцерогенеза.

Материалы и методы. Опухолевые клетки карциномы Эрлиха и карциномы Льюиса перевивали подкожно мышам F1 (C57BlxСВА) и СВА соответственно. Моделирование индуцированного ДМГ канцерогенеза (агент вводили в дозе 3,6 мг/кг/сут в течение 20 нед) проводили на мышах СВА. Образование АФК определяли хемилюминесцентным методом. Эндогенный синтез метаболитов NO оценивали спектрофотометрическим методом по выделению с мочой NO₂ и NO₃. Морфологическую характеристику опухолей осуществляли в соответствии с классификацией Международного агентства по изучению рака (МАИР).

Результаты. В тест-системе гемоглобин—люминол—пероксид водорода—нитрит натрия, генерирующей АФК и радикалы, инициированные нитритом, показана выраженная антирадикальная активность ГК. На фоне 3-недельного поступления в организм мышей ГК в дозе 100 мг/кг регистрировали задержку формирования опухолевых узлов и ингибирование развития карциномы Эрлиха до 91 %. При этом избыточный эндогенный синтез NO₂ и NO₃ снижался на 32 %. При введении ГК (30 мг/кг) мышам с метастазирующей карциномы Льюиса отмечали торможение роста опу-

холей до 78 % и снижение количества метастазов в легкие в 3 раза ($p < 0,01$).

При введении ГК до начала введения ДМГ (индукция канцерогенеза) наблюдали снижение частоты появления индуцированных опухолей толстой кишки на 47 %. Эффекты ГК на развитие опухолей в других органах отсутствовали. При введении ГК после курса ДМГ эффекты от введения ГК были более выраженными: доля животных с опухолями печени, толстой кишки, гормонозависимыми опухолями была соответственно на 43, 69 и 75 % меньше по сравнению с контролем. При этом показатель множественности злокачественных опухолей был ниже в 2,7 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. Выделение избыточного NO₂ с мочой у мышей с индуцированными опухолями под воздействием ГК было значительно ниже по сравнению с показателем контроля.

Заключение. Таким образом, ГК на разных опухолевых моделях существенно ингибировала канцерогенез, в том числе за счет снижения образования реакционных производных NO и АФК. Полученные данные дают основание рассматривать ГК в качестве перспективного соединения для химиопрофилактики онкологических заболеваний.

МЕХАНИЗМЫ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НЕСТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДО СТЕВОВЫХ

Д.С. Долгашева¹, К.В. Невская², А.Г. Першина²,
Н.В. Литвяков¹

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

²Центральная научно-исследовательская лаборатория
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Томск
e-mail: normikus.18.97@gmail.com

Ключевые слова: рак молочной железы, метастазирование, опухолевые стволовые клетки, дедифференцировка, гены стволовости

Введение. Известно, что способность к дедифференцировке у нестволовых раковых клеток определяет злокачественность опухоли и ее способность метастазировать.

Цель исследования — изучение механизмов регуляции дедифференцировки опухолевых нестволовых клеток на моделях *in vitro*.

Материалы и методы. Использовали клеточные линии PMЖ BT549, MDA-MB-231, MCF7, SK-BR-3 и T47D. CNA-генетического ландшафта и транскриптом клеток исследовали на микрочипах CytoScan HD Array и Clariom™ S Assay соответственно. Субпопуляционный состав изучали на проточном цитометре. Отбор целевых клеток проводили на Sony SH800 (Sony Biotechnology, США). Также использовали ингибиторы генов *TERT* (BIBR1532), *MYC* (10058-F4) и *NOTCH1* (FLI-06).

Результаты. Все клеточные линии, кроме BT549, несут более 2 амплификаций генов стволовости. У MCF7 субпопуляция дифференцированных опухолевых клеток (ДОК) составляет 13 %, у T47D — 29 %. Клетки MCF7 «дикого» типа без индукции ИЛ-6 образуют маммосферы на 14-е сутки роста, но с ИЛ-6 на 14-е и 21-е сутки наблюдается много крупных маммосфер. ДОК MCF7 без ИЛ-6 образуют мелкие сфероиды на 21-е сутки, а в присутствии ИЛ-6 — на 14-е сутки. Сравнение экспрессии генов стволовости на 3-и и 21-е сутки показало, что вначале в группе ДОК + ИЛ-6 снижается экспрессия *VIM*, *TERT* и *LNMB2* и повышается *KLF4*. На этапе маммосферообразования усиливается экспрессия *LMNB2*, *SOX4*, *FZD1*, *MYC*, *BM11*, *KLF5*, *SMAD9*, *SMAD4*, *SMAD2*, *HIF3A* и снижается экспрессия *DPPA4*, *SNAI2*, *SOX1*, *FLT3*. Действие ИЛ-6 на клетки «дикого» типа и ДОК различно. На 3-е сутки в клетках «дикого» типа ИЛ-6 активирует *SOX2*, *TERT* и ингибирует *PIM1*, а в ДОК снижает экспрессию *LMNB2*, *VIM* и *SMAD9*. На 21-е сутки ИЛ-6 в клетках «дикого» типа активирует *DPPA4*, *SOX1*, *SMO*, *MOB3B*, *LAT* и ингибирует *KLF5*, *KLF4*, *MYC*, *LNMB2*, *SMAD2*, *SMAD4*, *BM11*, а в ДОК активирует *SMAD9*, *SMAD2*, *KLF6*, *BM11*, *MYC* и подавляет *FLT3*, *DPPA4*, *SNAI2*. В ДОК T47D без ИЛ-6 на 7-е сутки роста образуются полноценные маммосферы. На 21-е сутки маммосфер в группе с ДОК меньше, чем в контроле, однако клеточность в контроле больше. Ингибиторы B1R1532 и 10058-F4 блокируют дедифференцировку ДОК T47D до опухолевых стволовых клеток (ОСК) и активность ОСК в клетках «дикого» типа. FLI-06 угнетает дедифференцировку ДОК до ОСК и активность ОСК в клетках «дикого» типа. Комплекс ингибиторов в ДОК T47D подавляет дедифференцировку до ОСК. B1R1532 снижает экспрессию *MYC*, *FZD9*, *NANOG*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FZD1*, *SMO*, *MOB3B*, *ITGB1*, *BM11*, *TGFBR1* и активирует *KLF6* и *LAT*; 10058-F4 подавляет экспрессию *MYC*, *NANOG*, *FZD9*, *MOB3B*, *TGFBR1*, *PIM1* и повышает активность *SOX2*, *KLF4*, *KLF6*, *KLF1*, *SMAD2*, *SMAD9*, *LIFR*, *LNMB2*, *ZEB1*, *BMP6*, *HIF3A*; FLI-06 подавляет экспрессию *VIM*, *DPPA4* и *FZD9*. Смесь ингибиторов угнетает экспрессию *NANOG*, *LNMB2*, *LIFR*, *MYC*, *ZIC2*, *KLF6*, *MOB3B*, *TGFBR1*, *FZD9*, *BM11*, *SMAD4*, *ITGB1*.

Заключение. Таким образом, подавление экспрессии генов стволовости предотвращает дедифференцировку нестволовых опухолевых клеток до стволовых.

ОСОБЕННОСТИ СОДЕРЖАНИЯ pAkt/TGFβR2-КЛЕТОК В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ЭСТРОГЕНПОЗИТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

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

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

²ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург
e-mail: tanyadronova@mail.ru

Ключевые слова: эстрогенпозитивный рак молочной железы, TGFβR2, pAkt, тамоксифен

Введение. Известно, что активация экспрессии Akt вызывает блокировку антипролиферативного ответа TGF-β-сигнального каскада, что, в свою очередь, может приводить к формированию устойчивости к антиэстрогенной терапии в опухолях молочной железы.

Цель исследования — изучить уровень экспрессии клеток с фенотипом pAkt/TGFβR2 в опухолевой ткани молочной железы и сопоставить их содержание с клинико-морфологическими параметрами, а также с эффективностью лечения тамоксифеном.

Материалы и методы. В настоящее исследование были включены 65 пациенток с диагнозом эстрогенпозитивного РМЖ (T1–4N0–3M0). Количество опухолевых клеток, коэкспрессирующих pAkt/TGFβR2, определено методом проточной цитофлуориметрии с помощью цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программного обеспечения Statistica 8.0.

Результаты. При оценке pAkt/TGFβR2-опухолевых клеток в зависимости от клинико-морфологических характеристик (размер опухолевого узла, наличие лимфогенного метастазирования, возраст на момент постановки диагноза) было показано, что высокий процент pAkt⁺/TGFβR2⁺-субпопуляции был характерен для пациенток, не имеющих метастазы ($p = 0,016$). Напротив, среди пациенток с наличием лимфогенного метастазирования преобладал процент pAkt⁺/TGFβR2⁺-клеток, однако результаты не достигали статистической значимости ($p = 0,094$). Значимыми маркерами эффективности проводимой терапии тамоксифеном у больных эстрогенпозитивным РМЖ являлись наличие в опухоли субпопуляций pAkt⁺/TGFβR2⁺- и pAkt⁺/TGFβR2⁻-клеток ($p = 0,001$ и $p = 0,006$ соответственно). Резистентность к гормонотерапии ассоциирована с высоким уровнем клеток, экспрессирующих pAkt в комбинации с TGFβR2 ($p = 0,006$).

Заключение. Разнородность полученных данных предполагает проведение дальнейшего исследования, которое поможет оценить вклад субпопуляции клеток, экспрессирующих pAkt/TGFβR2, в формирование эффективного ответа на тамоксифен у больных эстрогенпозитивным РМЖ.

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

ВЕЗИКУЛЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПЕРЕНОСЧИКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЭКЗОГЕННЫХ БЕЛКОВ В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ

С.С. Емельянова¹, Л.А.-А. Гараева¹, Е.Ю. Комарова²,
И.В. Гужова², Б.А. Маргулис², Т.А. Штам^{1,2}

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

²ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: emelyanova_ss@pnpi.nicki.ru

Ключевые слова: внеклеточные везикулы растительного происхождения, белок HSP70, иммунотерапия

Введение. Разработка новых противоопухолевых лекарственных средств и способов их доставки — актуальная задача современной онкологии. На сегодняшний день создан широкий «парк» терапевтических молекул — пептидов, белков и нуклеиновых кислот с высоким противоопухолевым потенциалом. Среди них и молекулярный шаперон, белок теплового шока HSP70, который при введении в опухолевый очаг способен индуцировать развитие специфического противоопухолевого иммунитета. Однако нестабильность терапевтических молекул в организме является серьезным препятствием для их использования. Важной задачей стал поиск способов эффективной доставки действующего начала к опухолевой мишени.

Внеклеточные везикулы и экзосомы — природные наночастицы, секретируемые различными клетками и способные нести белковые маркеры и генетическую информацию, участвуя таким образом в межклеточной коммуникации. Внеклеточные везикулы растительного происхождения также осуществляют межклеточные связи, кроме того, они обладают более высокой биосовместимостью и лучшей биоразлагаемостью, чем везикулы животного происхождения. Ввиду указанных свойств растительные везикулы могут стать эффективными переносчиками экзогенных биоактивных молекул в клетки человека.

Цель исследования — оценка возможности использования нагруженных экзогенным HSP70 внеклеточных везикул, полученных из сока грейпфрута (GF-EVs), для активации противоопухолевого иммунного ответа на клеточных моделях.

Материалы и методы. Клетки меланомы мыши (B16) и карциномы толстого кишечника мыши (CT26) инкубировали 18 ч с белком HSP70 или GF-EVs, нагруженными HSP70. Затем добавляли цитотоксические лимфоциты, выделенные из селезенки мыши или NKL-клетки (натуральные киллеры). Жизнеспособность опухолевых клеток оценивали в реальном времени на приборе xCELLigence.

Результаты. В обеих опухолевых культурах, предварительно обработанных белком HSP70 (свободным

или в составе GF-EVs), наблюдалось увеличение скорости гибели клеток под действием цитотоксических лимфоцитов или NKL-клеток, что указывает на активацию специфического противоопухолевого иммунного ответа. Более того, нагруженный в GF-EVs белок, концентрация которого на порядок ниже, чем свободно добавленного, действовал с равнозначной эффективностью.

Заключение. Внеклеточные везикулы грейпфрутового происхождения в системах *in vitro* эффективно доставляют к клеткам млекопитающих экзогенный HSP70 с сохранением его способности к активации противоопухолевого иммунного ответа.

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания (№ 121060200127-6).

ВЛИЯНИЕ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ CRABP2 НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЕ

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод,
Е.М. Чевкина

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: Adelbufyeni@mail.ru

Ключевые слова: ATRA, PK-резистентность, CRABP2, пролиферация, рак молочной железы

Введение. Ретиноевая кислота (РК) — внутриклеточный метаболит ретинола, который стимулирует дифференцировку и снижает пролиферацию клеток. Наиболее активный изомер РК — ATRA (All-trans retinoic acid) — применяется при терапии некоторых ЗНО. Широкое использование РК в клинической практике ограничено ввиду быстрого формирования РК-резистентности. CRABP2 — белок, связывающий РК и доставляющий ее в ядро для взаимодействия с ядерными рецепторами, приводящего к транскрипции ретиноид-респонсивных генов. CRABP2 также взаимодействует с белками, стабилизирующими мРНК-транскрипты, способствуя экспрессии проапоптотических генов. Данные о роли CRABP2 в канцерогенезе и формировании РК-резистентности немногочисленны и противоречивы.

Цель исследования — анализ роли белка CRABP2 в пролиферации и чувствительности к РК клеток РМЖ.

Материалы и методы. В работе использованы линии клеток РМЖ с высокой экспрессией CRABP2: MCF7 (гормонозависимая, РК-чувствительная линия) и MDA-MB-468 (трижды негативный подтип, РК-резистентная). Подавление эндогенной экспрессии CRABP2 проводили методом лентивирусной инфекции с использованием вектора, экспрессирующего 2 варианта

последовательностей мшРНК (shRNA, малой шпилечной РНК). Эффективность нокдауна оценивали методом иммуноблоттинга. Пролиферацию клеток анализировали методом прямого подсчета в камере Горяева. РК-резистентность оценивали тем же методом спустя 5 дней инкубации с ATRA.

Результаты. Продукция CRABP2 во всех 4 производных сублиниях (MCF7sh1CRABP2, MCF7sh2CRABP2, MDA-MB-468sh1CRABP2 и MDA-MB-468sh2CRABP2) снизилась более чем в 10 раз. Клетки MCF7shCRABP2 характеризовались значимым повышением пролиферации и снижением чувствительности к ATRA по сравнению с контрольными клетками MCF7shGFP. Нокдаун CRABP2 в клетках MDA-MB-468, наоборот, приводил к снижению пролиферации и увеличению РК-чувствительности (снижению резистентности) по сравнению с контролем. Важно отметить, что обе характеристики (пролиферация и РК-резистентность) изменялись сонаправленно в производных обеих линий.

Заключение. Нокдаун CRABP2 оказывает противоположный эффект в отношении пролиферации и РК-резистентности в зависимости от подтипа РМЖ и/или исходного уровня РК-чувствительности.

РОЛЬ ТРАНСЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА eIF4G1 В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

А.О. Жолудева¹, М.Е. Ломакина¹, А.Н. Полесская^{2,3},
А.М. Готро^{2,3}, А.Ю. Александрова¹

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

²CNRS UMR7654, Ecole Polytechnique, Париж, Франция;

³Institut Polytechnique de Paris, Париж, Франция
e-mail: annazholudeva@bk.ru

Ключевые слова: eIF4G1, клеточная подвижность, рак молочной железы

Введение. Метастазирование происходит благодаря развитию у опухолевых клеток способности к миграции. Важную роль в этом играет активация сигнального пути Ras-WAVE-Arp2/3. Было показано, что одним из эффекторов Ras может быть фактор инициации трансляции eIF4G1. Экспрессия eIF4G1 повышена во многих типах рака: РМЖ, РШМ, РПЖ и др. Было показано, что ингибирование eIF4G1 приводит к снижению экспрессии белков — маркеров ЭМП, таких как N-кадгерин и Snail1, что является косвенным подтверждением его функции как регулятора подвижности.

Цель исследования — анализ влияния экспрессии eIF4G1 на подвижность нормальных и опухолевых клеток.

Материалы и методы. Использовали несколько клеточных линий: MCF10A — условно нормальные клетки молочной железы, MCF10A RacQL — клетки с конститутивно активным Ras, SK-BR-3 и MDA-

MB-231 — высокометастатические аденокарциномы молочной железы человека. Экспрессию eIF4G1 подавляли с помощью ингибитора рокагламида (Roc-A), полученного из растений рода *Aglaia*. Миграционную активность исследовали с использованием прижизненной видеомикроскопии с последующим анализом подвижности клеток в программе ImageJ. Экспрессию eIF4G1 оценивали методом иммуноблоттинга, изменения актинового цитоскелета, межклеточных и фокальных контактов — с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания.

Результаты. MCF10A и MCF10A RacQL — эпителиальные клетки, в редкой культуре образуют маленькие островки, SK-BR-3 и MDA-MB-231 — опухолевые одиночные подвижные клетки. Под действием Roc-A скорость миграции нормальных клеток значимо снижается, межклеточные контакты разрушаются, клетки формируют ламеллиподии, наполняя друг на друга. У опухолевых клеток Roc-A также вызывает уменьшение скорости миграции, в клетках MDA-MB-231 движение становится менее направленным. При этом опухолевые клетки сильно распластаются, фокальные контакты (винкулин) становятся крупнее и их число растет, таким образом морфология клеток несколько нормализуется. Roc-A оказывает сильное токсическое действие на все клетки, деление останавливается, увеличивается количество клеток в апоптозе. При этом опухолевые клетки гораздо устойчивее нормальных к действию Roc-A.

Заключение. Ингибирование eIF4G1 вызывает морфологическую нормализацию и подавление миграции опухолевых клеток, что может быть связано с функцией eIF4G1 как эффектора Ras, так и регулятора трансляции. Высокая токсичность Roc-A по отношению к нормальным клеткам снижает его привлекательность в качестве противоопухолевого агента.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-54-16006 НЦНИЛ_а.

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ АНГИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ S100A4, SPP1, SPARC ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Е.О. Казакова¹, М.А. Ракина¹, П.С. Ямщиков¹,
Т.С. Сударских¹, Н.В. Чердынцева^{1,2}, Ю.Г. Кжышковска¹,
И.В. Ларионова^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: kazakova.e.o@mail.ru

Ключевые слова: колоректальный рак, S100A4, SPARC, SPP1, опухолеассоциированные макрофаги, ангиогенез

Введение. КРР является 2-й по значимости причиной смерти от рака в мире. Опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) — ключевые клетки врожденного

иммунитета, которые могут способствовать опухолевой прогрессии за счет регуляции ангиогенеза. ОАМ являются источником множества проангиогенных факторов, в числе которых S100A4, SPP1 и SPARC.

Цель исследования — изучить взаимосвязь экспрессии S100A4, SPP1, SPARC с прогнозом больных КРР.

Материалы и методы. Экспрессия S100A4, SPP1, SPARC была изучена на уровне мРНК и белка. Группы пациентов с РПК и раком ободочной кишки были проанализированы независимо и в комбинированной когорте КРР. Для экспрессии мРНК мы проанализировали данные секвенирования РНК, полученные из когорт TCGA и GEO пациентов с КРР ($n = 417$). Для оценки белковой экспрессии провели количественную оценку результатов ИГХ-анализа опухолевой ткани, полученной от пациентов с КРР ($n = 118$), поделенных на пациентов с раком ободочной кишки ($n = 54$) и РПК ($n = 64$).

Результаты. На уровне мРНК S100A4 является точным критерием для короткой выживаемости у пациентов с КРР, который обладает высокими чувствительностью и специфичностью независимо от типа рака. Уровень мРНК SPARC — независимый прогностический фактор выживаемости при раке ободочной кишки, но не при РПК. Уровень мРНК SPP1 имеет значительную прогностическую ценность для выживаемости при раке как прямой, так и ободочной кишки. ИГХ-анализ и конфокальная микроскопия опухолевой ткани показали, что S100A4, SPP1 и SPARC экспрессируются стромальным компонентом, в частности ОАМ, и имеют сильную корреляцию с инфильтрацией макрофагов. Интересно, что химиотерапевтическое лечение может менять прогностическую значимость S100A4 для пациентов с РПК. Мы обнаружили, что стромальная экспрессия S100A4 была выше у пациентов с лучшим ответом на НХТ/химиолучевую терапию, а мРНК экспрессия S100A4 предсказала лучшую безрецидивную выживаемость среди пациентов, не ответивших на лечение.

Заключение. Ангиогенные факторы S100A4, SPP1 и SPARC экспрессируются ОАМ и связаны с худшим прогнозом у нелеченых пациентов с КРР. Однако у леченых пациентов экспрессия S100A4 была ассоциирована с лучшим ответом на терапию и благоприятным прогнозом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-015-00384А.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РАЗЛИЧНЫХ КЛОНОВ PD-L1 ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.А. Кальфа, Е.П. Голубинская, Т.П. Макашиш,
Е.Ю. Зяблицкая, А.В. Кубышкин

*Институт «Медицинская академия им. С.И. Георгиевского»
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского», Симферополь
e-mail: rita.kalfa@mail.ru*

Ключевые слова: рак предстательной железы, морфология, иммуногистохимия, PD-L1

Введение. РПЖ — наиболее часто диагностируемое ЗНО у мужчин. Стандартным лечением локализованного РПЖ является радикальная простатэктомия, однако рецидив онкологического процесса остается значимой проблемой. Одними из прогностических маркеров рецидива неопластического процесса могут являться белок PD-1 и его лиганд PD-L1, которые играют важную роль в подавлении адаптивной иммунной системы.

Цель исследования — сравнение результатов ИГХ-оценки PD-L1-статуса РПЖ при применении 3 диагностических систем SP142, SP263 (производитель Ventana) и 73-10 (производитель Leica).

Материалы и методы. Было исследовано 30 образцов ткани, полученных при радикальных простатэктомиях по поводу РПЖ, выполненных в Клиническом медицинском многопрофильном центре Святителя Луки Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского. Работа проведена при финансовой поддержке в рамках государственного задания № FZEG-2020-0060 Минобрнауки России в сфере научной деятельности темы «Алгоритмы молекулярно-генетической диагностики ЗНО и подходы к их таргетной терапии с применением клеточных и генетических технологий».

Результаты. Определение PD-L1-статуса опухоли с использованием этих тестовых систем выявило наличие различного количества положительных случаев при использовании 3 анти-PD-L1-антител: для SP142 — 7 %, для SP263 — 7 % и для 73-10 — 10 % из 30 исследованных случаев. Различалось и количество выявляемых по наличию мембранного окрашивания клеток.

Заключение. Сложность в тестировании статуса экспрессии PD-L1 при РПЖ вызвана наличием различных диагностических реагентов, систем оценки и рекомендациями производителя. Наличие таких различных подходов обуславливает необходимость исследования конкордантности между различными диагностикумами и изучения возможности использования разных диагностических систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственного задания (№ FZEG-2020-0060).

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *OCN* И *CST2* АССОЦИИРОВАНА С ЛИМФОГЕННОЙ ДИСSEМИНАЦИЕЙ ПРИ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И.В. Катунина¹, Е.А. Пудова¹, А.А. Кобеляцкая¹,
Г.С. Краснов¹, Д.В. Калинин², К.М. Ньюшко³,
Б.Я. Алексеев³, А.В. Кудрявцева¹

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

²ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва;

³ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России
e-mail: i.katunina125@gmail.com

Ключевые слова: рак предстательной железы, экспрессия гена *OCN*, экспрессия гена *CST2*, лимфогенная диссеминация

Введение. РПЖ представляет собой одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний у мужчин во всем мире. Одним из характерных критериев агрессивности опухолевого процесса является инвазия опухолевых клеток в регионарные лимфатические узлы, идентификация которой на ранних стадиях заболевания может значительно улучшить прогноз для пациента. Кроме того, оценка метастатического потенциала опухоли может оптимизировать выбор наилучшей терапевтической концепции для пациента.

Ранее на основе RNA-Seq-анализа образцов свежемороженых тканей РПЖ выборки российских пациентов и консорциума The Cancer Genome Atlas (TCGA) нами было обнаружено, что экспрессия генов *OCN* и *CST2* статистически значимо ассоциирована с лимфогенной диссеминацией.

Цель исследования — оценка экспрессии генов *OCN* и *CST2* на образцах архивного материала независимой выборки российских пациентов с РПЖ как в первичной опухоли, так и в пораженных лимфатических узлах.

Материалы и методы. Выделение тотальной РНК из образцов было выполнено с помощью набора The High Pure FFPE RNA Isolation Kit (Roche, Швейцария). Получение кДНК было проведено с помощью набора Mint (Евроген, Россия). Оценка относительной экспрессии генов проведена методом количественной ПЦР на приборе Rotor-Gene Q (QIAGEN) в 3 технических повторностях. Ген *HPRT1* был использован в качестве контроля. Анализ полученных результатов проведен в статистической среде R с использованием метода ΔCt.

Результаты. Нами была проанализирована выборка из 14 пациентов, разделенная на группы в соответствии с информацией о наличии/отсутствии лимфогенной диссеминации (N1 и N0 соответственно). В группе N1 было отмечено повышение экспрессии гена *OCN* в 1,77 раза ($p = 0,04$) и гена *CST2* в 3,24 раза ($p = 0,002$) по сравнению с группой N0. Также обнаружено, что в образцах пораженных лимфатических узлов

в сравнении с первичной опухолью экспрессия гена *OCN* достоверно повышалась в среднем в 3,34 раза ($p = 0,02$). В случае гена *CST2* в образцах пораженных лимфатических узлов было отмечено снижение экспрессии в среднем в 3,5 раза по сравнению с образцами первичной опухоли ($p = 0,002$).

Заключение. В результате проведенного исследования на независимой выборке российских пациентов было подтверждено статистически значимое повышение экспрессии генов *OCN* и *CST2* в группе пациентов с лимфогенной диссеминацией. Кроме того, статистически значимая экспрессия этих генов также была обнаружена в образцах пораженных лимфатических узлов пациентов, что может говорить о возможной вовлеченности генов *OCN* и *CST2* в метастазирование РПЖ, а также подчеркивает их прогностический потенциал.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-75-10127).

ЭКСПРЕССИЯ микроРНК И ГЕНОВ КАК КАНДИДАТОВ В МАРКЕРЫ ПРОГНОЗА МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ РАКА ЖЕЛУДКА

Ф.М. Кипкеева¹, Т.А. Музаффарова¹, М.П. Никулин²,
Д.Ж. Мансорунов¹, П.В. Апанович¹, О.А. Малихова²,
А.В. Карпухин¹

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

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва
e-mail: forty_k@mail.ru

Ключевые слова: микроРНК, гены, экспрессия, рак желудка, метастазирование, маркеры

Введение. РЖ — одна из существенных причин смертности от онкологических заболеваний. Неблагоприятный прогноз при РЖ в значительной мере связан с метастазированием опухоли. Одной из причин, способствующих развитию метастазов, считается ангиогенез. В качестве доказательства, связывающего ангиогенез с развитием метастазов, приводится тот факт, что плотность микрососудов опухоли коррелирует с ее метастатическим потенциалом и неблагоприятным прогнозом почти при всех типах рака. Среди исследуемых в этом контексте генов рассматриваются ангиогенные факторы VEGFR1/2, NR1, FGFR2. Кроме того, эти факторы принимают участие в регуляции ЭМП. Наряду с генами активно исследуется роль микроРНК в биохимических путях развития опухоли, а также их значение в процессах метастазирования.

Цель исследования — изучение генов и микроРНК, экспрессия которых может являться источником биомаркеров, сигнализирующих о повышенном риске метастазирования опухоли.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы 28 больных с отдаленными метастазами и 25 пациентов с РЖ без отдаленных метастазов.

Определение экспрессии генов и микроРНК проводили методом ПЦР в реальном времени. Были изучены различные комбинации микроРНК и генов. Повышенный или пониженный уровень экспрессии генов и микроРНК определялся порогом, полученным при ROC-анализе. Уровень значимости для выявленных различий принимали равным $<0,05$.

Результаты. На ассоциацию с метастазированием РЖ была исследована экспрессия 9 генов — объектов таргетной терапии и 4 микроРНК при диссеминированном РЖ в сравнении с не метастазирующими опухолями РЖ. Наилучшие результаты связи экспрессии с метастазированием РЖ продемонстрировали miR-34a и miR-335 и гены *FGFR2*, *VEGFR1* и *NRP1*. Наиболее высокие значения отношения шансов (ОШ) имели miR-34a, miR-335 и гены *VEGFR1* и *NRP1* (ОШ 14, 29, 10 и 14 соответственно).

Сформированы панели, включающие гены и микроРНК — кандидаты в маркеры прогноза. В качестве наиболее эффективной выбрана панель, включающая miR-335/*VEGFR1*/*FGFR2*, которая демонстрирует наилучшие показатели как кандидат в панель прогноза метастазирования, особенно значения ОШ 143 и ОР 7,1.

Заключение. Проведенный сравнительный анализ панелей позволил охарактеризовать в качестве наиболее эффективной панель, включающую miR-335/*VEGFR1*/*FGFR2*. Если 2 из 3 составляющих ее элементов имеют уровень экспрессии выше (для *VEGFR1*) или ниже (для miR-335 и *FGFR2*) порогового значения, то риск метастазирования РЖ высокий и прогноз неблагоприятный.

КОАКТИВАТОР СТЕРОИДНОГО РЕЦЕПТОРА ТИПОВ 1 И 3: АССОЦИАЦИЯ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И.В. Ковалева¹, Л.В. Спирина¹, Е.Е. Симонова²,
С.Ю. Чижевская¹

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

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск
e-mail: irina.kovalyova.kovaleva@mail.ru

Ключевые слова: папиллярный рак щитовидной железы, коактиватор стероидного рецептора

Введение. Папиллярный рак щитовидной железы (РЩЖ) — наиболее распространенное эндокринное ЗНО, имеющее стремительный темп роста выявляемости. Накоплено небольшое количество данных о механизмах прогрессирования папиллярного РЩЖ, однако полагают, что в процесс в значительной степени вовлечены нарушения регуляции внутриклеточных сигнальных каскадов. Данные ранних исследований указывают на значимость коактиватора стероидного

рецептора типов 1 и 3 (SRC-1 и SRC-3) в развитии и прогрессировании гормонозависимых опухолей, тем не менее, до сих пор не изучена их роль в патогенезе папиллярного РЩЖ в ассоциации с клинико-морфологическими параметрами.

Цель исследования — изучить экспрессию и содержание белков SRC-1 и SRC-3 в ткани папиллярного РЩЖ в зависимости от клинико-морфологических параметров опухоли.

Материалы и методы. В исследование были включены 82 пациента с диагнозом папиллярного РЩЖ, получавших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ. Материалом исследования явились образцы опухолевой и неизменной ткани, полученные при проведении оперативного лечения. На первом этапе из тканей выделяли РНК, кДНК на матрице РНК была получена реакцией обратной транскрипции. Экспрессия исследуемых факторов определена количественной ПЦР в режиме реального времени. Содержание белков SRC-1, SRC-3 было определено методом вестерн-блоттинга.

Результаты. Отмечена высокая экспрессия SRC-1 в ткани папиллярного РЩЖ по сравнению с аденомой щитовидной железы (увеличение в 3,4 раза; $p < 0,05$), что также подтверждается увеличением содержания белка в опухолевой ткани. Выявлено различие молекулярного портрета опухоли при разных гистологических типах папиллярного РЩЖ: фолликулярному типу, имеющему агрессивное течение заболевания, присуща пониженная экспрессия SRC-1 (снижение в 2,5 раза по сравнению с классическим; $p < 0,05$). Наличие мутации BRAFV600e также является одним из маркеров неблагоприятного течения заболевания: выявлено увеличение экспрессии SRC-1 при данной мутации. Содержание белка и мРНК SRC-1 повышается в группе высокого риска развития рецидива папиллярного РЩЖ по шкале Американской тиреоидологической ассоциации. Экспрессия и содержание SRC-3 в сравниваемых группах изменяются противоположно изменениям SRC-1. Содержание мРНК и белкового продукта SRC-3 практически неизменно в ткани опухоли по сравнению с аденомой, однако повышено в 2,0 раза в ткани без признаков распространения в лимфатические узлы и инвазии в капсулу щитовидной железы, что свидетельствует о его возможном использовании в качестве дополнительного маркера благоприятного течения заболевания.

Заключение. Выявлены особенности экспрессии и присутствия белкового продукта SRC-1, SRC-3 в ткани папиллярного РЩЖ. Эти факты свидетельствуют об их участии в процессах опухолевой прогрессии при папиллярном РЩЖ, что, несомненно, требует дальнейшего изучения.

ACTN4 ВОВЛЕЧЕН В РЕГУЛЯЦИЮ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В КЛЕТКАХ H1299

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

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: daryamalikova@gmail.com

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, ACTN4, химиотерапия, репарация, апоптоз

Введение. ACTN4 (α -актинин-4) — актинсвязывающий белок, обнаруженный во всех нормальных тканях организма человека, а также в раковых опухолях, однако уровень экспрессии может варьировать. ACTN4 вовлечен в широкий спектр клеточных процессов (подвижность клеток, регуляцию клеточного цикла и ЭМП, регуляцию экспрессии генов) посредством взаимодействия с рядом транскрипционных факторов или с белками, вовлеченными в организацию структур хроматина. Более трех десятков работ указывают на роль ACTN4 в регуляции туморогенеза и метастазировании ЗНО. Было показано, что для пациентов с РЛ и высоким уровнем экспрессии ACTN4 в опухоли на уровне как мРНК, так и белка увеличивается общая продолжительность жизни в случае применения адъювантной ДНК-повреждающей терапии. В ходе наших исследований мы обнаружили, что ACTN4 вовлечен в регуляцию репарации двухцепочечных разрывов ДНК, вызванных ингибиторами топоизомеразы II. Подавление экспрессии ACTN4 в клетках РЛ H1299 приводило к увеличению устойчивости к действию этопозиды.

Цель исследования — проверить влияние экспрессии ACTN4 на активацию апоптоза в клетках H1299.

Материалы и методы. В исследовании мы использовали клеточную линию H1299 с нокаутом (КО) и сверхэкспрессией (ОЕ) гена *ACTN4*. Для оценки апоптоза окрашивали клетки аннексином V и пропидий йодидом. Анализ экспрессии генов осуществляли с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Устойчивость клеток к действию этопозиды проверяли с помощью МТТ-теста.

Результаты. Было обнаружено, что клетки линии H1299, в которых отсутствует экспрессия *ACTN4*, имеют более низкий уровень апоптоза. Мы проверили экспрессию генов *PUMA* и *BCL2* (ключевых регуляторов индукции апоптоза) и обнаружили снижение экспрессии *PUMA* и активацию *BCL2*. Напротив, в клетках H1299 ОЕ происходит активация гена *PUMA*, а устойчивость таких клеток к действию этопозиды падает.

Закключение. Мы полагаем, что ACTN4 вовлечен в регуляцию ответа клетки на повреждения ДНК. Он играет ключевую роль в выживаемости клеток на поздних стадиях туморогенеза в результате регуляции экспрессии генов, определяющих запрограммированную клеточную гибель.

РАЗРАБОТКА ПРОТОТИПА ПРОТИВОМЕТАСТАТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Н.В. Литвяков¹, А.Г. Першина², М.К. Ибрагимова¹,
К.В. Невская², Д.С. Долгашева¹, И.А. Цыденова²,
К.А. Гаптулбарова¹, Е.А. Здерова¹, М.М. Цыганов¹,
Е.В. Сухинина²

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

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск
e-mail: nvlitv72@yandex.ru

Ключевые слова: дедифференцировка, опухолевые стволовые клетки, гены стволовости, микрометастазы

Введение. Практически у всех онкологических больных при постановке диагноза во вторичных органах уже есть множественные микрометастазы. Был проведен широкий спектр исследований, доказывающих, что эктопическая экспрессия генов стволовости (за счет амплификаций, гипометилирования и других механизмов) определяет способность опухолевых клеток микрометастазов к дедифференцировке до ОСК, которые могут дать начало макрометастазам, определяя тем самым, будет опухоль метастазировать или нет. Это делает гены стволовости перспективными мишенями для разработки противометастатических препаратов.

Цель исследования — разработка прототипа противометастатического препарата, блокирующего процесс дедифференцировки.

Материалы и методы. По данным KMPlotter изучена прогностическая значимость экспрессии генов стволовости для опухолей основных локализаций. На клеточных линиях BT474, BT549, MDA-MB-231, MDA-MD-468, MCF7, SK-BR-3 и T47D были проведены исследования способности отобранных на сортере дифференцированных клеток к дедифференцировке в зависимости от их CNA-ландшафта. Химические ингибиторы BIBR1532, 10058-F4, FLI-06 генов *TERT*, *MYC*, *NOTCH1* были использованы при оценке значения генов стволовости для дедифференцировки. Была получена генетически модифицированная клеточная линия BT549 с гиперэкспрессией гена *MYC*, проведено исследование транскриптома этой линии и способности к дедифференцировке. По результатам биоинформатического анализа и последующего скрининга были отобраны 3 микроРНК, таргетированные к генам стволовости. Комплекс этих микроРНК был изучен на способность ингибировать гены стволовости и предотвращать процесс дедифференцировки клеточных линий.

Результаты. По данным KMPlotter, экспрессия комплекса генов стволовости показала значимость в отношении безметастатической выживаемости 16 локализаций. Показана связь способности дифференцированных клеток клеточных линий к дедифференцировке (по частоте образования маммосфер) с количеством амплификаций генов стволовости в них. Наименьшую частоту

показала клеточная линия BT549 (1 амплификация), наибольшую частоту — линия T47D (9 амплификаций). После CRISPER/Cas9 SAM-активации экспрессии гена *MYC* клеточная линия BT549 резко увеличила частоту образования маммосфер. Клетки T47D под действием ингибиторов генов стволовости полностью утрачивали способность к дедифференцировке и образованию маммосфер. Комплекс 3 отобранных микроРНК-мимиков при воздействии на клетки T47D и клетки линии BT474 показал полное ингибирование процесса дедифференцировки, ингибирование 16 генов стволовости, всех маркеров ОСК, канцерогенных путей и 31 онкогена.

Заключение. Разработан прототип противометастатического препарата на основе микроРНК, ингибирующего процесс дедифференцировки опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 075-15-2021-1073) и РНФ (грант № 20-15-00243).

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИММУННЫХ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК ПРИ МЕТАСТАЗИРОВАНИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ РАКА ЖЕЛУДКА

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

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

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва
e-mail: gah3ah@mail.ru

Ключевые слова: иммунные контрольные точки, экспрессия, рак желудка

Введение. РЖ — одно из самых распространенных ЗНО. Одним из перспективных нововведений в терапии РЖ являются ингибиторы иммунной контрольной точки (ИКТ) PD-1/PD-L1. Они показали эффективность лечения, но доля отвечающих на лечение пациентов невысока. Повысить эффективность терапии может позволить ингибирование более широкого круга ИКТ, что требует их изучения. Исследование экспрессии генов ИКТ может привести к выявлению новых биомаркеров.

Цель исследования — изучение профилей экспрессии генов ИКТ *ADAM17*, *PVR*, *CD274*, *CD276*, *CEACAM1*, *IDO1*, *TDO2*, *LGALS3*, *LGALS9* и *HHLA2* в связи с развитием РЖ.

Материалы и методы. Исследована 101 пара образцов ткани слизистой оболочки желудка (опухолевая ткань и морфологически нормальная ткань): РЖ без метастазов ($n = 70$) и РЖ с метастазами ($n = 31$). Средний возраст пациентов — 62 года. Образцы опухоли преимущественно представлены аденокарциномой. Измерение уровня экспрессии мРНК генов проводили методом ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. Изучены профили экспрессии генов *ADAM17*, *PVR*, *CD274*, *CD276*, *CEACAM1*, *IDO1*, *TDO2*, *LGALS3*, *LGALS9* и *HHLA2*. При статистической обработке данных с использованием ROC-анализа выявили, что экспрессия генов *TDO2* и *LGALS3* связана с отдаленным метастазированием ($p = 0,024$ и $p = 0,031$ соответственно). Ассоциация уровня экспрессии данных генов с метастазированием проверена с помощью точного критерия Фишера ($p < 0,001$ и $p = 0,007$ соответственно). При метастатическом РЖ чаще наблюдается повышенная (относительно неметастатического РЖ) экспрессия гена *TDO2*, а экспрессия гена *LGALS3*, наоборот, снижается. По данным ROC-анализа экспрессия генов *IDO1* и *LGALS9* связана со степенью дифференцировки опухоли ($p = 0,025$ и $p = 0,024$ соответственно). При низкой степени дифференцировки опухоли уровень экспрессии повышается (относительно высоко/умеренно-дифференцированных опухолей). В свою очередь, по данным ROC-анализа с типом по Lauren связана экспрессия генов *CD274* и *LGALS9* ($p = 0,039$ и $p < 0,0001$ соответственно). При диффузном типе наблюдается повышенный уровень экспрессии этих генов (относительно интестинального типа). По результатам анализа независимым признаком является тип по Lauren, а связь экспрессии гена *LGALS9* со степенью дифференцировки вторична.

Заключение. Найдена ассоциация экспрессии ряда ИКТ с клинико-патологическими характеристиками РЖ, такими как отдаленное метастазирование, степень дифференцировки опухоли и тип по Lauren. При РЖ с отдаленным метастазированием экспрессия гена *TDO2* повышается, что может указывать на потенциально повышенную эффективность ингибирования *TDO2* при метастатическом РЖ. Полученные данные имеют значение для развития прогностических маркеров и способов терапии РЖ в дальнейшем.

КАК МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОМПЛЕКСЫ БЕЛКОВ-АЛАРМИНОВ РЕГУЛИРУЮТ ОПУХОЛЕВЫЙ РЕЦИДИВ

Б.А. Маргулис, Д.В. Сверчинский, М.А. Микеладзе, Б. Алхасан, И.В. Гужова

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: margulis@incras.ru

Ключевые слова: опухолевый рецидив, белки-алармины, HSP70, HMGB1

Введение. Процесс опухолевого рецидива обычно развивается за счет крайне малых популяций раковых клеток, оставшихся после действия терапевтического фактора. Существует гипотеза о том, что новый рост указанной клеточной популяции — репопуляция — может вызываться материалом погибших от эффекта терапии клеток, а на молекулярном уровне индуцироваться так называемыми аларминами, полипептидами класса DAMP (damage-associated molecular patterns,

ассоциированные с повреждением молекулярные паттерны). В число таких молекул, в частности, входят шаперон HSP70 и ядерный белок HMGB1, которые обнаруживаются во внеклеточной среде после противоопухолевой терапии.

Цель исследования — определение роли обоих полипептидов в опухолевом рецидиве и в поиске межмолекулярных комплексов, способных влиять на развитие рецидивных явлений.

Материалы и методы. Для поиска активных компонентов межклеточной среды мы создали модель репопуляции, анализ белков которой проводили с использованием методов иммунопреципитации, иммуноблоттинга, а также совершенно новой разработки — системы для оценки межбелковых взаимодействий. Анализ маркеров пролиферации проводили с помощью количественной ПЦР, иммуноблоттинга и специальных наборов ИФА.

Результаты. Данные опытов, проведенных в клеточной модели репопуляции, показали, что для новой волны пролиферации необходим комплекс белков HSP70 и HMGB1. Этот комплекс образуется в клетках, подвергнутых действию терапевтического фактора, и затем выходит в межклеточное пространство. При этом в клетках-мишенях повышается активность белков, связанных с пролиферацией, и уровень простагландина E. Существование комплекса HSP70 и HMGB1 было подтверждено двумя независимыми способами, и его диссоциация с помощью ингибиторов HSP70, соединений JG-98 и PES приводила к подавлению репопуляции в клеточной модели и животной модели метастазирования.

Закключение. Результаты работы показывают, что шаперон HSP70 повышает проопухолевую активность HMGB1, а соединения, разделяющие комплекс этих белков, могут стать факторами терапии форм рака с повышенным риском рецидива.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 075-15-2020-773).

БЕЛОК БЕТА-III ТУБУЛИН В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ОПУХОЛИ

М.А. Маяк, А.А. Башарина, Н.С. Сапрыкина,
Т.И. Мохненко, М.В. Пиногина, Н.О. Вихлянцева,
Т.А. Богуш

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: rita.mayak@yandex.ru

Ключевые слова: проточная цитометрия, TUBB3, метастатический потенциал опухоли

Введение. Опухолеассоциированный белок бета-III тубулин (TUBB3) является важнейшей молекулярной составляющей метастатического потенциала опухолевых клеток. Однако данные клинических исследований

прогностической значимости TUBB3 противоречивы, что делает необходимой прямую оценку вклада TUBB3 в формирование метастатического потенциала опухоли в опытах *in vivo*.

Цель исследования — сравнительная оценка экспрессии TUBB3 в первичной и метастатической опухоли на модели 2 штаммов РЛ с различной метастатической активностью.

Материалы и методы. Исследование проведено на мышах линий C57BL/6 и BDF-1 после подкожной трансплантации РЛ Льюис и РЛ-67 — штаммы с высокой и низкой метастатической активностью соответственно.

Иммунофлуоресцентная оценка экспрессии TUBB3 проведена на 24-е сутки после трансплантации методом проточной цитометрии. Исследованы показатели экспрессии TUBB3: уровень — доля клеток, экспрессирующих маркер (%); интенсивность — экспрессия маркера в пересчете на клетку (усл. ед.); интегральный индекс — произведение двух показателей (усл. ед.).

В анализ включены 4 группы сравнения: РЛ Льюис и РЛ-67 — первичный опухолевый узел в месте трансплантации vs метастазы в легких; первичная опухоль — РЛ Льюис vs РЛ-67; метастазы в легких — РЛ Льюис vs РЛ-67.

Результаты

1. Показатели экспрессии TUBB3 в ткани первичной опухоли и метастазов для исследованных штаммов РЛ оказались идентичными. В ткани первичного РЛ Льюис vs метастазы уровень экспрессии белка составил $37,0 \pm 8,1$ % vs $40,0 \pm 1,2$ %, интенсивность — $69,5 \pm 5,8$ vs $67,0 \pm 20,8$ усл. ед., интегральный индекс — $26,1 \pm 7,8$ vs $27,0 \pm 9,1$ усл. ед. Для РЛ-67 аналогичные показатели экспрессии составили: уровень — $21,0 \pm 4,2$ % vs $23,0 \pm 4,5$ %, интенсивность — $18,2 \pm 5,6$ vs $27 \pm 6,5$ усл. ед., индекс — $4,1 \pm 2,4$ vs $6,4 \pm 2,3$ усл. ед.

2. Экспрессия TUBB3 в ткани РЛ Льюис оказалась выше, чем в ткани РЛ-67 ($p < 0,05$), по всем исследованным показателям для ткани как первичного узла, так и метастазов. В ткани первичного узла РЛ Льюис показатели уровня и интенсивности экспрессии TUBB3 превысили соответствующие значения для РЛ-67 в 1,8; 3,8 и 6,4 раза. В ткани метастазов РЛ Льюис эти показатели экспрессии маркера превысили соответствующие значения для ткани первичного РЛ-67 в 1,7; 2,5 и 4,2 раза.

Закключение. Повышенная экспрессия TUBB3 в ткани РЛ Льюис с высокой метастатической активностью по сравнению с менее метастатически активной опухолью РЛ-67 является экспериментальным доказательством вклада опухолеассоциированного белка TUBB3 в формирование метастатического потенциала опухоли.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (соглашение о субсидии № 075-15-2021-1060 от 28.09.2021) и в рамках НИР № АААА-А20-120020690077-0.

РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА МИКРООКРУЖЕНИЯ ПРИ ИНВАЗИВНОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.В. Мнихович¹, Л.М. Ерофеева¹, Т.В. Безуглова¹,
И.А. Ширипенко², О.А. Сидорова², М.В. Лозина²,
С.В. Снегур³, Ю.Г. Павлова³, С. Омар⁴

¹ФГБНУ «НИИ морфологии человека
им. акад. А.П. Авцына», Москва;

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

³ГБУ РО «Областная клиническая больница», Рязань;

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
Москва

e-mail: mnichmaxim@yandex.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, опухолевое микроокружение, морфометрия

Введение. В строме опухоли формирование иммунного ответа на развивающуюся опухоль зависит от клеточного микроокружения. Новые возможности в иммунотерапии диктуют необходимость определения количества лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), при РМЖ, что особенно актуально при поздних стадиях заболевания.

Цель исследования — оценить степень выраженности и состав лимфоидной инфильтрации опухоли для потенциального изучения их роли в качестве прогностического фактора течения РМЖ.

Материалы и методы. Взят материал от 18 больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа G2–G3 с люминальным иммунофенотипом В (LUMB) с высокой степенью пролиферативной активности опухолевых клеток, определяемой по маркеру Ki-67 (40 %). Посредством морфометрии исследованы интратуморальные клеточные популяции, составляющие микроокружение опухолевых клеток.

Из парафиновых блоков получены срезы толщиной 4–5 мкм и окрашены рутинно (гематоксилином и эозином). Для морфометрической оценки использовали программу ImageJ 1.5. Непараметрический критерий Манна–Уитни применяли для анализа статистических данных. Проводили оценку TIL в строме опухоли с учетом площади, занимаемой мононуклеарами, относительно общей площади стромального компонента опухоли (%). Оценивали присутствие всех мононуклеарных клеток.

Результаты. В опухолевой строме обнаружены плотные клеточные инфильтраты, валикообразно расположенные вокруг клеток опухоли, лейкоцитарный инфильтрат распространен диффузно, обращают на себя внимание лимфоидные узелки, отмечается фиброз междольковой соединительной ткани. Состав интратуморального клеточного инфильтрата состоит из TIL более чем на 60 % (преимущественно CD20⁺- и CD4⁺-лимфоциты), присутствуют единичные бластные клетки и большие лимфоциты, изредка встречаются гис-

тиоциты, в большом количестве видны плазмоциты, клеток в процессе митоза не выявлено. Видимой деструкции подверглось не более 5 % клеток. Строма количественно состоит из клеток фибробластического ряда (25 %), на ретикулярные клетки приходится менее 2 %. При этом для междольковой соединительной ткани характерно представительство клеток фибробластического ряда, равное 50 %, и присутствие малых лимфоцитов (в основном CD8⁺) и плазмоцитов в количестве 50 %. Деструкция высоко распространена в светлом центре лимфоидных узелков при выраженной макрофагальной реакции. Перикапиллярно в жировой ткани обнаруживаются плазматические клетки (25 %), малые лимфоциты (<20 %). Вокруг лимфокапилляра преобладают лимфоциты (>60 %), количество плазматических клеток невелико (2 %).

Заключение. Опухоли молочной железы с высокой пролиферативной активностью опухолевых клеток характеризуются выраженной степенью инфильтрации иммунокомпетентными клетками и макрофагами с образованием узелков и узелковоподобных структур. Таким образом, степень выраженности и состав лимфоидной инфильтрации опухоли могут являться прогностическим фактором течения РМЖ и определять тактику подбора индивидуализированного, в частности иммунотерапевтического, лечения.

РОЛЬ УРОВНЯ ИЛ-8 И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИЛ-8 (845T/C) В РАЗВИТИИ РАКА ПОЧКИ

И.Р. Мягдиева¹, Д.Р. Долгова¹, Т.В. Абакумова¹,
О.Ю. Горшков², Т.П. Генинг¹

¹ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
университет», Ульяновск;

²ГУЗ «Областной клинический онкологический
диспансер», Ульяновск

e-mail: ilseya2015@yandex.ru

Ключевые слова: ИЛ-8, ИЛ-8 (845T/C), рак почки, нейтрофилы

Введение. ИЛ-8 — хемотаксический фактор нейтрофилов, являющихся ключевыми эффекторными клетками врожденного иммунитета и играющих решающую роль при воспалении. ИЛ-8 регулирует патологический ангиогенез, рост опухоли и метастазирование и усиливает проопухолевое действие нейтрофилов (Matsushima, Kocji et al., 2022). Известно, что повышение уровня сывороточного ИЛ-8 у пациентов с раком почки (РП) может быть связано с худшим исходом и более низкой общей выживаемостью (M. Gonzalez-Aparicio, 2020). В проведенных ранее исследованиях доказано, что однонуклеотидный полиморфизм (SNP) ИЛ-8 845T/C ассоциирован с возникновением ЗНО и аллель С повышает экспрессию ИЛ-8 (Т. Abakumova, 2022; J. G. de Oliveira, 2015).

Цель исследования — оценить роль полиморфизма гена ИЛ-8 (845T/C) и уровень ИЛ-8 в сыворотке при канцерогенезе почки.

Материалы и методы. В исследование были включены пациенты с РП светлоклеточного типа с I ($n = 30$), II ($n = 15$) и III ($n = 15$) стадией заболевания (медиана возраста — 60 лет) и 20 здоровых доноров (группа сравнения) (медиана возраста — 57 лет). Уровень ИЛ-8 в сыворотке определяли методом ИФА (Вектор-Бест, Россия). Для выявления SNP *IL-8 845T/C* (rs2227532) образцы ДНК пациентов с РП и группы сравнения изучали с помощью анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов после ПЦР с использованием эндонуклеазы *Vsp I* (СибЭнзим, Россия). Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 13, использовали U-критерий Манна–Уитни ($p < 0,05$).

Результаты. Нами обнаружено, что частота встречаемости аллеля *C* гена *IL-8 SNP 845T/C* выше у пациентов группы РП (72 %), чем в группе сравнения (10 %) ($p = 0,001$). Были установлены статистически значимые различия сывороточного уровня ИЛ-8 в исследуемых группах: I стадия — 94 пг/мл (Q_1 – Q_3 : 38–377 пг/мл), II стадия — 409 пг/мл (Q_1 – Q_3 : 29–422 пг/мл), III стадия — 96 (Q_1 – Q_3 : 63–244 пг/мл), группа сравнения — 11 пг/мл (Q_1 – Q_3 : 10–14 пг/мл) ($p = 0,001$). Нами обнаружена ассоциация аллеля *C* *IL-8 SNP 845T/C* с высоким уровнем ИЛ-8 у пациентов с РП ($p = 0,0015$), что подтверждает функциональную роль данного полиморфизма в усилении транскрипции гена и модулировании провоспалительного фенотипа нейтрофилов.

Заключение. Наличие аллеля *C* полиморфизма *IL-8 845T/C* ассоциировано с повышенным риском возникновения РП. Выявленная связь аллеля *C* *IL-8 SNP 845T/C* с высоким сывороточным уровнем ИЛ-8 у пациентов с РП может говорить о влиянии этого генетического фактора на регуляцию проонкогенного фенотипа нейтрофилов при данной патологии.

РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ОНКОСУПРЕССОРА p53 В ПРОЦЕССЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С.Е. Парфеньев, А.А. Дакс, О.А. Федорова, О.Ю. Шувалов, Е.М. Тульчинский, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: gen21eration@gmail.com

Ключевые слова: эпителиально-мезенхимальный переход, ZEB1, p53, метастазирование

Введение. Одной из главных причин смертности от рака во всем мире является метастазирование, основным механизмом которого служит ЭМП. При ЭМП происходят потеря межклеточных контактов и приобретение клетками способности к миграции и инвазии. ZEB1 считается одним из ключевых транскрипционных факторов, ответственных за инициацию ЭМП. Как

было показано, ZEB1 способен воздействовать на ряд генов-мишеней, ответственных за регуляцию клеточного цикла и апоптоз.

Цель исследования — изучить механизм воздействия ZEB1 на онкосупрессор p53, а также определить влияние ZEB1 на устойчивость клеток линии РМЖ MCF7 к генотоксическим препаратам.

Материалы и методы. В данной работе мы использовали клеточную модель ЭМП, представляющую собой модификацию линии клеток MCF7 с доксициклинзависимой индукцией экспрессии ZEB1 — MCF7ZEB1-tet-on. Применяли следующие методы: тест на выживаемость (МТТ-тест), измерение скорости пролиферации (с помощью xCELLigence RTCA DP), проточную цитофлуориметрию, вестерн-блоттинг, ChIP, ПЦР в реальном времени.

Результаты. Нами было продемонстрировано, что при активации ZEB1 в клетках линии MCF7 — MCF7ZEB1-tet-on — происходит активация процесса ЭМП, что сопровождается усилением миграции, снижением скорости пролиферации клеток, приобретением ими мезенхимальной морфологии, а также утратой эпителиальных и приобретением мезенхимальных маркеров.

Также было показано, что ZEB1 подавляет основной онкосупрессор p53 на уровне транскрипции, взаимодействуя с регуляторной областью гена *TP53*, кодирующего белок p53.

При активации ZEB1 клетки MCF7ZEB1-tet-on становятся менее чувствительными к генотоксическим препаратам: доксорубину, этопозиду и цисплатину. Помимо этого, ZEB1 приводит к усилению репарации поврежденной ДНК по механизму негомологичного соединения концов (NHEJ), что способствует приобретению клетками РМЖ устойчивости к химиопрепаратам.

Заключение. Мы выявили новый механизм негативной регуляции важнейшего онкосупрессора человека p53 транскрипционным фактором ZEB1. Кроме того, продемонстрировали, что ZEB1-индуцированный запуск ЭМП в клетках РМЖ способствует приобретению резистентности к генотоксическим препаратам.

УЧАСТИЕ ФОСФАТАЗ ДВОЙНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ DUSP В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ПОЛЯРИЗАЦИИ МОНОЦИТОВ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.Р. Патышева¹, Е.А. Простакишина¹, П.С. Ямщиков², О.Д. Брагина¹, Н.В. Чердынцева¹, Ю.Г. Кжышковска²

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;
²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск
e-mail: patysheva_mr@onco.nimc.ru

Ключевые слова: моноциты, фосфатазы двойной специфичности, рак молочной железы, транскриптом, метилирование, бисульфитное секвенирование

Введение. Моноциты периферической крови являются значимыми участниками патогенеза ЗНО. При этом митоген-активированные киназы в комплексе с фосфатазами двойной специфичности семейства DUSP занимают центральную роль в регуляции функциональной активности моноцитов.

Цель исследования — изучить экспрессию спектра генов фосфатаз двойной специфичности DUSP в моноцитах больных РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены 25 пациенток с РМЖ и 25 здоровых женщин. Из периферической крови с помощью проточной цитометрической сортировки либо позитивной магнитной сепарации были получены CD14⁺-моноциты с последующим выделением тотальной РНК либо ДНК соответственно. Полученная РНК была использована для полнотранскриптомного профилирования моноцитов с помощью метода массового параллельного секвенирования. ДНК была подвергнута бисульфитной конверсии, после чего с помощью таргетного бисульфитного секвенирования была проведена оценка уровня метилирования промоторов генов DUSP.

Результаты. Анализ транскриптома выявил, что в моноцитах как больных РМЖ, так и здоровых женщин экспрессируются гены фосфатаз двойной специфичности семейства DUSP. Уровень дифференциальной экспрессии в группе РМЖ был статистически достоверно выше для *DUSP1* (L2FC = 0,85; $p = 1,417361e-05$), *DUSP22* (L2FC = 0,86; $p = 0,00019$), *DUSP6* (L2FC = 0,93; $p = 0,00033$), *DUSP4* (L2FC = 0,85; $p = 0,00037$) и *DUSP10* (L2FC = 0,85; $p = 0,0122$), в то время как экспрессия *DUSP2* (L2FC = 1,1; $p = 0,15442$), *DUSP18* (L2FC = 0,4; $p = 0,1736$), *DUSP3* (L2FC = 0,097; $p = 0,43570$), *DUSP7* (L2FC = 0,064; $p = 0,797$) и *DUSP11* (L2FC = -0,029; $p = 0,93$) была одинакова в обеих группах исследования. Для 3 генов с наиболее выраженной дифференциальной экспрессией были определены регионы метилирования CpG-сайтов, а именно: для *DUSP1* — область на хромосоме 5 с позиции 172772098 по 172772515, для *DUSP6* — на хромосоме 12 с позиции 89353290 по 89353904 и для *DUSP22* — на хромосоме 6 с позиции 291859 по 292964. Оценка профиля метилирования с помощью смешанной линейной модели, при которой было проведено сравнение CpG-сайтов по отдельности, выявила, что для моноцитов больных РМЖ наблюдается сниженный уровень метилирования в зоне промоторов генов *DUSP1* и *DUSP6* (L2FC = -0,897; $p = 0,07582$ и L2FC = -0,17; $p = 0,00068$ соответственно), но не *DUSP22* (L2FC = -0,87; $p = 0,74$). Сравнение профиля метилирования CpG-сайтов выявило различия 3 регионов промоторов *DUSP1* и 12 регионов промоторов генов *DUSP6* с уровнем дифференциальной экспрессии (FDR < 0,05).

Заключение. Фосфатазы двойной специфичности DUSP вовлекаются в регуляцию функционального профиля моноцитов больных РМЖ. При этом у больных РМЖ гипометилирование промоторов гена *DUSP6*,

возможно, ассоциировано с гиперэкспрессией транскриптов в циркулирующих моноцитах, что требует дальнейшего исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-25-00435).

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ КАК ФАКТОР УХОДА ОПУХОЛИ ИЗ-ПОД ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА

П.А. Подлесная, О.В. Ковалева, А.Н. Грачев

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

Минздрава России, Москва

e-mail: polina.pod@yandex.ru

Ключевые слова: опухоль, макрофаг, иммунный ответ, цитотоксичность, резистентность

Введение. Применение иммунотерапии произвело революцию в лечении онкологических заболеваний. Данные препараты стимулируют противоопухолевый иммунный ответ, задействующий клетки микроокружения опухоли. Макрофаги составляют большую часть воспалительного инфильтрата опухоли, поэтому данные клетки стали перспективной мишенью для создания иммунотерапевтических препаратов, направленных в том числе на стимуляцию их провоспалительной активности. Однако ни одна из стратегий изменения фенотипа макрофагов опухолевой стромы не вошла в клиническую практику. Мы предположили, что причинами неудач стали приобретение устойчивости опухолевых клеток к цитотоксическому действию макрофагов и формирование клонов более злокачественных опухолевых клеток, что способствует прогрессированию заболевания.

Цель исследования — изучение механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток к цитотоксической активности макрофагов.

Материалы и методы. Клетки ТНР-1, дифференцированные РМА и стимулированные интерфероном γ (ИФН- γ), LPS или MDP, сокультивировали с клетками РПЖ (PC3, Du145). Цитотоксическую активность полученных макрофагов оценивали по уровню продукции провоспалительных цитокинов методом ИФА. Устойчивость опухолевых клеток определяли путем оценки их жизнеспособности в условиях цитотоксической активности макрофагов. Функциональный анализ полученных устойчивых клеток включал оценку динамики роста, миграционной и инвазивной активности, а также клоногенности. Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили методом RNA-Seq. Анализ экспрессии и фосфорилирования белков проводили методом вестерн-блоттинга. Оценка злокачественного потенциала полученных сублиний проводили *in vivo*.

Результаты. Получены опухолевые клетки, устойчивые к цитотоксической активности макрофагов. Данные клетки обладают повышенным злокачественным потенциалом, что выражается в высокой скорости

пролиферации, увеличении миграционной способности, формировании большего числа колоний большего размера, повышенной скорости роста подкожных ксенографтов с более злокачественным фенотипом. По результатам RNA-Seq выявлено порядка 360 дифференциально экспрессирующихся генов. Также был обнаружен ряд некодирующих РНК, экспрессия которых достоверно изменялась в экспериментальных библиотеках по сравнению с контролем. Было обнаружено, что в устойчивых клетках повышается уровень активности белков, ключевых регуляторов клеточного цикла. На основании полученных данных выдвинуты предположения относительно метаболических путей, участвующих в приобретении опухолевыми клетками устойчивости к цитотоксической активности макрофагов.

Закключение. Цитотоксическая активность макрофагов способствует формированию устойчивости опухолевых клеток к данному воздействию и отбору клонов, характеризующихся повышенной степенью злокачественности.

ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ MCF7 ПРИ АКТИВАЦИИ SNAI1

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

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

e-mail: n.gloushankova@ronc.ru

Ключевые слова: опухолевая клетка, Snail1/SNAI1, эпителиально-мезенхимальный переход, клеточная миграция, межклеточная адгезия, цитоскелет, актин, миозин

Введение. Программа ЭМП используется опухолевыми клетками для инициации инвазивно-метастатического каскада. Драйверами ЭМП являются транскрипционные факторы семейств Snail, Twist, Zeb, которые подавляют экспрессию эпителиальных генов и активируют экспрессию мезенхимальных генов.

Цель исследования — изучить цитоскелетные механизмы ЭМП клеток линии рака молочной железы MCF7 при активации транскрипционного фактора Snail1.

Материалы и методы. В работе использовали линию рака молочной железы человека MCF7 и ее производную MCF-7-SNAI1 с tet-off-регулируемой экспрессией гена *SNAI1*. С помощью коррелятивной DIC-видео-микроскопии/флуоресцентной микроскопии анализировали миграцию клеток и после окрашивания фиксированных клеток специфическими антителами — распределение в клетках актиновых структур, фосфорилированного миозина, кератиновых промежуточных филаментов, белков межклеточной адгезии E-кадгерина, α -катенина и β -катенина

Результаты. При отмывке от тетрациклина и активации Snail1 клетки MCF-7-SNAI1 в течение 24 ч вступали в ЭМП, который начинался с активации Arp2/3-зави-

симой полимеризации актиновой сети на свободном крае. Клетки приобретали миграционный фенотип, сохраняя при этом экспрессию E-кадгерина. С помощью коиммунопреципитации показано, что на протяжении 96 ч после начала отмывки от тетрациклина в клетках сохранялись белковые комплексы межклеточной адгезии, включающие E-кадгерин, α -катенин и β -катенин. Вместе с тем, вхождение в ЭМП при активации Snail1 приводило к разрушению кольцевых актиновых пучков, реорганизации межклеточных адгезионных контактов и перераспределению белков межклеточной адгезии α -катенина и β -катенина на ведущий край, что также могло способствовать клеточной миграции. Были выделены 5 вариантов мезенхимального фенотипа, различающихся по морфологии клеток и скорости миграции, при этом клетки могли быстро изменять как фенотип, так и скорость движения. Мы впервые описали мезенхимальную миграцию, которая сопровождается аккумуляцией активного миозина за ядром, высвобождением ядра из сети промежуточных филаментов и его перемещением на ведущий край клетки. Центр организации centrosомальных микротрубочек в большинстве мигрирующих клеток MCF-7-SNAI1 локализовался сзади ядра.

Закключение. Таким образом, радикальное изменение морфологии и приобретение клетками MCF-7-SNAI1 пластичного мезенхимального фенотипа при активации Snail1 связано с реорганизацией актинового цитоскелета: разрушением кольцевых актиновых пучков и межклеточных адгезионных контактов, Arp2/3-зависимой полимеризацией актина на свободном крае и активацией контрактильности актина—миозина в области за ядром.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 22-15-00347).

ПОВЫШЕННАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕГУЛЯТОРА ГЛИКОЛИЗА В МОНОЦИТАХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ АССОЦИИРОВАНА С ПРООПУХОЛЕВОЙ ПОЛЯРИЗАЦИЕЙ МАКРОФАГОВ И НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ПРОГНОЗОМ

М.А. Ракина¹, М.Р. Патышева^{1,2}, П.С. Ямщиков¹,
Е.О. Казакова¹, А.Д. Казакова¹, А.С. Тарасова²,
С.Г. Афанасьев², Н.В. Чердынцева^{1,2}, И.В. Ларионова^{1,2},
Ю.Г. Кжышкова¹

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: militsarakina@mail.ru

Ключевые слова: рак ободочной кишки, рак прямой кишки, опухолеассоциированные макрофаги, транскриптом

Введение. Циркулирующие моноциты являются основным пластическим источником ОАМ, контролирующих

опухолевый рост, ангиогенез, метастазирование и резистентность к терапии.

Цель исследования — проанализировать, как опухоли ободочной и прямой кишки влияют на программирование моноцитов периферической крови онкологических больных.

Материалы и методы. Фенотипически моноциты периферической крови были охарактеризованы с помощью проточной цитометрии. Транскриптомный анализ был выполнен с использованием РНК-секвенирования, экспрессия генов подтверждена с помощью ПЦР в реальном времени. Фенотипический анализ ОАМ проводили с помощью иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии. Технология Nanostring GeoMX DSP-NGS применялась для пространственного анализа транскриптома. Данные TCGA были получены для анализа выживаемости и корреляции с параметрами прогрессирования у пациентов с КРР.

В исследование включены пациенты с РПК и раком ободочной кишки, получившие лечение в абдоминальном отделении НИИ онкологии Томского НИМЦ. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрено местным комитетом по медицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Результаты. Анализ NGS выявил опухолеспецифическое программирование транскриптома моноцитов у пациентов с КРР по сравнению с моноцитами здоровых доноров. Ключевым отличием транскриптома моноцитов у больных раком ободочной кишки по сравнению с РПК была повышенная экспрессия критического регулятора гликолиза PFKFB3. С помощью конфокальной микроскопии показано, что PFKFB3 в ткани рака ободочной кишки преимущественно экспрессируется CD14⁺CD68⁺-макрофагами. PFKFB3 связан с количеством ОАМ и их проопухолевым фенотипом при раке ободочной кишки, но не при РПК. Экспрессия PFKFB3 была связана с рецидивом и низкой общей и безрецидивной выживаемостью у пациентов с раком ободочной кишки, но не у больных РПК.

Заключение. Наши данные свидетельствуют о том, что опухолеспецифическое программирование клеток врожденного иммунитета, опосредованное PFKFB3, следует рассматривать для разработки терапевтического подхода при КРР.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 19-15-00151) и по государственному контракту Минобрнауки России № 075-15-2021-1073).

ВКЛАД МЕТИЛИРОВАНИЯ 10 ГЕНОВ днРНК В ПАТОГЕНЕЗ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.Д. Селезнева¹, Е.А. Филиппова², С.С. Лукина²,
И.В. Пронина², Н.А. Иванова², Т.П. Казубская³,
А.М. Бурденный², Э.А. Брага², В.И. Логинов²

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

²ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: alenaselezneva2000@mail.ru

Ключевые слова: длинные некодирующие РНК, рак молочной железы, метилирование

Введение. По оценкам экспертов, РМЖ у женщин в 2020 г. стал наиболее часто диагностируемым ЗНО (~2,3 млн новых случаев (11,7 % от общего числа случаев рака)). В настоящее время не существует достоверной и полной информации о точных механизмах возникновения РМЖ, что делает все результаты лечения относительно, поэтому нужны новые подходы. В частности, открытые днРНК могут предоставить новые возможности в изучении патогенеза рака. Однако на данный момент роль эпигенетической регуляции, в частности метилирования этих генов, пока очень мало исследована.

Цель исследования — изучение уровня метилирования CpG-островков 10 генов днРНК как перспективных маркеров РМЖ.

Материалы и методы. В исследовании использовали выборку из 50 парных (опухоль/гистологически нормальная прилежащая ткань) образцов РМЖ. Анализ метилирования проводили с помощью метода количественной метилспецифичной ПЦР. Для каждого образца был получен свой уровень метилирования (%). Статистический анализ уровней метилирования выполняли с применением непараметрического U-теста Манна–Уитни. Использовали математические пакеты IBM SPSS Statistics 22.

Результаты. Нами показано статистически значимое ($p < 0,001$) повышение уровня метилирования группы генов днРНК: *MEG3*, *ZNF667-AS1*, *GAS5*, *SEMA3B-AS1*. При этом метилирование генов *ZNF667-AS1*, *SEMA3B-AS1* в опухолях РМЖ обнаружено впервые. Выявлены значимые корреляции уровня метилирования исследованных генов днРНК *MEG3*, *ZNF667-AS1* со стадией рака, размером опухоли, лимфогенным метастазированием, а генов *GAS5* и *SEMA3B-AS1* — со стадией рака, размером опухоли при РМЖ.

Заключение. Таким образом, нами показано влияние днРНК и их метилирования на развитие опухолей РМЖ, что важно для понимания его патогенеза. Новые свойства днРНК могут найти применение в качестве потенциальных диагностических и прогностических маркеров РМЖ.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР ZEB1 ПРОТИВОПОЛОЖНЫМ ОБРАЗОМ РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ PD-L1 НА РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

О.М. Семенов, А.А. Дакс, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: semyonov.somspb@yandex.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, эпителиально-мезенхимальный переход, ZEB1, PD-L1

Введение. ZEB1 является транскрипционным фактором, участвующим в активации программы ЭМП. ЭМП играет ключевую роль в развитии онкологических заболеваний, определяя способность малигнизированных клеток к миграции и инвазии, что обеспечивает их распространение по организму. При этом формирование метастазов сопровождается обратным мезенхимально-эпителиальным переходом (МЭП), который, по современным представлениям, обеспечивается подавлением активности транскрипционных факторов, вовлеченных в ЭМП.

Важное условие выживания трансформированных клеток — их способность избегать цитотоксического иммунного ответа. Одним из ключевых негативных регуляторов противоопухолевого иммунитета является трансмембранный белок PD-L1.

Цель исследования — изучение изменения уровня экспрессии PD-L1 на клеточных моделях РМЖ человека с различным статусом ZEB1.

Материалы и методы. В исследовании в качестве модели ЭМП использовали линию клеток РМЖ люминального подтипа А — MCF7 — с индуцируемой доксициклином экспрессией ZEB1. В качестве модели МЭП были использованы 2 линии трижды негативно РМЖ: MDA-MB-231 и Hs578T с нокдауном ZEB1. Для активации экспрессии PD-L1 клетки MCF7 с индукцией и без индукции экспрессии ZEB1, а также клетки линий MDA-MB-231 и Hs578T с разным статусом ZEB1 были обработаны ИФН- γ (концентрация 100 МЕ/мл, время обработки 24 ч). Далее методами количественной ОТ-ПЦР и иммуноблоттинга провели сравнение количества PD-L1 на уровне мРНК и белка для клеток с разным статусом ZEB1, часть которых была обработана ИФН- γ .

Результаты. Было установлено, что в клетках MCF7 после обработки ИФН- γ количество PD-L1 значительно повышалось как на уровне мРНК, так и на уровне белка. При этом положительный статус ZEB1 значительно усиливал как экспрессию гена, кодирующего PD-L1, так и синтез белка. С другой стороны, показано, что в линиях MDA-MB-231 и Hs578T, подвергшихся обработке ИФН- γ , и на уровне мРНК, и на уровне белка количество PD-L1 было повышено в клетках с нокдауном ZEB1 по сравнению с контрольными клетками.

Заключение. ZEB1 способен образовывать множественные белок-белковые комплексы и выступать в роли активатора и репрессора транскрипции различных генов. Нами была показана противоположная роль ZEB1 в регуляции экспрессии PD-L1 для клеток РМЖ разных подтипов. Усиление экспрессии PD-L1 как на модели ЭМП, так и на модели МЭП РМЖ человека отражает адаптацию трансформированных клеток к цитотоксическому иммунному ответу для разных стадий развития рака.

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

ВЛИЯНИЕ НОКДАУНА КАВЕОЛИНА 1 НА ПРОДУКЦИЮ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ КЛЕТКАМИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

Г.О. Скрябин¹, А.А. Беляева², А.Д. Еникеев¹,
А.М. Сенковенко², Е.М. Чевкина¹

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

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва
e-mail: go.skryabin@gmail.com

Ключевые слова: кавеолин 1, экстраклеточные везикулы, продукция экзосом, рафтообразующие белки, немелкоклеточный рак легкого

Введение. В последнее время неуклонно растет интерес исследователей к экстраклеточным везикулам (ЭКВ), в частности к экзосомам — мембранным пузырькам, секретлируемым клетками для осуществления межклеточной коммуникации за счет переносимых в их составе сигнальных молекул. Показано, что опухолевые клетки продуцируют эти частицы в гораздо большем количестве, чем здоровые, и могут использовать их для формирования злокачественного фенотипа в нормальных клетках, формирования метастатических ниш, промотирования ангиогенеза и других процессов канцерогенеза. Однако механизмы биогенеза экзосом все еще недостаточно ясны. Известно, что они образуются в системе внутриклеточного эндосомального транспорта. Наименее изученным остается путь, связанный с липидными рафтами мембран экзосом — упорядоченных наноучастков мембран, обогащенных холестерином и сфинголипидами, а также так называемыми рафтообразующими белками: флотиллинами 1 и 2, стоматином (в случае плоских липидных рафт), кавеוליном 1 (в случае кавеол — липидных рафт, которые формируют колбообразные инвагинации мембраны).

Цель исследования — оценить влияние нокдауна кавеолина 1 на продукцию ЭКВ клетками НМРЛ.

Материалы и методы. В работе использовали линию клеток НМРЛ A549, в которой проводилось подавление эндогенной экспрессии кавеолина 1 методом лентивирусной инфекции с использованием вектора, экспрессирующего 2 варианта последовательностей мшРНК (shRNA, малой шпилечной РНК). Эффективность нокдауна оценивали методом иммуноблоттинга. Полученные сублинии клеток рассаживали в равном количестве в среде DMEM, лишенной ЭКВ, и культивировали 72 ч, после чего проводили подсчет клеток, а из полученной кондиционированной среды методом ультрацентрифугирования выделяли ЭКВ. Подсчет их концентрации осуществляли методом анализа траектории движения наночастиц (NTA) и с использованием коммерческого набора для квантификации экзосом FluoroCet (FCET96A-1, System Biosciences), основанного на анализе активности ацетилхолинэстеразы.

Полученное значение количества частиц нормировали на число клеток, которые их продуцировали.

Результаты. Продукция кавеолина 1 в одной производной линии снизилась более чем в 10 раз, в другой — в 3 раза. В случае сублинии с наиболее выраженным подавлением наблюдалось достоверное уменьшение количества продуцируемых везикул в 1,8 раза (стандартное отклонение 0,5) по сравнению с контрольной линией A549shGFP. Количество ЭКВ, продуцируемых клетками со слабым эффектом нокдауна кавеолина 1, также снижалось, но не достигало статистической значимости. Данные были получены как с помощью набора FluoroCet, так и методом NTA, что говорит о корреляции этих методов между собой.

Заключение. Существенное подавление эндогенной экспрессии кавеолина 1 в линии НМРЛ A549 приводит к снижению продукции ЭКВ этими клетками.

ДЕКСАМЕТАЗОН ВЛИЯЕТ НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕПАРАНАЗЫ И ЕЕ АССОЦИАЦИЮ С ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫМ РЕЦЕПТОРОМ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЯХ U87 В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ РЕЦИДИВА ГЛИОБЛАСТОМЫ *IN VIVO*

Д.К. Соколов¹, О.Б. Шевелев², А.В. Строкотова¹,
Г.М. Казанская¹, А.М. Волков³, С.В. Айдагулова⁴,
Е.Л. Завьялов², Э.В. Григорьева¹

¹НИИ молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ
«ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины»,
Новосибирск;

²ФГБНУ «ФИЦ «Институт цитологии и генетики
СО РАН», Новосибирск;

³ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина»
Минздрава России, Новосибирск;

⁴ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Новосибирск
e-mail: dmit_s95@mail.ru

Ключевые слова: глиобластома, гепарансульфат, гепараназа, внеклеточный матрикс, глюкокортикоидный рецептор

Введение. Гепараназа (HPSE) представляет собой фермент, ответственный за деградацию полисахаридных молекул гепарансульфата, важного компонента ВКМ. Известно, что высокий уровень экспрессии HPSE ассоциирован с метастазированием различных опухолей, однако остается неизвестным, какие молекулярные механизмы вовлечены в активацию экспрессии HPSE в опухолевых клетках. Нами было высказано предположение, что важную роль в этом процессе может играть такой транскрипционный фактор, как глюкокортикоидный рецептор (GR, ген *Nr3C1*).

Цель исследования — изучение ассоциации экспрессии HPSE и *Nr3C1*, а также влияния глюкокортикоидов на экспрессию этих генов на модели рецидива глиобластомы *in vivo*.

Материалы и методы. Мыши SCID ($n = 64$) получали дексаметазон в монорежиме или в комбинации с темозоломидом (16 животных в группе) с последующей ортотопической инокуляцией клеток глиобластомы U87 человека. Экспрессию HPSE и *Nr3C1* в нормальной и околоопухолевой тканях головного мозга животных и ксенотрансплантатах U87 определяли с помощью ОТ-ПЦР и иммуноокрашивания. Полученные результаты были проанализированы с использованием ANOVA с апостериорным критерием наименьшей значимой разницы Фишера (LSD).

Результаты. Введение дексаметазона экспериментальным животным не влияло на уровень экспрессии HPSE в нормальных и околоопухолевых тканях мозга мышей SCID, однако значительно снижало (в 2 раза) экспрессию HPSE и влияло на уровень экспрессии GR в ксенографтах U87, выращенных у предварительно обработанных животных. Для того чтобы выяснить, может ли GR участвовать в индуцированном дексаметазоном подавлении экспрессии HPSE, был проведен корреляционный анализ между HPSE и *Nr3C1*. Экспрессия HPSE была умеренно связана с экспрессией изоформ GRa и GRb ($r = 0,62$ и $r = 0,58$ соответственно) в опухолях U87, выращенных у контрольных животных, однако ассоциация экспрессии HPSE с экспрессией GRa ($r = 0,004$), но не GRb ($r = 0,53$) исчезала в опухолях, выращенных у предварительно обработанных дексаметазоном мышей SCID.

Заключение. Экспрессия HPSE в ксенографтах U87 ассоциирована с уровнем экспрессии GR, что подтверждает возможность участия GR в регуляции экспрессии HPSE. Введение дексаметазона оказывает влияние на уровень экспрессии HPSE и ослабляет связь экспрессии HPSE и *Nr3C1* в ортотопических опухолях U87, сформированных в головном мозге мышей, предварительно получавших дексаметазон.

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

А.В. Строкотова поддержана стипендией
Президента Российской Федерации (СП-4000.2022.4).

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ HLDF НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ОБРАЗЦАМИ ТКАНИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИМИ ПОДТИПАМИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.А. Студеникина^{1,2}, Е.С. Михайлова^{1,2}, Н.А. Вараксин³,
А.П. Богачук⁴, В.М. Липкин⁴, А.И. Аутеншлюс^{1,2}

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

²ФГБНУ «ФИЦ фундаментальной и трансляционной
медицины», Новосибирск;

³ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово;

⁴ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва
e-mail: st.aa73@gmail.com

Ключевые слова: рак молочной железы, цитокины, фактор дифференцировки HLDF

Введение. Прогрессирование люминальных подтипов в более злокачественные происходит в 30 % случаев и связано с метастатическим прогрессированием РМЖ. При этом взаимосвязь между различными молекулярными подтипами и функциональными характеристиками опухоли с точки зрения секреции цитокинов остается неизвестной. Известно, что фактор дифференцировки Human Leukemia Differentiation Factor (HLDF) изменяет связывание цитокинов с мембраной и оказывает влияние и на цитокинпродуцирующую функцию клеток биоптатов.

Цель исследования — изучение влияния фактора дифференцировки HLDF на продукцию цитокинов у пациентов с РМЖ различных молекулярно-биологических подтипов.

Материалы и методы. Материалом служили супернатанты образцов ткани молочной железы 60 пациентов с диагнозом РМЖ стадий G_1 и G_2 . Средний возраст пациентов $53,0 \pm 2,1$ (23–70) года. На основании экспрессии рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR), рецептора эпидермального фактора роста человека 2-го типа (HER2) и маркера пролиферации Ki-67 пациенты были разделены на 5 групп согласно молекулярно-биологическим подтипам: люминальный А, люминальный В HER2-отрицательный, люминальный В HER2-положительный, HER2-положительный и базальноподобный. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Для определения спонтанной продукции часть опухоли инкубировали в среде DMEMF-12, а для определения влияния HLDF другую часть опухоли — в том же объеме среды с добавлением 20 мкг/мл HLDF. Используя ИФА в супернатантах образцов опухолей определяли концентрацию: ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-17, ИЛ-18, ИЛ-1 β , ИЛ-1Ra, ФНО- α , ИФН- γ , VEGF. Оценивали индекс влияния HLDF на продукцию цитокинов образцами опухоли: $IB_{HLDF} = A/B$, где А — концентрация при влиянии HLDF, В — концентрация при спонтанной продукции. Для статистической обработки результатов использовали SPSS v. 22.0.

Результаты. Установлено, что статистически значимые различия у пациентов с различными молекулярно-биологическими подтипами возникают при влиянии HLDF только на продукцию ИЛ-10 ($p = 0,029$).

Закключение. Пациенты с HER2-положительным подтипом имеют наименьшие значения IB_{HLDF} на продукцию ИЛ-10, т.е. наблюдается значительная супрессия продукции этого цитокина при влиянии фактора дифференцировки HLDF, тогда как при люминальных подтипах HLDF практически не оказывает влияние на продукцию ИЛ-10, а при базальноподобном под-

типе наблюдается незначительная стимуляция продукции ИЛ-10.

АНАЛИЗ МИГРАЦИОННОГО И ИНВАЗИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА РАЗЛИЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

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

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: trremar@mail.ru

Ключевые слова: инвазия, клеточная миграция, опухолевая гетерогенность

Введение. РМЖ является одной из наиболее часто встречающихся злокачественных опухолей у женщин. Эффективность лечения и риск прогрессирования РМЖ напрямую зависят от степени выраженности внутриопухолевой гетерогенности. Несмотря на обилие исследований, посвященных изучению внутриопухолевой гетерогенности, крайне мало информации о биологических характеристиках различных популяций клеток РМЖ.

Цель исследования — оценить миграционный и инвазивный потенциалы различных популяций клеток РМЖ.

Материалы и методы. В исследовании использовали операционный материал опухолевой ткани пациентов с РМЖ ($n = 4$) в возрасте от 18 до 65 лет, не получавших предоперационной ХТ. Образцы опухолевой ткани подвергали механической диссоциации для получения клеточной суспензии. Для анализа миграционной способности клеток использовали набор QCM Chemotaxis Cell Migration Assay. Метод основан на направленном движении клеток в сторону хемоаттрактанта через пористую мембрану. Для оценки инвазии применяли схожую технологию с использованием набора QCM ECMatrix Cell Invasion Assay. Данный метод также основан на направленном движении клеток в сторону хемоаттрактанта через пористую мембрану и матригель. В качестве хемоаттрактанта выступала фетальная бычья сыворотка в различной концентрации. После 24 ч клетки с нижней камеры собирали и фенотипировали. Фенотипирование до и после оценки миграции и инвазии проводили с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием антител на маркеры CD45, EpCAM, CD44, CD24, CD133, ALDH1, Ki-67 и N-кадгерин.

Результаты. В большинстве изученных случаев клетки с фенотипами $CD45^-EpCam^+CD44^+CD24^-N-кадгерин^+CD133^+ALDH1^+Ki-67^-$ и $CD45^-EpCam^+CD44^+CD24^-N-кадгерин^+CD133^-ALDH1^-Ki-67^-$ были способны к миграции. Клетки с фенотипом $CD45^-EpCam^+CD44^+CD24^-N-кадгерин^+CD133^+ALDH1^+Ki-67^-$ демонстрировали инвазивный потенциал. Для $CD45^-EpCam^+CD44^+CD24^-N-кадгерин^+CD133^+ALDH1^+$

Ki-67⁺-клеток было характерно отсутствие способности к миграции и инвазии. Клетки других фенотипов демонстрировали миграцию и/или инвазию в единичных случаях.

Заключение. Популяции клеток РМЖ гетерогенны в плане миграционного и инвазивного потенциалов. Миграция и инвазия характерны для непродлиферирующих популяций. Коэкспрессия маркеров стволовости CD133 и ALDH1 связана с инвазивным потенциалом клеток, а экспрессия CD44 ассоциирована с клеточной миграцией.

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

МЕХАНИЗМЫ ВЫХОДА ИЗ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИОПРЕПАРАТОВ

И.А. Цыденова^{1,2}, М.М. Цыганов^{1,3}, М.К. Ибрагимов¹⁻³,
А.А. Нуштаева⁴, Н.В. Литвяков^{1,2}

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

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

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

⁴ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск
e-mail: tsydenova422@gmail.com

Ключевые слова: WNT-сигналинг, репликативное старение

Введение. Опухоли сильно различаются по способности выходить из состояния репликативного старения. Было показано, что у больных РМЖ выход из репликативного старения с метастазированием наблюдается только у пациентов, в опухоли которых эктопически активирован WNT-сигналинг за счет амплификаций генов-активаторов и делеций негативных регуляторов этого сигнального пути.

Цель исследования — изучить способность опухолевых клеток, различающихся по CNA генов WNT-сигналинга, к выходу из репликативного старения после воздействия химиопрепаратов.

Материалы и методы. В качестве химиопрепарата был использован цисплатин в дозе 25 мМ. Использовали 2 линии опухолевых клеток: T47D с высоким уровнем (FZD9-Gain +1, TSF7L2-Loss +1, CCND1-Gain +1, CSNK2A2-Loss +1, FZD2-Gain +1, WNT3-Gain +1, WNT9B-Gain +1; в сумме 7) и BT474 с нормальным уровнем (GSK3B-Gain -1, FZD9-Gain +1, TSF7L2-Gain -1, CCND1-Gain +1; в сумме 0) активации WNT-сигналинга. Выделение дифференцированных клеточных популяций CD44⁻/CD24⁺ проводили с использованием сортера Sony SH800S (Sony Biotechnology, США). С помощью ИЛ-6 индуцировали дедифференцировку до ОСК. Для ингибирования WNT-сигналинга применяли ингибитор ICG-001 (1 мМ). Динамику роста

культуры и формирование сфероидов фиксировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Изображения анализировали с использованием программного обеспечения NIS-Elements. Определяли клеточность культур, ареал закрытия дна лунки и наличие маммосфер. Полнотранскриптомный анализ осуществляли на платформе Clariom™ S Assay.

Результаты. После воздействия цисплатина на субпопуляции EpCAM⁺CD44⁻CD24⁺ /⁺-клеток опухолевых линий BT474 и T47D динамика клеточности культур существенным образом различается. Полученные данные показывают, что клетки BT474 с нормальным уровнем WNT-сигналинга не выходят из репликативного старения после воздействия цисплатина, в то время как клетки линии T47D выходят на 14-е сутки из репликативного старения и дедифференцируются до ОСК. Совместное воздействие цисплатина и ингибитора привело к тому, что на 21-е сутки практически все клетки этой линии погибли, в то время как один ингибитор не препятствовал пролиферации и образованию маммосфер. Действие ингибитора WNT ICG-001 подтверждалось транскриптомным анализом, и экспрессия 122/170 генов WNT-сигналинга оказывается сниженной более чем в 2 раза по сравнению с клетками без воздействия ICG-001.

Заключение. Результаты проведенных нами культуральных исследований механистически доказывают, что выход из репликативного старения опухолевых клеток обусловлен эктопической активацией WNT-сигналинга за счет амплификаций активаторов и/или делеций негативных регуляторов генов WNT-сигналинга.

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

АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ, РЕЦЕПТОРЫ АНГИОТЕНЗИНА II 2-ГО ТИПА: РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.А. Черногубова¹, М.Б. Чибичян², А.В. Аветян²,
Т.О. Лаптева³, М.И. Коган²

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

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России,
Ростов-на-Дону
e-mail: eachernogubova@mail.ru

Ключевые слова: доброкачественная гиперплазия предстательной железы, простатическая интраэпителиальная неоплазия, рак предстательной железы, ангиотензинпревращающий фермент, рецепторы ангиотензина II 2-го типа

Введение. Проллиферативные процессы в предстательной железе — РПЖ и доброкачественная гиперплазия

предстательной железы (ДГПЖ) — наиболее распространены у мужчин пожилого возраста. Простатическая интраэпителиальная неоплазия (ПИН) рассматривается как морфологический предшественник РПЖ с высокой вероятностью злокачественной трансформации. Для ранней диагностики РПЖ перспективным является определение, в каких случаях ПИН имеет потенциал к прогрессированию в клинически значимый РПЖ, а в каких — останется индолентным гистопатологическим процессом.

Цель исследования — анализ роли ренин-ангиотензиновой системы в патогенезе пролиферативных поражений предстательной железы.

Материалы и методы. В исследование были включены 63 пациента, которым выполнена трансректальная биопсия предстательной железы: у 19 пациентов диагностирована ДГПЖ, у 25 мужчин — РПЖ, у 19 мужчин РПЖ обнаружен при повторной биопсии, которая была проведена на основании выявленной ПИН-3. В секрете предстательной железы определяли активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), в ткани предстательной железы оценивали экспрессию рецепторов ангиотензина II 2-го типа (AT2-R) с использованием первичных поликлональных антител Angiotensin II Type 2 Receptor и системы визуализации EnVision FLEX (Dako, Дания) по стандартной методике.

Результаты. Установлено, что активность АПФ в секрете предстательной железы при пролиферативных заболеваниях значительно выше, чем в «здоровой» предстательной железе. Наиболее высокая активность АПФ отмечена при ДГПЖ, а минимальная — при РПЖ. Экспрессия AT2-R в тканях предстательной железы при пролиферативных заболеваниях имеет свои особенности. Экспрессия AT2-R в строме оказалась одинаковой, в ядрах эпителиальных клеток уровень экспрессии AT2-R снижался в ряду ДГПЖ — ПИН — РПЖ. Таким образом, увеличение активности АПФ, накопление ангиотензина II в секрете предстательной железы при пролиферативных заболеваниях на фоне дефицита AT2-R является метаболической основой злокачественной трансформации предстательной железы.

Заключение. Активность АПФ в секрете предстательной железы и уровень экспрессии AT2-R в ткани железы при первичной биопсии могут рассматриваться как перспективные прогностические инструменты ранней детекции малигнизации предстательной железы.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИЗМЕНЕНИЙ ВОЛОКНИСТОГО КОМПОНЕНТА СТРОМЫ В ПРОГРЕССИРУЮЩИХ МЕЛАНОМАХ ХОРИОИДЕИ

А.Ю. Шаманова^{1,2}, Е.Л. Казачков², И.Е. Панова³, В.В. Саевец^{1,2}

¹ГБУЗ «Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины», Челябинск;

²ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск;

³СПб филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Санкт-Петербург
e-mail: anna-sha@bk.ru

Ключевые слова: меланома хориоидеи, метастазирование, строма опухоли, волокна

Введение. Меланома хориоидеи (МХ) — внутриглазная опухоль, метастазирующая вне зависимости от вида проведенного лечения. Микроокружение опухоли изменяется в процессе прогрессирования и метастазирования.

Цель исследования — оценить распределение волокнистого компонента стромы метастазирующих МХ.

Материалы и методы. С применением гистологических и ИГХ-методов (Collagen-IV (Clone CIV 22)) проведено исследование тканевого материала МХ пациентов с клиническими стадиями T2 (a, b, c)—3N0M0—, получавших лечение в период 2013–2017 гг. на базе Челябинского областного клинического центра онкологии и ядерной медицины. На основании критериев включения и исключения сформированы 2 группы исследования (ГИ): 1-я — МХ без отдаленных метастазов в анамнезе ($n = 20$), 2-я — с отдаленными метастазами в печень ($n = 10$); также проведен подгрупповой анализ (во 2-й группе) вторичных очагов МХ ($n = 10$).

Результаты. Средний возраст пациентов составил 62 года, соотношение по полу: 15 (50 %) женщин, 15 (50 %) мужчин. Медиана времени до метастазирования опухоли на момент проведения исследования и оценки параметров — 32 (17–40) мес. Изучены веретеноклеточные МХ ($n = 7$), эпителиоидноклеточные ($n = 8$), смешанноклеточные МХ ($n = 15$). В ходе оценки распределения коллагена базальных мембран обнаружена его ИГХ-экспрессия не только в стенках сосудов, но и в виде хаотично переплетающихся пучков, оплетающих опухолевые клетки. В строме опухоли обнаружено очаговое распределение хаотичных волокон коллагена IV типа с преобладанием в метастазирующих МХ. Так, при количественной оценке объемной плотности обнаружено, что медиана объемной плотности коллагена IV типа в 1-й группе исследования составляет 0,7 (0,1–1,1), во 2-й группе — 1,9 (1,2–2,2) ($p = 0,002$).

Заключение. Оценка волокнистого компонента в метастазирующих МХ позволяет выделить показатели, обладающие прогностической ценностью. Стромальный компонент в опухоли можно использовать для прижизненной оценки потенциала прогрессирования МХ.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТКИ С СИНДРОМОМ ЛИНЧА

А.Д. Шахматова¹, Е.Д. Мирлина¹, С.С. Емельянова¹,
Д.Н. Хмелькова², Г.М. Бутрович¹, Ю.В. Киль¹,
И.Л. Поляцкин³, А.С. Артемьева³, А.В. Гуляев³,
О.А. Вострюхина¹, В.Н. Вербенко¹

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»,
Гатчина;

²АО «Центр генетики и репродуктивной медицины
«Генетико», Москва;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России, Санкт-Петербург
e-mail: rykhlova_ad@pnpi.nrcki.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, патогенные соматические мутации, синдром Линча

Введение. Наследственный неполипозный КРР имеет склонность к развитию множественных опухолей, включая рак толстой кишки, эндометрия, РЯ, РЖ и др. Данные литературы указывают на умеренный риск РМЖ.

Цель исследования — проанализировать опухоль молочной железы у пациентки с множественными первичными новообразованиями и носительством герминальной мутации в гене *MSH6* при доказанном синдроме Линча. Билатеральные аденокарциномы молочных желез развились через 14 и 28 лет после удаления первичной опухоли. Для выяснения пути канцерогенеза был изучен мутационный профиль дольковой аденокарциномы молочной железы слева с помощью полноэкзомного секвенирования (WES) ее ДНК.

Материалы и методы. Парафиновый срез аденокарциномы молочной железы был предоставлен патолого-анатомической лабораторией НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург). ДНК выделяли с помощью набора GeneJET FFPE DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Затем ДНК была фрагментирована ультразвуком с помощью ME220 (Covaris, США) до среднего размера 180~280 п. н. Библиотеки ДНК были получены с применением реагентов для захвата экзона SureSelect Human All Exon V7 (Agilent Technologies, США). Для секвенирования экзона использовалась платформа Illumina NovaSeq 6000 (Illumina Inc., США). Библиотеки ДНК были секвенированы компанией «Генетико» (Россия). Микросателлитную нестабильность определяли по маркерам BAT26 и BAT40. Проводили ИГХ-диагностику рецепторного статуса РМЖ (Е-кадгерин, PR, ER, Ki-67, HER2 neu).

Результаты. Анализ данных WES выявил патогенные соматические мутации в генах *BRCA2* (p.Gln155Ter), *CDH1* (с.49-1G>C) и *BLM* (p.Ile1299LeufsTer61). Микросателлитная нестабильность в опухоли не обнаружена. Экспрессия Е-кадгерина вследствие мутации ожидаемо была отрицательной. Маркер пролиферативной активности Ki-67 составил 80 %, статус опухоли HER2 при определении методом хромогенной гибридизации *in situ* (CISH) равнялся 1+, ER — 70 %, PR — 40 %.

Заключение. Схема туморогенеза может включать на первой стадии дефицит коррекции неспаренных оснований ДНК за счет герминальной мутации в гене *MSH6*. Мутации в генах *BRCA2* и *BLM* (ДНК-лигаза I) дополнительно повреждают путь гомологичной рекомбинационной репарации ДНК. Мутация в гене *CDH1* приводит к дисфункции межклеточной адгезии, запущенная инвазию и рост опухоли.

Молекулярная диагностика опухолей

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГЛИОМ

Г.Ж. Абильдинова¹, Б.Б. Жетписбаев², А.В. Боровикова¹,
Ж.М. Жабакова¹, А.А. Есентаева¹

¹Больница Медицинского центра Управления делами
Президента Республики Казахстан, Нур-Султан,
Республика Казахстан;

²АО «Национальный центр нейрохирургии», Нур-Султан,
Республика Казахстан
e-mail: labgen-astana@mail.ru

Ключевые слова: олигодендроглиома, астроцитомы, делеция, коэкспрессия, ДНК клеток опухоли

Введение. Глиомы являются наиболее распространенными инвазивными первичными опухолями головного мозга и представляют собой гетерогенную группу опухолей нейроэпителиального происхождения. Согласно рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (2021) при классификации глиом необходимо учитывать не только гистологические особенности клеток опухоли, но и отразить молекулярные особенности клеток глии для диагностики подтипов опухоли, назначения ХТ и ЛТ.

Цель исследования — изучить мутационный статус клеток опухоли нейроглии для уточнения типа опухоли.

Материалы и методы. Для молекулярно-генетического исследования использовали образцы опухолевой ткани, фиксированные в формалине и залитые в парафиновые блоки. Для выделения ДНК применяли коммерческий набор FFPE DNA PowerPlex Fusion System (США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Для проведения метода MLPA использовали смесь зондов P088, P105, ME012 (MRC Holland, Нидерланды) в соответствии с протоколом производителя.

Результаты. В исследование были включены 70 пациентов (34 мужчины и 36 женщин), которые прооперированы в Национальном центре нейрохирургии (Нур-Султан, Республика Казахстан). В 4 % случаев исследование не проведено, в связи с низкой концентрацией ДНК.

Мутация *IDH1/IDH2* обнаружена в 40 случаях, в 58 % из них выявлены мутации *IDH1/IDH2* с делецией 1p/19q, в 1 случае идентифицирована мутация *IDH2*. В 42 % случаев мутация *IDH1/IDH2* идентифицирована при опухолях нейроглии различной локализации.

Пилоцитарная астроцитома была подтверждена в 12 случаях, в 25 % из них обнаружена точечная мутация *BRAF600E* и в 75 % — *KIAA1549 BRAF*.

Немаловажное значение для прогноза заболевания имеет гомозиготная делеция гена *CDKN2A/B* при астроцитомах, мутация диагностирована в 10 случаях, в 1 случае делеция сочеталась с делецией 1p/19q.

Идентифицирована мутация *EGFR*: в 2 случаях — делеция, в 3 — дупликация. При этом делеция гена *EGFR* сочеталась как с гомозиготной делецией *CDKN2A/B*, так и с дупликацией *CDKN2A/B*.

У 22 пациентов изучено гиперметилирование в промоторной области *MGMT*, показатель составил от 8,6 до 85,6 %.

Заключение. Полученные результаты показывают, что молекулярное профилирование клеток опухоли необходимо для правильной диагностики подтипа опухоли, мутации являются прогностическими маркерами и предиктором ответа при назначении таргетной терапии.

ДИАГНОСТИКА ОПУХОЛЕВОГО МАРКЕРА ГЛИОБЛАСТОМЫ С ПОМОЩЬЮ АПТАМЕРОВ К РЕЦЕПТОРУ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

О.М. Антипова, А.М. Копылов

ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва
e-mail: antipovachem@gmail.com

Ключевые слова: глиобластома, аптамер, EGFR

Введение. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) — основной опухолевый маркер глиобластомы. К белку EGFR как напрямую, так и в составе клеток селектированы аптамеры. Аптамеры представляют собой олигонуклеотиды, высокоаффинно и специфично связывающие целевую мишень. Сравнение отобранных в разных экспериментах аптамеров по данным литературы затружено.

Цель исследования — разработка алгоритма сравнения аптамеров с фокусом на связывании с клетками культур глиобластомы пациентов.

Материалы и методы. В работе использованы РНК-и ДНК-аптамеры: модифицированные 2'-F-пиримидил-РНК-аптамеры ME07, CL04, ДНК-аптамеры U31 и U2, GR20, разработанный в нашей лаборатории ДНК-аптамер Goll (нуклеотидная последовательность 5'-GCCGGCATTTTGACGCC-GCCCCGGCTGCTTAGTCTCCGGGGGCATATGGC-3').

Результаты. Для исследуемых аптамеров с помощью алгоритмов расчета RNAfold предложены возможные

вторичные структуры. Методом интерферометрии биослоев показана аффинность исследуемых аптамеров к рекомбинантному внеклеточному домену белка EGFR. Методом проточной цитофлуориметрии на линиях клеток с различной экспрессией EGFR показано специфическое узнавание аптамерами рецептора на клетке. Проведено исследование 4 первичных культур опухоли пациентов с глиобластомой с различными уровнями экспрессии EGFR.

Заключение. Аптамеры являются эффективным узнающим элементом для исследования представленности EGFR на клетках культур опухоли глиобластомы человека. Показано, что эффективность узнавания рецептора на клетке для РНК- и ДНК-аптамеров сопоставима. Статус EGFR на опухолевых клетках по-разному влияет на связывание различных аптамеров.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2020-809; вн. номер 13.1902.21.0030).

МАЛОИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ микроРНК

О.Е. Брызгунова^{1,2}, П.П. Лактионов^{1,2}, Ю.А. Ланцухай¹,
С.В. Пак¹, С.Э. Красильников¹, М.Ю. Коношенко^{1,2}

¹ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина»
Минздрава России, Новосибирск;

²ФГБУН «Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск
e-mail: olga.bryzgunova@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, микроРНК, диагностический маркер, жидкостная биопсия, микровезикулы, плазма

Введение. Эффективное выявление РЛ на ранних стадиях заболевания и высокочувствительный мониторинг эффективности терапии позволят существенно увеличить выживаемость и улучшить качество жизни пациентов. В качестве маркеров РЛ могут выступать опухолеспецифические микроРНК, экспрессия которых нарушается в опухолевых клетках, что приводит к изменению их концентрации, в том числе в крови.

Цель исследования — получить новые данные относительно aberrантной экспрессии онкоспецифических микроРНК в плазме крови (в составе внеклеточных везикул и в интактной плазме крови) у больных РЛ и сформировать пилотную панель микроРНК, пригодную для диагностики РЛ.

Материалы и методы. Из образцов крови здоровых доноров и больных РЛ методом последовательного центрифугирования была получена плазма крови. Затем из части полученной плазмы методом агрегации-преципитации была выделена фракция внеклеточных везикул. Из обеих собранных фракций плазмы крови больных и здоровых доноров выделяли микроРНК

и методом петлевой ОТ-ПЦР определяли концентрации 17 из них.

Результаты. Показано, что фракция внеклеточных везикул плазмы крови представляет собой перспективный источник диагностически значимых микроРНК: при использовании данных попарного сравнения уровня экспрессии микроРНК во фракции внеклеточных везикул было обнаружено существенно больше диагностических пар микроРНК (29), чем пар в плазме крови (9). Обнаружено, что пара miR-133/374 позволяет диагностировать наибольшее число больных РЛ — 82 %. В то же время панель микроРНК, состоящая из 3 пар (miR-133/374, miR-30/660, miR-125/660), позволяет диагностировать 100 % больных РЛ. Для увеличения диагностической чувствительности и устойчивости выявленная минимальная панель была дополнена еще тремя парами микроРНК (miR-31/125, miR-133/425, miR-133/222). В результате расширенная панель позволяет диагностировать каждого исследованного больного РЛ как минимум по 2 различным парам микроРНК (от 2 до 5 различных пар микроРНК).

Заключение. Таким образом, разработана диагностическая система на основе aberrантной экспрессии 8 микроРНК (входящих в состав 6 пар), позволяющая диагностировать больных РЛ со 100 % чувствительностью и специфичностью.

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАЦИОННОГО ПРОФИЛЯ ГЛИОМ В ЦЕЛЯХ ПОИСКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ПРОГНОСТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ОПУХОЛИ

В.О. Варачев¹, О.Ю. Сусова², А.А. Митрофанов²,
Ю.И. Амму³, Г.С. Краснов¹, А.Х. Бекашев², Т.В. Наседкина¹

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

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

³ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,
Москва
e-mail: varachevviacheslav95@mail.ru

Ключевые слова: глиобластома, секвенирование, мутация, первичная культура, транскриптом

Введение. Глиобластома является наиболее частой злокачественной опухолью головного мозга с медианой выживаемости около 15 мес. Согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (2021) диффузные глиомы взрослого типа, к которым относится глиобластома, подразделяются на подтипы в зависимости от наличия мутаций в генах *IDH1*, *TERT*, *EGFR*, *CDKN2A*. Однако выделяемые в рамках классификации подтипы глиом, в том числе глиобластома, представляют собой крайне гетерогенные группы. Поиск новых молекулярных маркеров — важная задача на пути совершенствования диагностических критериев и определения прогноза в развитии заболевания.

Цель исследования — изучение молекулярно-генетических особенностей глиом (глиобластомы) человека и поиск молекулярных маркеров для диагностики и прогноза.

Материалы и методы. В исследование были включены 45 пациентов (28 мужчин и 17 женщин) с опухолями мозга (глиома, глиобластома) в возрасте от 34 до 78 лет (средний возраст 56 лет) (замороженная ткань опухоли и образцы крови); первичные клеточные культуры ($n = 12$). Анализ мутационного профиля проводили с использованием NGS на приборе NextSeq500 (Illumina Inc., США), исследованы кодирующие участки 812 генов, ассоциированных с развитием рака. Для секвенирования транскриптома выделяли РНК из первичных клеточных культур глиобластом.

Результаты. При молекулярном профилировании глиобластом выявлены клинически значимые мутации и структурные перестройки генома. Наиболее часто в опухоли обнаруживали мутации *TERT* (28/45), *TP53* (16/45), *PTEN* (15/45) и *EGFR* (9/45). Также были представлены мутации в других генах сигнальных путей *RB1*, *mTOR*, *PIK3*, *MRE11*. Изменения числа копий участков хромосом (CNV) наиболее часто выявляли в хромосомах 10, 13, 15, 17 и 22. CNV в области гена *EGFR* (амплификация) представлена в 19 % опухолей. Проведено сравнение мутационного профиля образцов опухоли и клеточной культуры, полученной из ткани опухоли. Только в 5 клеточных линиях спектр мутаций совпадал с таковым в опухоли, при этом отмечена потеря гетерозиготности генов *PTEN* и *TP53*. Результаты исследования транскриптома в первичных культурах глиобластомы показали, что в клеточных линиях с мутантным геном *PTEN* повышена экспрессия гомеобоксных генов *HOXC9*, *HOXC6*, *HOXD10*, гена семафорина *SEMA3F*.

Закключение. Секвенирование образцов глиобластомы выявило широкий спектр мутаций в онкоассоциированных генах. Сравнительный анализ молекулярного профиля образцов опухоли и полученных первичных культур глиобластомы показал наличие внутриопухолевой гетерогенности. В клеточных культурах отмечено увеличение числа структурных перестроек и потеря гетерозиготности ключевых генов опухолевой пролиферации *PTEN*, *TP53*, *RB1*, *EGFR*. Анализ транскриптома опухолевых клеток позволяет исследовать корреляции наличия мутаций с профилем экспрессии генов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-15-00304).

ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ микроРНК В КОСТНОМ МОЗГЕ У ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ МИЕЛОИДНЫМ ЛЕЙКОЗОМ И SARS-CoV-2

Ю.А. Веряскина¹, С.Е. Титов², И.Б. Ковынев³, Т.И. Поспелова³

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

²АО «Вектор-Бест», Новосибирск;

³ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск
e-mail: microrna@inbox.ru

Ключевые слова: микроРНК, костный мозг, острый миелоидный лейкоз

Введение. Инфекция, вызываемая коронавирусом SARS-CoV-2, представляет собой опасное заболевание, которое может протекать как в форме острой респираторной вирусной инфекции легкого течения, так и в тяжелой форме. МикроРНК могут опосредовать внутриклеточный механизм защиты от РНК-вирусов, регулируя гены-мишени, связанные с иммунитетом и являющиеся компонентами сигнальных путей, участвующих в клеточном ответе, запуская вирусной инфекцией.

Цель исследования — обнаружение биомаркеров, которые потенциально могут быть использованы в качестве терапевтических мишеней.

Материалы и методы. В ходе стерильной пункции и аспирационной биопсии костного мозга получено 58 цитологических проб. Группы исследования составили пациенты с ОМЛ без вирусной инфекции (ОМЛ SARS-CoV-2 (–); $n = 50$) и пациенты с ОМЛ с подтвержденным SARS-CoV-2 (ОМЛ SARS-CoV-2 (+); $n = 8$). Уровни экспрессии микроРНК измеряли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Статистический анализ выполняли с использованием U-критерия Манна–Уитни.

Результаты. Сравнительный анализ уровней экспрессии микроРНК между образцами пациентов с ОМЛ SARS-CoV-2 (–) и ОМЛ SARS-CoV-2 (+) показал, что уровень экспрессии miR-26a снижен в 10 раз ($p < 0,05$), уровень экспрессии miR-128 — в 20 раз ($p < 0,05$), уровень экспрессии miR-451a — в 4 раза ($p < 0,05$), а уровень экспрессии let-7a повышен в 9 раз ($p < 0,05$) в образцах с подтвержденным SARS-CoV-2.

Закключение. В данной работе впервые разработан профиль экспрессии микроРНК в образцах костного мозга у пациентов с ОМЛ и наличием SARS-CoV-2.

ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК PROX1-AS1 И микроРНК miR-647 ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Е.А. Ветчинкина¹, И.В. Буре¹, Д.С. Михайленко^{1,2},
Е.Б. Кузнецова^{1,2}, А.И. Калинин^{1,2}, А.Э. Киселева¹,
Е.А. Алексеева¹, М.В. Немцова^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова», Москва
e-mail: katevetchinkina@ya.ru

Ключевые слова: некодирующая РНК, длинная некодирующая РНК, микроРНК, рак желудка, эпигенетика, биомаркер

Введение. Некодирующие РНК представляют класс эпигенетических регуляторов, влияющих на экспрессию генов в норме и при патологии, их нарушение может привести к злокачественной трансформации клетки.

Цель исследования — оценить экспрессию PROX1-AS1 и miR-647, вовлеченных в регуляцию эпигенетических механизмов при РЖ, и оценить их потенциал в качестве маркера клинического течения.

Материалы и методы. В исследование включены 80 парных образцов опухолевого материала РЖ и прилежащих морфологически нормальных тканей и 5 секционных образцов желудка без опухолевого поражения. Выделение тотальной РНК проводили с использованием Trizol (Life Technologies), кДНК получали методом обратной транскрипции с использованием набора MiScript II RT Kit (QIAGEN), уровень экспрессии PROX1-AS1 оценивали с помощью ПЦР в реальном времени и набора MiScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN). Статистический анализ выполняли с применением программы Statistica 13.1 и критериев Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты. Обнаружены достоверные различия экспрессии PROX1-AS1 в опухолевых ($p = 0,002$) и неопухолевых ($p < 0,001$) тканях, полученных от пациентов с РЖ, относительно секционных тканей желудка без патологии. С помощью корреляционного анализа Пирсона выявлена отрицательная корреляция между экспрессией PROX1-AS1 и miR-647 в опухолевых ($p < 0,001$) и неопухолевых ($p < 0,001$) тканях пациентов с РЖ. При сравнении экспрессии PROX1-AS1 в ткани опухоли в зависимости от распространенности первичной опухоли (Т) были выявлены статистически значимые различия ($p = 0,014$), в группе Т4 экспрессия PROX1-AS1 была достоверно выше, чем в Т1–3 ($p = 0,001$). При сравнении уровня экспрессии miR-647 в опухоли в зависимости от распространенности первичной опухоли выявлены статистически значимые различия ($p = 0,012$), экспрессия в группе Т4 достоверно ниже, чем в Т1–3 ($p = 0,011$). При сравнении других показателей (пола, 5-летней выживаемости, клинической стадии, классификации по Лорен, наличия или отсутствия перстневидных клеток и отдаленных метастазов) установить статистически значимых различий не удалось. Для экспрессии PROX1-AS1 и miR-647 в морфологически нормальных тканях пациентов с РЖ значимых ассоциаций при сравнении групп пациентов с различными клиническими характеристиками не получено.

Заключение. Полученные данные позволяют предположить потенциальную прогностическую значимость PROX1-AS1 и miR-647 при РЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-75-10117).

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ МЕТОДОМ НАНОПОРОВОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА ПРОМОТОРА ГЕНА *MGMT* ПРИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Т.Н. Гасанов¹, М.Г. Хренова¹, А.В. Сергеев¹, С.Ф. Дрозд²,
Г.В. Павлова², М.Э. Зверева¹

¹Кафедра химии природных соединений, химический факультет ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко»

Минздрава России, Москва

e-mail: mrtimurgasanov@gmail.com

Ключевые слова: молекулярная диагностика, глиомы, *MGMT*, метилирование, нанопоровое секвенирование

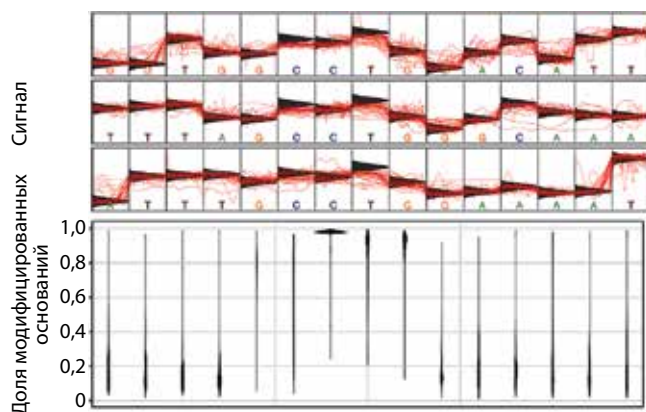
Введение. Оценка статуса метилирования промотора гена *O6*-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*MGMT*) важна при дифференциальной диагностике опухолевых заболеваний центральной нервной системы. В зависимости от статуса возможно применение различных подходов и персонализированных протоколов лечения. На настоящий момент кроме определения статуса метилирования *MGMT* необходимо оценивать мутационный статус *IDH1/IDH2* (Табачков Д.В., Катаргин А.Н., Строганова А.М. и др. Мутации изоцитратдегидрогеназ 1 и 2 и метилирование гена *MGMT* в глиомах. Успехи молекулярной онкологии 2017;4(1):53–9) и промотора гена *TERT* (Hasanau T., Pisarev E., Kisil O. et al. Detection of *TERT* promoter mutations as a prognostic biomarker in gliomas: methodology, prospects, and advances. Biomedicine 2022;10(3):728), что реализуется в 3 независимых тестах.

Цель исследования — проверить возможность использования нанопорового секвенирования для прямого определения метилирования ДНК: реализовать биоинформатический конвейер и подтвердить обнаружение метилирования в заранее известной позиции.

Материалы и методы. Исследовали модельные образцы: 1) геномную ДНК *Escherichia coli*, метилированную по известным сайтам CCGG; 2) *in vitro* синтезированный фрагмент последовательности *MGMT* в неметилированном и метилированном состояниях; 3) образцы ДНК плазмы крови пациентов с подтвержденным статусом метилирования *MGMT*; 4) C5-ДНК-метилтрансферазу M.SssI. Выполняли нанопоровое секвенирование.

Результаты. Были получены наборы данных на модельных образцах и собран биоинформатический конвейер для анализа данных. Использовали программу Tombo, разработанную компанией Oxford Nanopore, проводящую анализ первичного сигнала с прибора (в формате fast5) и определяющую, насколько сигнал

отличается от того, что ожидается обнаружить для данного основания. На рисунке приведен пример визуализации данных. Метилирование А по координатам 221 и 227 с такими весами: 221 0.9806 227 0.3111; А 231 без изменений. Незначительная степень метилирования наблюдается для всех остатков, что связано с зашумленностью данных. Кроме того, разрабатывается система *in vitro* метилирования фрагментов *MGMTp* C5-ДНК-метилтрансферазой M. SssI, узнающей участки CG.



Пример анализа исходных данных для определения метилированных оснований в последовательности, содержащей мотив, распознающийся метилтрансферазой

Проведена экспериментальная оценка количества внеклеточной свободной ДНК, выделяющейся из образцов плазмы крови, и теоретическая оценка количества образца, необходимого для выполнения нанопорового секвенирования.

Закключение. Метилирование ДНК можно определять с помощью метода нанопорового секвенирования. Данное направление актуально для развития молекулярной диагностики одномоментного определения статуса метилирования *MGMTp*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 075-15-2021-1343 «Развитие биоресурсной коллекции опухолей нервной системы человека с молекулярно-генетической паспортизацией для персонифицированного лечения пациентов с нейроонкологическими заболеваниями»).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА КАК ПРЕДИКТОРЫ РАЗВИТИЯ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У БОЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМ РАКОМ ЯИЧНИКА

А.Д. Гафиуллина¹, З.А. Афанасьева²

¹ГАОУ «Республиканский клинический онкологический диспансер Минздрава Республики Татарстан им. проф. М.З. Сигала», Казань;

²Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия

непрерывного профессионального образования»
Минздрава России, Казань
e-mail: gafiullina.aliya@mail.ru

Ключевые слова: эпителиальный рак яичника, химиорезистентность, аутофагия, апоптоз

Введение. РЯ является самой агрессивной гинекологической злокачественной опухолью, для которой характерны высокая смертность и однолетняя летальность. Поздняя диагностика, гетерогенность опухоли и развитие химиорезистентности способствуют этой статистике и влияют на выживаемость пациентов. Усилия по раннему выявлению и новым терапевтическим подходам к снижению смертности были в основном безуспешными, потому что происхождение и патогенез эпителиального РЯ недостаточно изучены. Были рассмотрены современные молекулярные механизмы аутофагии и апоптоза, участвующие в прогрессировании РЯ и формировании резистентности к противоопухолевой лекарственной терапии. Ранее некоторыми авторами было показано, что модуляция аутофагии и апоптоза может изменить эффективность проводимого лекарственного лечения эпителиального РЯ, что и сподвигло нас на проведение данного фундаментального исследования.

Цель исследования — определение роли аутофагии и апоптоза в клиническом течении РЯ.

Материалы и методы. Были исследованы белки-маркеры аутофагии и апоптоза Bcl-2, Beclin, Casp-3, LC-3b в опухолевой ткани пациенток с РЯ. В исследовании приняли участие 93 пациентки с опухолями яичника, получавших лечение в отделении онкогинекологии в период с октября 2018 г. по февраль 2021 г. Все пациентки были разделены на 4 группы: 1-я — с первичным РЯ ($n = 43$); 2-я — с РЯ после НХТ ($n = 36$); 3-я — с доброкачественными опухолями ($n = 8$); 4-я — группа контроля (здоровая ткань яичника; $n = 6$). Материал для работы забирали интраоперационно и доставляли в лабораторию. Методом исследования был выбран вестерн-блоттинг.

Результаты. Анализ полученных данных показал, что в общей когорте пациенток уровень экспрессии апоптотических и аутофагических белков в доброкачественных опухолях достоверно выше, чем в биопсийном материале РЯ. В здоровой ткани яичника выше уровень апоптотического белка Casp-3 и Bcl-2. При сравнении экспрессии маркеров апоптоза и аутофагии в группах с первичным раком и после лечения цитостатиками установлено достоверное снижение количества белка Bcl-2 и белков LC-3 по сравнению с доброкачественной опухолью. Выявлена тенденция увеличения коэффициента активности аутофагии у пациенток, получавших ХТ ($k = LC3-I/LC3-II$) (кпр. = 2,3; $kXT = 3,0$), по сравнению с когортой пациенток, не получавших неoadъювантное лечение.

Закключение. Необходимы дальнейшие исследования для определения роли белков аутофагии и апоптоза на большей когорте пациенток. В грядущую эру персонализированной медицины необходимы детальное

изучение механизмов, ответственных за чувствительность или резистентность опухолевых клеток к различным терапевтическим агентам, а также подбор наиболее эффективных комбинаций для достижения лучших результатов лечения карциномы яичника.

ГЕНОТИПЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАКУ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ КРАЙНЕГО СЕВЕРА

П.А. Гервас¹, А.Ю. Молоков¹, Д.Г. Тихонов²,
Н.В. Чердынцева¹

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

²медицинский институт ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», Якутск
e-mail: pgervas@yandex.ru

Ключевые слова: наследственные мутации, рак молочной железы, этносы России азиатского происхождения, якуты

Введение. РМЖ занимает лидирующие позиции по уровню заболеваемости во всем мире. Среди женщин Республики Саха (Якутия) РМЖ занимает 1-е место в структуре онкологической заболеваемости. Мутации генов (*BRCA1/2* и др.), характерные для наследственных форм РМЖ, у больных, проживающих в Республике Саха (якутов), не обнаружены.

Цель исследования — определить генотипы predisposition к РМЖ у коренного населения Республики Саха.

Материалы и методы. В исследование были включены 27 женщин, принадлежащих к якутской этнической группе, с диагнозом РМЖ в возрасте до 50 лет и/или с семейной историей рака. Геномная ДНК выделена из периферической крови, ДНК-библиотеки подготавливали с использованием набора Hereditary Cancer Solution™ (Sophia Genetics, Швейцария) для изучения статуса 27 генов (*ATM*, *APC*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *FAM175A*, *MLH1*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PIK3CA*, *PMS2*, *PMS2CL*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53* и *XRCC2*). Секвенирование (2 × 150 п. н.) проводили с использованием системы MiSeq (Illumina Inc., США).

Результаты. По результатам биоинформатического анализа данных NGS идентифицировано 194 варианта, из них 1 делеция со сдвигом рамки считывания (frameshift deletion), 2 инсерции без сдвига рамки считывания (nonframeshift insertion), 1 мутация, приводящая к стоп-кодону (stopgain), 61 несинонимичная (nonsynonymous SNV) и 37 синонимичных (synonymous SNV) замен и др. У 6 из 27 пациенток были обнаружены варианты, которые могут иметь клиническое значение в патогенезе РМЖ у пациенток Республики Саха. У 39-летней пациентки с РМЖ с семейной историей рака поджелудочной железы обнаружены 2 мутации, новая герминальная мутация гена *PALB2* со сдви-

гом рамки считывания (NM_024675: exon1: c.47delA: p.K16FS) и новая герминальная мутация гена *MUTYH* (NM_001350650: exon12: c.C817T: p.Q273X), приводящая к стоп-кодону (stopgain). Герминальная мутация гена *MUTYH*, согласно различным предикторным инструментам, оказывает повреждающее влияние на белок. Новая герминальная мутация гена *PALB2*, согласно программе NextGene2, расположена в сайте сплайсинга, где ранее была описана, вероятно, патогенная мутация (NM_024675.3: exon1: c.48+1delG), вовлеченная в патогенез наследственных форм РМЖ и РЯ. У 5 молодых пациенток обнаружена герминальная мутация конфликтного значения гена *MUTYH* (rs199840380: NM_001048171: exon10: c.C838T: p.R280C), которая ранее была нами описана у 4 тувинок с РМЖ в возрасте до 50 лет.

Заключение. Впервые у женщин, принадлежащих к якутской этнической группе, с диагнозом РМЖ обнаружены герминальные мутации генов *PALB2* и *MUTYH*, вероятно вовлеченных в патогенез РМЖ у жителей Саха (якутов).

ГЕРМИНАЛЬНЫЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *CHEK2* У ЛИЦ С ОТЯГОЩЕННЫМ СЕМЕЙНЫМ ОНКОЛОГИЧЕСКИМ ДИАГНОЗОМ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

М.А. Голотюк, А.А. Бережной

ГАОУ СО «Свердловский областной онкологический диспансер», Екатеринбург;

ГАОУ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

e-mail: 79041615797@ya.ru

Ключевые слова: наследственный рак, мутации в гене *CHEK2*, мутация 470T>C

Введение. Наследственные мутации в гене *CHEK2* вносят значимый вклад в predisposition к раку. На сегодняшний день частота встречаемости и спектр этих мутаций недостаточно изучены в российской популяции. Между тем, выявление носителей мутации *CHEK2* — немаловажная задача для профилактики онкологических заболеваний, а также для определения тактики лечения *CHEK2*-ассоциированных опухолей.

Цель исследования — выявить носителей герминальных мутаций в гене *CHEK2* среди лиц с отягощенным семейным онкологическим анамнезом; оценить частоту встречаемости и спектр мутаций в гене *CHEK2* на территории Свердловской области.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 229 жителей Свердловской области. Критерием включения было наличие родственников I–III степени родства с установленным диагнозом онкологического заболевания. Молекулярно-генетический анализ включал выделение ДНК из периферической крови и анализ методом ОТ-ПЦР с детекцией кривых плавления.

Панель исследования включала 4 мутации в гене *CHEK2*: с.470T>C (p.Ile157Thr), с.1100del (p.Thr367fs), с.444+1G>A, с.893_897del (p.Tyr298fs).

Результаты. Мутации в гене *CHEK2* обнаружены у 15 из 229 человек, таким образом, частота встречаемости составила 6,55 %. Спектр мутаций был следующим: 14 (93,3 %) мутаций с.470T>C, 1 (6,7 %) мутация с.444+1G>A. В 2 случаях мутация с.470T>C была обнаружена у лиц с мутацией с.5266dupC (5382insC) в гене *BRCA1*. Все носители мутаций, кроме одного, были женщины. Средний возраст лиц с мутациями *CHEK2* составил 43,5 года. По итогам анкетирования, 12 (80 %) носителей мутации отнесли себя к русской национальности, 3 (20 %) указали на татарское происхождение. В совокупности было отмечено 22 случая рака в семейной истории всех носителей дефектного гена *CHEK2*: чаще всего встречался РМЖ (17/22; 77,3 %), а также по 1 эпизоду (1/22; 4,54 %) опухолей кишечника, яичника, предстательной железы, гортани и лимфомы. Средний возраст постановки онкологического диагноза у родственников носителей мутации *CHEK2* составил 60,5 (38–84) года.

Заключение. Среди лиц сотягощенным семейным онкологическим анамнезом частота герминальных мутаций в гене *CHEK2* составила 6,55 %, при этом заметно превалирует (93,3 %) мутация с.470T>C (I157T), ранее упоминавшаяся в нескольких исследованиях в российской популяции. Как уже было доказано ранее, *CHEK2* — мультиорганный опухолевый ген, преимущественно ассоциированный с РМЖ. В нашем исследовании мы указываем на мультиорганный характер опухолей в семьях проанализированных носителей мутаций в гене *CHEK2*.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *BCL2L11/BIM* И *BAX* ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

М.С. Губенко¹, В.И. Логинов¹, А.М. Бурденный¹,
И.В. Пронина¹, Е.А. Филиппова¹, Э.А. Брага¹, С.С. Перцов²

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

²ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии

им. П.К. Анохина», Москва

e-mail: artz_marina@mail.ru

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, метилирование, экспрессия

Введение. НМРЛ составляет примерно 85 % всех случаев РЛ. Важную роль в патогенезе этого вида рака играет aberrантное метилирование CpG-островков промоторных областей в генах, ассоциированных с апоптозом, в том числе генов *BCL2L11/BIM* и *BAX*. Вопрос о роли метилирования их промоторных CpG-островков в регуляции активности этих генов и патогенезе НМРЛ до настоящего момента остается открытым.

Цель исследования — изучение изменений уровня экспрессии и метилирования генов *BCL2L11/BIM* и *BAX* при НМРЛ.

Материалы и методы. Образцы опухолей НМРЛ собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Анализ уровня метилирования проводили с применением количественной метилспецифичной ПЦР с детекцией в реальном времени. Анализ уровня экспрессии проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR-Green I. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрический критерий Манна–Уитни для независимых выборок.

Результаты. С применением ПЦР в реальном времени показано статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение уровня метилирования генов *BCL2L11/BIM* и *BAX* в образцах опухолей по сравнению с парной гистологически нормальной тканью легкого. Показано, что в исследованных первичных опухолях уровни метилирования этих генов статистически значимо ассоциированы с уровнями их экспрессии у больных НМРЛ. Нами впервые показано увеличение уровня метилирования гена *BAX* при одновременном снижении его экспрессии в образцах опухоли с наличием метастазов в лимфатические узлы по сравнению с образцами опухоли без таковых ($p = 0,033$, FDR = 0,05 и $p < 0,01$, FDR = 0,05 соответственно).

Заключение. Таким образом, обнаруженные нами новые закономерности представляют интерес для понимания механизмов развития НМРЛ, могут лечь в основу диагностики и прогноза течения этой болезни, а также помочь скорректировать ход лечения с учетом патофизиологических особенностей опухоли.

УРОВЕНЬ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫХ МИКРОРНК В СОСТАВЕ ЭКЗОСОМ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ОПУХОЛЯМИ ЯИЧНИКА КОРРЕЛИРУЕТ С УРОВНЕМ ЭТИХ МИКРОРНК В АСЦИТИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ

Е.И. Джугашвили¹, А.И. Яловая², Н.В. Юнусова³,
Л.А. Коломиец³, А.Е. Григорьева², И.В. Кондакова³,
С.Н. Тамкович²

¹ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», Новосибирск;

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

³НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: e.dzhugashvili@g.nsu.ru

Ключевые слова: экзосомы, микроРНК, кровь, асцит, рак яичника

Введение. Асцит является уникальным микроокружением опухоли. Не исключено, что плазменные

и асцитические экзосомы могут отражать этапы опухолевой прогрессии, коррелировать с ответом опухоли на терапию и общей выживаемостью, что делает их ценным и доступным источником для поиска предикторных и прогностических маркеров у больных РЯ.

Цель исследования — оценить уровень опухолеассоциированных микроРНК в экзосомах из плазмы крови и асцитической жидкости первичных больных диссеминированным РЯ стадии IIIb–IIIc для поиска перспективных биомаркеров жидкой биопсии.

Материалы и методы. Для исследования уровня микроРНК экзосомы из плазмы крови и асцитической жидкости больных РЯ ($n = 13$) и экзосомы из плазмы крови здоровых женщин ($n = 19$) выделяли методом ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием. Экзосомальную природу везикул подтверждали трансмиссионной электронной микроскопией и проточной цитофлуориметрией на латексных частицах с использованием антител против CD9, CD24, CD63 и CD81 (BD Biosciences, США). Перспективные микроРНК были проанализированы с помощью баз данных DIANA и STRING. Уровень микроРНК в составе экзосом оценивали после Gu/OcA выделения РНК на силикатных колонках (BioSilica, Россия) и проведения ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов БиоМастер HS-qPCR (2x) (BioLabiMix, Россия); полученные данные нормировали на уровень miR-16. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0. Данные проанализированы на соответствие выборки нормальному распределению с использованием критерия Шапиро–Уилка. Все данные выражены как медианы с межквартильным размахом. Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при значениях $p \leq 0,05$.

Результаты. Биоинформатическим анализом была установлена взаимосвязь между 8 генами, регулируемые микроРНК miR-16-5p, -101, -24-3p, а также было показано, что все 8 генов (*ADCY3*, *ADCY6*, *ADCY7*, *IGF1R*, *MAP2K1*, *MAPK1*, *MAPK3*, *PRKACA*) меняют экспрессию при РЯ. Это указывает на то, что данные микроРНК участвуют в канцерогенезе РЯ. Выявлено достоверное изменение уровней miR-24 и miR-101 в составе экзосом плазмы крови больных РЯ по сравнению со здоровыми женщинами (медиана –3,39 против –6,39; $p = 0,008$ и 8,83 против 7,57; $p = 0,008$ соответственно). Выявлена достоверная корреляция уровней опухолеассоциированных микроРНК miR-24 и miR-101 в плазме крови и асцитической жидкости больных РЯ (коэффициент Спирмена $R = 0,99$; $p < 0,01$ для обоих случаев).

Заключение. Выявленные достоверные различия в уровнях miR-24 и miR-101 в составе экзосом плазмы крови здоровых женщин и больных РЯ, а также корреляция уровня данных микроРНК в составе экзосом плазмы крови и асцитической жидкости больных РЯ указывают на возможность использования уровней

этих микроРНК в плазме крови в качестве дополнительных диагностических маркеров РЯ.

ТОКСИЧНОСТЬ ХИМИОТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ С ПОЛИМОРФИЗМАМИ ГЕНОВ *UGT1A1* И *DPYD*

А.Г. Догузова, А.А. Джеиранова, А.С. Чегодарь,
А.М. Данишевский, Л.А. Цапкова, К.А. Румянцев,
Н.А. Бодунова

ГБУЗ г. Москвы «Московский клинический
научно-практический центр им. А.С. Логинова ДЗМ», Москва
e-mail: AleksandraDoguzova@mail.ru

Ключевые слова: *UGT1A1*, *DPYD*, химиотерапия, генотип, токсичность

Введение. Токсичность ХТ остается одной из актуальных проблем в лечении ЗНО. Для проведения безопасной и эффективной терапии без развития тяжелых побочных эффектов необходим персонализированный подход, который предполагает подбор лекарственных препаратов иринотекан и капецитабин и их дозировки для каждого пациента. Реализация персонализированного подхода стала возможной благодаря анализу полиморфизмов в генах *UGT1A1* и *DPYD*, отвечающих за развитие токсичности при ХТ.

Цель исследования — оценить частоту токсических эффектов ХТ у больных со ЗНО с различными вариантами генов *UGT1A1* и *DPYD*.

Материалы и методы. В исследование был включен 31 пациент (14 мужчин и 17 женщин) со ЗНО молочной железы и толстой кишки, получавший лечение на базе Московского клинического научно-практического центра им. А.С. Логинова. Средний возраст пациентов составил 44,4 года. У 22 пациентов провели исследование гена *UGT1A1* методом ПЦР, у 9 участников — гена *DPYD* методом секвенирования по Сэнгеру. Токсичность оценивали по международной шкале токсичности NCI-CTCAE.

Результаты. Всего токсичность наблюдалась у 11 пациентов из выборки, у 70 % из них — гепатотоксичность, у 30 % — гематологическая токсичность. При исследовании *UGT1A1* генотип 6ТА/7ТА был выявлен у 20 (91 %) пациентов, генотип 7ТА/7ТА — у 2 (9 %). У пациентов с генотипом 6ТА/7ТА токсическое воздействие ХТ выявлено у 2 (10 % от всех с таким вариантом гена) пациентов, а среди пациентов с генотипом 7ТА/7ТА — у 1 (50 %). При исследовании гена *DPYD* у 2 из 9 пациентов выявлены варианты с.1601G>А и с.1905+1G. У пациентов с этими вариантами наблюдалась гепатотоксичность (100 %).

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что токсические эффекты ХТ связаны с вариантами генов *UGT1A1* и *DPYD*. Внедрение генетического анализа для онкологических пациентов, получающих ХТ, позволит снизить риски развития токсических эффектов и улучшить результаты лечения.

ДИАГНОСТИКА РАКА ЖЕЛУДКА ПУТЕМ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ НАНОВЕЗИКУЛ С ПОМОЩЬЮ AuNP-АПТАСЕНСОРА

Л.М. Забегина¹, М.А. Беляев², А.В. Малек¹

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

²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург
e-mail: lidiazabegina@gmail.com

Ключевые слова: внеклеточные нановезикулы, рак желудка, аптамеры

Введение. РЖ является одним из наиболее распространенных онкологических заболеваний. Ежегодно в мире регистрируют около миллиона новых случаев РЖ. Заболевание отличается агрессивным течением и высоким уровнем смертности. Для ранних стадий РЖ характерны невыраженные клинические проявления и отсутствие специфических симптомов, более чем в 70 % случаев РЖ выявляют уже на III–IV стадиях. Своевременная диагностика является важным фактором, влияющим на успешность лечения РЖ, что определяет необходимость разработки новых диагностических подходов. Известно, что клетки РЖ секретируют внеклеточные нановезикулы (РЖ-ВНВ), мембрана которых имеет сходный профиль поверхностных белковых маркеров. Лигандами для детекции таких маркеров могут служить антитела или ДНК-аптамеры. Сенсоры на основе наночастиц золота и аптамеров (AuNP-аптасенсор) могут обеспечить высокую чувствительность анализа.

Цель исследования — разработка и валидация метода диагностики РЖ, основанного на анализе внеклеточных нановезикул (ВНВ) плазмы с помощью AuNP-аптасенсора.

Материалы и методы. В качестве материала использовали образцы плазмы пациентов с доказанным гистологически и инструментально РЖ ($n = 14$) и здоровых доноров ($n = 16$). Тотальную популяцию нановезикул выделяли методом двухфазной полимерной системы. Размер и концентрацию полученных везикул оценивали методом анализа траекторий наночастиц. Последующий анализ тотальной популяции нановезикул проводили с использованием аптасенсора из золотых наночастиц (AuNP) и ДНК-аптамера (CGA CCC GGC ACA AAC CCA GAA CCA TAT ACA CGA TCA TTA GTC TCC TGG GCC G), в качестве контроля применяли аптамер, аффинно взаимодействующий с везикулярным маркером CD63. Пространственная структура аптамера обеспечивала его аффинное взаимодействие с элементами мембраны клеток РЖ и предположительно с ВНВ, секретируемыми этими клетками.

Результаты. Размер выделенных нановезикул находился в диапазоне от 60 до 90 нм, концентрация —

от $2,16 \times 10^{11}$ до $3,88 \times 10^{11}$. AuNP-аптасенсор на основе аптамера-CD63 показывал сопоставимые результаты количественной оценки ВНВ пациентов и доноров. При использовании аптамера, структура которого обеспечивала его взаимодействие с поверхностными маркерами клеток РЖ и предположительно РЖ-ВНВ, результаты анализа образцов сравниваемых групп (РЖ vs. доноры) различались статистически значимо ($p < 0,05$).

Заключение

1. В плазме пациентов с РЖ циркулируют ВНВ, поверхностная мембрана которых содержит маркеры, характерные для клеток РЖ (РЖ-ВНВ).

2. Количественная оценка РЖ-ВНВ может быть проведена с помощью AuNP-аптасенсора.

3. Разработанная технология может быть основой нового метода диагностики РЖ.

ИССЛЕДОВАНИЕ МАРКЕРОВ Ki-67 И FasR, А ТАКЖЕ МУТАЦИИ BRAFV600E В ПРАКТИКЕ ПРЕДОПЕРАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИКИ УЗЛОВЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.В. Зима, П.Е. Максимова, Е.П. Голубинская, Т.П. Макашиш, Е.Ю. Зяблицкая, Е.А. Непритимова, О.Ф. Безруков

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь
e-mail: evgu79@mail.ru

Ключевые слова: щитовидная железа, молекулярная диагностика, иммуногистохимия, цитология, мутации, онкология

Цель исследования — изучить возможность определения маркеров клеточного цикла Ki-67 и FasR, а также мутации BRAFV600E в практике предоперационной диагностики узловых образований щитовидной железы, создать диагностический алгоритм и оценить его эффективность в ретроспективном анализе.

Материалы и методы. Исследование проведено в 3 этапа.

1. Отработан протокол иммуноцитохимии на материале тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАПБ): изготовление клеточного блока (cell-block) и постановка ИГХ-реакции с Ki-67 и FasR, анализ мутации BRAFV600E методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени по протоколам производителей (гистологическая техника и антитела Leica, США; ПЦР «Тест-BRAF-ткань», ТестГен, Россия; LightCycler 96, Roche, Швейцария).

2. Обследован 61 пациент в последовательном протоколе (ультразвуковое исследование + ТАПБ → цитология мазков → операция → гистология + ИГХ + иммуноцитохимия + cell-block) для проверки гипотезы о возможности использования маркеров клеточного цикла и расчета индекса ИГХ, верифицируемой

на послеоперационном этапе, создания диагностического алгоритма.

3. Внедрение алгоритма в практику и ретроспективный анализ на протяжении 3,5 года в период до предложения алгоритма, его разработки и внедрения. Выполнено 1244 исследования, 828 ТАПБ и 416 оперативных вмешательств на щитовидной железе.

Результаты. Индекс злокачественности Z , рассчитываемый по формуле $Z = \text{Fas-R}/(\text{Ki-67} + 1)$, где Fas-R и Ki-67 – уровни экспрессии маркеров, показал свою эффективность. При индексе $Z < 1,1$ и отсутствии мутации *BRAF* судят о низком риске злокачественного роста. При $Z > 2,8$ и/или наличии мутации делают заключение о высоком риске.

Ретроспективный анализ показал, что при внедрении алгоритма в практику растет процент узловых образований, требующих оперативного вмешательства по причине подозрения на атипию, или с достоверными признаками рака (III–VI категории по Bethesda) от 8,8 до 14,1–16,6 %, что по χ^2 -критерию делает вероятность ошибки не более 0,0003. Также значимо растет число выявленных микрокарцином.

Заключение. Способ обеспечивает повышение точности дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы на предоперационном этапе и позволяет выбрать адекватный метод лечения в алгоритме ведения пациентов.

УРОВНИ TGF- β 1, OPN И ABCG2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОК С ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ КОРРЕЛЯЦИИ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ОПУХОЛИ

Е.Ю. Зубарева¹, М.А. Сеньчукова², Е.В. Вирич¹,
О.В. Шидловская¹, Д.Н. Филатова¹, Л.Р. Давлетьярова¹,
М.А. Осипова¹

¹ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер», Оренбург;

²ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург
e-mail: tishkova_evgeniy@mail.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, остеопонтин, трансформирующий фактор роста β 1, АТФ-связывающие кассетные транспортеры семейства ABC

Введение. Связь маркеров ЭМП с клинико-морфологическими характеристиками РМЖ изучена недостаточно, а полученные данные противоречивы.

Цель исследования – оценить корреляции уровней TGF- β 1, OPN и ABCG2 в сыворотке крови с клинико-морфологическими характеристиками РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены 168 пациенток с впервые выявленным инвазивным РМЖ. Уровни TGF- β 1, OPN и ABCG2 в сыворотке крови исследовали с помощью ИФА. Для стратифи-

кации уровней маркеров на высокие и низкие использовали 65 перцентиль. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 12.

Результаты. Установлено, что повышенный уровень TGF- β 1 (400 пг/мл и выше) достоверно чаще встречался при отсутствии перинеуральной инвазии (в 56,4 и 33,3 % случаев при ее отсутствии и наличии соответственно; $p = 0,008$), а также при HER2-позитивном и люминальном А молекулярно-биологических подтипах РМЖ (в 75; 37,9; 48,2; 100 и 40,9 % случаев при люминальном А, люминальном В HER2-негативном, люминальном В HER2-позитивном, HER2-позитивном и трижды негативном РМЖ соответственно; $p = 0,0001$). В то же время низкий уровень TGF- β 1 достоверно чаще встречался при IV стадии РМЖ (в 43,1; 57,7 и 81,9 % случаев при I–IIa, IIb – IIc и IV стадиях РМЖ соответственно; $p = 0,02$).

Повышенный уровень OPN (4,2 нг/мл и выше) достоверно чаще встречался при HER2-позитивном статусе РМЖ (в 77,8 и 27,5 % случаев при HER2-позитивном и HER2-негативном статусе РМЖ соответственно; $p = 0,00009$) и значимо чаще у пациенток старше 55 лет (в 0, 30,7 и 44,6 % случаев у пациенток моложе 35 лет, 35–55 лет и старше 55 лет соответственно; $p = 0,07$). При высоком уровне OPN в сыворотке крови индекс Ki-67 был достоверно выше ($42,7 \pm 27,7$ и $58,7 \pm 27,2$ % при низком и высоком уровне OPN соответственно; $p = 0,008$).

Повышенный уровень ABCG2 (1,2 пг/мл и выше) значимо чаще наблюдался при дольковом РМЖ (в 72,7; 34,7 и 50 % случаев при дольковом, протоковом и прочих гистологических типах РМЖ соответственно; $p = 0,054$) и при наличии микрокальцинатов на маммограммах (в 58,8 и 35,8 % случаев при их наличии и отсутствии соответственно; $p = 0,08$). При высоком уровне ABCG2 индекс Ki-67 опухоли был достоверно ниже ($54,6 \pm 27,3$ и $41 \pm 29,1$ % при низком и высоком уровне ABCG2 соответственно; $p = 0,02$).

Заключение. Изучение предиктивной и прогностической значимости сывороточных уровней TGF- β 1, OPN и ABCG2 является перспективным направлением дальнейших исследований.

ВЫРАЖЕННОСТЬ ЭКСПРЕССИИ HIF-1 α , Snail и PD-L1 В ТКАНИ ОПУХОЛИ У ПАЦИЕНТОК С ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ КОРРЕЛЯЦИИ С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ОПУХОЛИ

Е.Ю. Зубарева¹, М.А. Сеньчукова², Н.В. Зайцев¹,
О.В. Шидловская¹, Д.Н. Филатова¹, Л.Р. Давлетьярова¹,
М.А. Осипова¹, М.Р. Зубарев¹

¹ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер», Оренбург;

²ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург
e-mail: tishkova_evgeniy@mail.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, эпителиально-мезенхимальный переход, иммунологическая толерантность, тканевая гипоксия

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

Цель исследования — оценить корреляции выраженности экспрессии HIF-1 α , Snail и PD-L1 в ткани опухоли с клинико-морфологическими характеристиками опухоли у пациенток с инвазивным РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены 100 пациенток с впервые выявленным инвазивным РМЖ. Выраженность экспрессии HIF-1 α , Snail и PD-L1 в ткани опухоли оценивали ИГХ-методом. Коэффициент экспрессии маркеров вычисляли в 5 полях как отношение: доля клеток без экспрессии $\times$ 1 + доля клеток со слабой экспрессией $\times$ 2 + доля клеток с выраженной экспрессией $\times$ 3/5. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 12.

Результаты. Анализ показал, что коэффициент экспрессии HIF-1 α в паренхиме опухоли был достоверно выше при метастатическом РМЖ ($p = 0,02$), N3 ($p = 0,01$), низкой степени злокачественности опухоли ($p = 0,04$), наличии периневральной инвазии ($p = 0,02$), низком уровне экспрессии рецепторов к прогестерону ($p = 0,008$) и люминальном А подтипе РМЖ ($p = 0,04$).

В свою очередь, коэффициент экспрессии Snail в паренхиме опухоли был достоверно выше при наличии отдаленных метастазов ($p = 0,02$), отсутствии лимфоваскулярной инвазии ($p = 0,05$), низком уровне экспрессии прогестерона ($p = 0,03$), люминальном А и HER2-позитивном подтипах РМЖ ($p = 0,03$). Коэффициент экспрессии Snail в строме был достоверно выше при диффузной форме РМЖ ($p = 0,011$), наличии отдаленных метастазов ($p = 0,006$), T4 ($p = 0,03$), наличии периневральной инвазии ($p = 0,005$) и HER2-позитивном подтипе РМЖ ($p = 0,004$).

Что касается коэффициента экспрессии PD-L1 в паренхиме, то он был достоверно выше при метастатическом РМЖ ($p = 0,0004$), N2 и N3 ($p = 0,0002$), наличии периневральной инвазии ($p = 0,0004$). Коэффициент экспрессии PD-L1 в строме был достоверно выше при наличии отдаленных метастазов ($p = 0,04$), дольковом РМЖ ($p = 0,01$), наличии внутрипротокового компонента ($p = 0,002$), лимфоваскулярной ($p = 0,04$) и периневральной ($p = 0,00005$) инвазии и HER2-негативном статусе РМЖ ($p = 0,007$).

В ряде случаев отмечено наличие ядерной экспрессии PD-L1 в стромальных клетках, которая встречалась достоверно чаще при диффузной форме РМЖ ($p = 0,003$), метастатическом РМЖ ($p = 0,00000$), T3 и T4 ($p = 0,002$), N3 ($p = 0,005$), низком уровне экспрессии прогестерона ($p = 0,007$), HER2-позитивном статусе РМЖ ($p = 0,014$).

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что высокие уровни экспрессии HIF-1 α и PD-L1 связаны с неблагоприятными факторами прогноза РМЖ. Для установления прогностической значимости выраженности экспрессии Snail в ткани опухоли необходимы дальнейшие исследования.

ОЦЕНКА ПРЕДИКТИВНОЙ ЗНАЧИМОСТИ ЭКСПРЕССИИ Snail, PD-L1 И HIF-1 α В ТКАНИ ОПУХОЛИ У ПАЦИЕНТОК С ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.Ю. Зубарева¹, М.А. Сеньчукова², Н.В. Зайцев¹,
О.В. Шидловская¹, Д.Н. Филатова¹, Л.Р. Давлетьярова¹,
М.А. Осипова¹, М.Р. Зубарев¹

¹ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер», Оренбург;

²ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург
e-mail: tishkova_evgeniy@mail.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, эпителиально-мезенхимальный переход, иммунологическая толерантность, тканевая гипоксия, предиктор ответа на неоадьювантную химиотерапию

Введение. В настоящее время продолжает оставаться актуальным поиск предиктивных маркеров при РМЖ.

Цель исследования — оценить предиктивную значимость выраженности экспрессии Snail, PD-L1 и HIF-1 α в ткани опухоли у пациенток с инвазивным РМЖ.

Материалы и методы. В проспективное исследование были включены 100 пациенток с впервые выявленным инвазивным РМЖ, получивших 6–8 курсов НХТ. Выраженность экспрессии Snail, PD-L1 и HIF-1 α паренхимы и стромы опухоли оценивали ИГХ-методом в образцах, полученных при трепанобиопсии до начала лечения. Коэффициент экспрессии маркеров вычисляли в 5 полях как отношение: доля клеток без экспрессии $\times$ 1 + доля клеток со слабой экспрессией $\times$ 2 + доля клеток с выраженной экспрессией $\times$ 3/5. ROC-анализ

использовали для определения оптимальной точки отсечения значений маркеров, дискриминирующей случаи с низкой и высокой чувствительностью опухоли к НХТ (с I–II и III–IV степенью лечебного патоморфоза соответственно). Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 12.

Результаты. Согласно полученным данным лечебный патоморфоз опухоли положительно коррелировал с выраженностью экспрессии Snail в паренхиме ($p = 0,0006$) и строме ($p = 0,001$) опухоли и отрицательно — с выраженностью экспрессии PD-L1 в паренхиме ($p = 0,000001$) и строме ($p = 0,0000001$) опухоли. Лечебный патоморфоз III–IV степени достоверно чаще встречался при высоком коэффициенте экспрессии Snail в паренхиме (в 68,8 и 32,4 % случаев при высоком и низком коэффициенте соответственно; $p = 0,0006$) и строме (в 64,3 и 36,1 % случаев при высоком и низком коэффициенте соответственно; $p = 0,01$) опухоли, при низком коэффициенте экспрессии PD-L1 в паренхиме (в 75,0 и 23,3 % случаев при низком и высоком коэффициенте соответственно; $p = 0,000001$) и строме (в 85,4 и 15,3 % случаев при низком и высоком коэффициенте соответственно; $p = 0,000001$) опухоли. Достоверных корреляций лечебного патоморфоза опухоли с выраженностью экспрессии HIF-1 α в ткани опухоли не установлено.

В зависимости от выраженности экспрессии маркеров случаи РМЖ были разделены на 4 группы: Snail высокий и PD-L1 высокий; Snail высокий и PD-L1 низкий; Snail низкий и PD-L1 высокий; Snail низкий и PD-L1 низкий. Соответственно в этих группах химиорезистентный РМЖ встречался в 36,8; 23,1; 95,1 и 25,9 % случаев ($p < 0,0001$). На основании полученных данных разработан способ прогнозирования химиорезистентного РМЖ. Чувствительность метода составляет 69,6 %, специфичность — 95,1 % и точность — 81,0 %.

Заключение. Выраженность экспрессии PD-L1 и Snail в ткани опухоли при РМЖ может быть использована как перспективный предиктивный маркер ответа опухоли на НХТ.

РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ микроРНК В ПАТОГЕНЕЗЕ МЕТАСТАТИЧЕСКОГО ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА

Н.А. Иванова¹, А.М. Бурденный¹, В.И. Логинов¹,
А.В. Карпунин², Э.А. Брага¹

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

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр
им. акад. Н.П. Бочкова», Москва
e-mail: nata-i@list.ru

Ключевые слова: метилирование, микроРНК, метастаз, почечно-клеточный рак

Введение. Светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР) характеризуется высокой летальностью

(около 90 %). Большинство случаев скПКР диагностируется случайно, например при проведении ультразвукового исследования по другим показаниям. Как следствие, до 30 % случаев скПКР диагностируется на поздних стадиях. Еще у ~30 % пациентов развивается метастатический скПКР в течение нескольких лет после постановки диагноза. Как известно, метастатическая активность клеток опухоли в основном определяется генами, в которых накапливаются изменения уровня их метилирования, в том числе в генах микроРНК.

Цель исследования — изучение роли метилирования 9 генов микроРНК, анализ ассоциации этих генов с прогрессией и метастазированием при скПКР.

Материалы и методы. Образцы опухолей скПКР собраны и клинически охарактеризованы в НИИ клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Анализ уровня метилирования проводили с применением количественной метилспецифичной ПЦР с детекцией в реальном времени. Для оценки значимости различий между исследуемыми группами применяли непараметрический критерий Манна–Уитни для независимых выборок.

Результаты. Показано статистически значимое ($p < 0,05$) повышение уровня метилирования 5 генов микроРНК (miR-125B1, miR-193A, miR-375, miR-34B/C и miR-137) в образцах ДНК опухоли относительно парных образцов гистологически неизмененной ткани. Для этих же генов показана ассоциация уровня метилирования с размером опухоли, низким уровнем дифференцировки опухоли и наличием метастазов в регионарных лимфатических узлах и/или отдаленных органах. Следует отметить, что для miR-203A отмечена обратная картина, а именно статистически значимое ($p < 0,05$) снижение уровня метилирования в G3/4.

Заключение. Таким образом, сопоставление результатов по метилированию 9 генов микроРНК с клинико-гистологическими характеристиками исследованных образцов скПКР позволило определить 6 генов микроРНК, метилирование которых возможно связано с прогрессированием метастатического скПКР: miR-125B1, miR-193A, miR-375, miR-34B/C, miR-137, miR-203A.

*Работа выполнена при поддержке
в рамках государственного задания
(№ FGFU-2022-0007) Минобрнауки России учреждению
ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии».*

СОДЕРЖАНИЕ ФАСЦИНА 1 В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ И КЛЕТКАХ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ У ПАЦИЕНТОВ С ПЛОСКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ГОЛОВЫ И ШЕИ

Г.В. Какурина^{1,2}, Е.Е. Середа^{1,2}, М.Н. Стахеева¹,
Л.А. Таширева¹, В.В. Великая¹, Е.А. Тихонович²,
Е.Ю. Дымова², О.В. Черемисина¹, И.В. Кондакова¹,
Е.Л. Чойнзонов¹

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

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Томск
e-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru

Ключевые слова: плоскоклеточный рак головы и шеи, метастазирование, прогноз, фасцин 1, циркулирующие опухолевые клетки, микроокружение опухоли

Введение. Изучение биологии ПРГШ необходимо для поиска маркеров прогрессии этой высокоагрессивной опухоли. Агрессивность ПРГШ связана с высоким метастатическим потенциалом. Актинсвязывающий белок фасцин 1 (FSCN1) участвует в процессах клеточной пролиферации, адгезии и подвижности опухолевых клеток. Значение FSCN1 в канцерогенезе при ПРГШ мало изучено.

Цель исследования — изучить вклад FSCN1 в прогрессирование ПРГШ путем оценки его уровня в сыворотке крови, количества FSCN1-содержащих (FSCN1⁺) ЦОК, опухолевых клеток и клеток микроокружения опухоли; провести оценку использования изучаемых показателей в качестве маркеров метастазирования при ПРГШ.

Материалы и методы. Все биологические образцы от 33 больных ПРГШ (T1–4N0–2M0) были взяты перед началом противоопухолевой терапии. Контролем служила сыворотка крови 11 здоровых добровольцев. Уровень FSCN1 в сыворотке крови определяли с помощью ИФА-набора. Количество FSCN1⁺ ЦОК (CD326⁺) и лейкоцитов оценивали методом проточной цитометрии в цельной крови. Количество FSCN1⁺-клеток опухоли оценивали методом TSA-модифицированного иммунофлуоресцентного окрашивания (TSA — tyramide signal amplification). Для статистического анализа использовали IBM SPSS Statistics 22.0.

Результаты. В сыворотке крови у больных ПРГШ уровень FSCN1 был значительно выше, чем в контрольной группе ($p = 0,05$). Относительное количество FSCN1⁺ ЦОК было в 3 раза выше, чем количество FSCN1⁺-лейкоцитов ($p = 0,05$). В ткани первичной опухоли количество FSCN1⁺-опухолевых клеток было выше, чем других клеток опухоли (опухолеассоциированных В-лимфоцитов, макрофагов и фибробластов), содержащих этот белок ($p = 0,05$). Между количеством FSCN1⁺ ЦОК крови и FSCN1⁺-опухолевых клеток в ткани обнаружена тесная связь ($r = 0,9$; $p = 0,02$).

При метастазировании уровень циркулирующего в крови FSCN1 увеличивался в 10 раз по сравнению с таковым в группе больных ПРГШ без метастазов. Сывороточный уровень FSCN1 более 2,7 нг/мл до лечения был связан с высоким риском прогрессирования ПРГШ в течение 12 мес после противоопухолевого лечения (log-rank test $p = 0,04$). ROC-анализ определил, что FSCN1 является удовлетворительным предиктором прогрессии у больных ПРГШ с чувствительностью 71 %, специфичностью 80 %, площадью под ROC-кривой (AUC) 0,8 (95 % ДИ 0,64–0,95).

Заключение. Впервые дана комплексная оценка содержания FSCN1 в различных биологических образцах пациентов с ПРГШ: в ЦОК, опухолевых клетках, опухолеассоциированных В-лимфоцитах, макрофагах и фибробластах. Показано, что FSCN1 участвует в прогрессировании ПРГШ: количество циркулирующих и тканевых опухолевых клеток, содержащих FSCN1, было выше, чем лейкоцитов и клеток микроокружения опухоли, содержащих этот белок. Исследование FSCN1 в циркуляции можно рекомендовать для определения риска прогрессирования (развитие лимфогенных метастазов) в течение 12 мес после противоопухолевого лечения у больных ПРГШ.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ PD-1 И PD-L1 НА M1- И M2-МАКРОФАГАХ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.Ю. Калинчук, Л.А. Таширева, О.И. Ковалев,
В.М. Перельмутер

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: annakalinchuk2022@gmail.com

Ключевые слова: рак молочной железы, M1-макрофаги, M2-макрофаги, PD-L1, PD-1

Введение. Известно, что макрофаги в микроокружении РМЖ способны экспрессировать белок PD-1 и его лиганд PD-L1, что может определять исход заболевания, а также ответ опухоли на лечение, в частности на иммунотерапию. Однако неизученными остаются особенности экспрессии PD-1 и PD-L1 в зависимости от фенотипа M1 или M2, ассоциированных с противо- и проопухолевым ответом соответственно.

Цель исследования — изучение особенностей экспрессии PD-1 и PD-L1 на M1- и M2-макрофагах у больных РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены 19 пациентов с гистологически верифицированным диагнозом инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа (T1–3N0–1M0). Возраст пациентов составил от 43 до 78 лет. С помощью семицветной мультиплексной TSA-модифицированной ИГХ (TSA — tyramide signal amplification) в микроокружении опухоли были идентифицированы M1-макрофаги (CD68⁺CD163⁺CD3⁺CKAE1/3⁺) и M2-макрофаги (CD68⁺CD163⁺CD3⁺CKAE1/3⁺), а также оценена

экспрессия на них PD-1 и PD-L1. Статистическую обработку проводили в программах Statistica 12 (StatSoft, США) и Prism 8.0.1 (GraphPad, США).

Результаты. У всех пациентов в строме опухоли были обнаружены как M1-, так и M2-макрофаги. Макрофаги с экспрессией PD-1 или PD-L1 также встречались у всех пациентов. Однако в количественном выражении макрофагальный состав микроокружения РМЖ различен по экспрессии PD-1 и PD-L1. Так, экспрессия этих белков более свойственна M1-макрофагам по сравнению с M2. Экспрессия PD-1 и/или PD-L1 обнаруживалась у 48,1 (33,6–63,4) % M1-макрофагов и лишь у 19,8 (13,3–27,2) % M2-макрофагов ($p < 0,0001$).

Заключение. Для РМЖ характерно фенотипическое разнообразие макрофагов внутри одной опухоли, а также между пациентами. Экспрессия PD-1 и PD-L1 более присуща M1-макрофагам.

ВОЗМОЖНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОЧАГОВЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПУТЕМ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ микроРНК

М.С. Князева, А.В. Шалаев, А.В. Малек

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»

Минздрава России, Санкт-Петербург

e-mail: margo9793@gmail.com

Ключевые слова: микроРНК, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, поджелудочная железа

Введение. МикроРНК — короткие регуляторные молекулы, контролирующие стабильность белоккодирующих РНК и эффективность белкового синтеза. Развитие злокачественных образований поджелудочной железы сопровождается специфическими изменениями профиля внутриклеточных молекул микроРНК. Поиск маркерных молекул и разработка методов их количественного анализа в материале биопсий очаговых образований поджелудочной железы могут сформировать основу для создания инновационного метода дифференциальной диагностики.

Цель исследования — оценка молекулярного профиля микроРНК в клетках поджелудочной железы, идентификация потенциально маркерных молекул.

Материалы и методы. В исследование были включены биопсийные образцы ткани очаговых образований поджелудочной железы (FFPE) с гистологическим заключением: хронический панкреатит ($n = 23$), внутриэпителиальная неоплазия легкой (PanIN-1/2) ($n = 19$) и тяжелой (PanIN-3) ($n = 8$) степеней, протоковая карцинома ($n = 26$). Для каждого образца были получены срезы и выделена тотальная РНК. Дизайн исследования включал широкий профайлинг пулов образцов одного гистологического типа, анализ данных и выбор потенциально маркерных микроРНК, анализ выбран-

ных молекул микроРНК в коллекции образцов, поиск статистически значимых различий и оценку показателей диагностической значимости отдельных молекул. В качестве метода анализа использовали двухфланговую обратную транскрипцию с последующей количественной ПЦР в режиме реального времени, нормализацию данных выполняли относительно микроРНК miR-200a.

Результаты. Уровень экспрессии молекул miR-216a и miR-217 снижается в ряду PanIN-1/2 > PanIN-3 > протоковая карцинома поджелудочной железы. Также в клетках протоковой карциномы поджелудочной железы повышена экспрессия miR-375 и снижена экспрессия miR-143 по сравнению с хроническим панкреатитом.

Заключение. Оценка экспрессии молекул miR-216a, -217, -143 и -375 в материале биопсий очаговых образований поджелудочной железы имеет диагностический потенциал, который требует валидации с использованием большой коллекции биологических образцов.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ЦЕРВИКАЛЬНЫХ ИНТРАЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ НЕОПЛАЗИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВИРУСОМ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА

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

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск

e-mail: pkovchur@mail.ru

Ключевые слова: предрак шейки матки, вирус папилломы человека, лазерная и радиоволновая хирургия

Введение. Молекулярная дифференциальная диагностика цервикальной интраэпителиальной неоплазии (ЦИН) для современного гинеколога является задачей, решение которой будет способствовать точному выбору тактики лечения пациенток с сохранением репродуктивной функции и вторичной профилактике РШМ.

Цель исследования — предложить способ дифференциальной диагностики ЦИН I–III степеней и оценить результаты проведенного комплексного лечения.

Материалы и методы. Проведено иммунологическое обследование 126 женщин: 1-я группа ($n = 96$) — с ЦИН I–III степеней со 100 % ДНК вируса папилломы человека; 2-я группа ($n = 30$) — контрольная. Оценивали экспрессию маркеров PD-1, TIM3 и LAG3 в общей популяции CD3⁺CD8⁺-Т-лимфоцитов, характеризующих дисфункциональные Т-клетки, появляющиеся в крови при развитии ЦИН. Исследования выполнены на проточном цитометре MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Германия). Результаты выражали в процентах, характеризующих наличие в крови клеток, типизируемых по маркерам PD-1 и TIM3 либо PD-1 и LAG3 в общей популяции CD3⁺CD4⁺-Т-лимфоцитов.

Результаты. Зарегистрированы достоверные различия в иммунологических показателях у пациенток с ЦИН I–III степеней, что дает возможность использовать данные показатели в дифференциальной диагностике ЦИН. Сопоставление результатов гистологического исследования и уровня экспрессии маркеров PD-1, TIM3 и LAG3 в общей популяции CD3⁺CD4⁺-Т-лимфоцитов показало, что в ЦИН I степени количество клеток с фенотипами CD3⁺CD4⁺PD-1⁺TIM3⁺ и CD3⁺CD4⁺PD-1⁺LAG3⁺ в каждом из вариантов не превышает 2 % от общей популяции CD3⁺CD4⁺-Т-лимфоцитов. Количество клеток с фенотипами CD3⁺CD4⁺PD-1⁺TIM3⁺ и CD3⁺CD4⁺PD-1⁺LAG3⁺ в каждом из вариантов при ЦИН II степени составляло 2–5 % от общей популяции CD3⁺CD4⁺-Т-лимфоцитов, в то время как при ЦИН III степени количество таких клеток в каждом из указанных случаев было более 5 %. Для всех пациенток ($n = 96$) выбраны различные методы лечения: активное наблюдение при ЦИН I степени, лазерное лечение отечественными хирургическими аппаратами «Ланцет-2», «Аллод-01» по стандартной методике, хирургическое лечение радиоволновым генератором «Фотек ЕА 141».

Заключение. Предложен способ дифференциальной диагностики ЦИН шейки матки I–III степеней, что способствует точному выбору тактики лечения пациенток с сохранением репродуктивной функции.

НЕОДНОРОДНОСТЬ ИММУНОАССОЦИИРОВАННОГО ФЕНОТИПА РАКА ШЕЙКИ МАТКИ РАННИХ СТАДИЙ

О.В. Курмышкина¹, П.И. Ковчур¹, П.В. Добрынин², Т.О. Волкова¹

¹ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург
e-mail: olya.kurmyshkina@yandex.ru

Ключевые слова: рак шейки матки, иммунное микроокружение, транскриптом, сигнальный путь

Введение. Проблема иммунной гетерогенности как составляющей внутриопухолевой гетерогенности и существования разных иммуноассоциированных фенотипов вирус-ассоциированного РШМ остается недостаточно изученной. Также неизвестно, на каком этапе может происходить формирование многообразия иммунных профилей РШМ и какие механизмы обеспечивают ускользание от иммунного надзора при переходе от цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН) к инвазивному РШМ.

Цель исследования — выявление профилей наиболее ранних этапов прогрессирования РШМ, существенно различающихся по характеристикам иммунного портрета, на основе их транскриптома.

Материалы и методы. Транскриптомный анализ был проведен методом RNA-Seq с использованием

биопсийного материала, полученного от пациенток с вирусом папилломы человека и ЦИН I–III степеней, РШМ IA1–IIB стадий; контрольные образцы были представлены морфологически нормальным эпителием. Профили RNA-Seq были проанализированы с помощью различных биоинформатических инструментов, в том числе GAGE (GSA-алгоритм), WGCNA-анализа сигнальных путей, деконволюции клеточного состава xCELL и картирования транскриптомных различий к хромосомным регионам PREDA.

Результаты. На основе кластерного анализа профилей RNA-Seq был обнаружен генный паттерн с согласованно изменяющейся экспрессией, обогащенный иммунными сигнальными путями (включая воспалительные механизмы, ответ на стресс и поддержание целостности ДНК). Охарактеризованы 2 подгруппы образцов РШМ (кластеры А/В; РШМ-А и РШМ-В соответственно), различающиеся представленностью этого «иммунного» паттерна, в сравнении с ЦИН. GAGE-анализ дифференциально экспрессированных генов показал, что опухолевая прогрессия в РШМ-А и РШМ-В может поддерживаться иммунологически различными механизмами. При xCELL-анализе по 64 клеточным популяциям подтверждена гетерогенность изменений клеточного состава при сравнении ЦИН/РШМ-А/РШМ-В, в частности кластер В характеризовался подавленной иммунной активностью по сравнению с кластером А, по целому ряду показателей иммунного инфильтрата. PREDA-анализ подтвердил ассоциацию наблюдаемых транскриптомных различий с разными хромосомными локусами, в случае РШМ-А многие из них оказались колокализированы с генными семействами, функционально связанными с врожденным иммунным ответом, воспалением/гибелью, инвазией.

Заключение. Ранний инвазивный РШМ может быть представлен различными иммунофенотипами, что может иметь большое значение для поиска новых биомаркеров эффективности иммунотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 21-15-00208).

ПРИМЕНЕНИЕ ЭЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПЛАТФОРМЕ MGI ДЛЯ СКРИНИНГА МАРКЕРОВ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

А.В. Мурзаева¹, А.П. Шинкаркина¹, П.А. Штаталов²,
М.Э. Романова²

¹МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск;

²МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва
e-mail: lewnmur@gmail.com

Ключевые слова: герминальные мутации, NGS

Введение. Поскольку показанием к назначению таргетной терапии при РМЖ, РЯ, РПЖ и раке поджелудочной железы является наличие герминальных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*, большое значение имеет проведение расширенного молекулярно-генетического тестирования. Одновременно провести анализ данных генов и всех генов, ассоциированных с наследственными формами ЗНО, позволяет экзомное секвенирование.

Цель исследования — поиск генетических вариантов, имеющих терапевтическое значение и/или ассоциированных с наследственными формами.

Материалы и методы. В исследование были включены 414 пациентов, из них с РМЖ — 271, РЯ — 31, раком поджелудочной железы — 99 и РПЖ — 13.

В ходе предварительного ПЦР-исследования у пациентов не выявлено наиболее часто встречающихся герминальных мутаций в гене *BRCA1* (185delAG, 3819delGTAA, 3875delGTCT, 5382insC, T300G, 4153delA, 2080delA) и мутации 6174delT гена *BRCA2*.

Для пациентов было проведено массивное параллельное секвенирование (NGS) на геномном анализаторе MGISEQ-2000 с использованием мультиплексной панели. Образцы ДНК, полученные из лимфоцитов периферической крови, были отсеквенированы с покрытием $\times 100$ и выше. Биоинформатическую обработку данных проводили с использованием программ для демуплексирования, картирования (BOWTIE2 v. 2.2.5), определения вариантов (GATK 3.8-0) и аннотирования (SNPEff 4.3T Annovar 2017J) и других инструментов. Аннотацию мутаций и их патогенность предсказывали согласно стандартам и руководству, разработанным ACMG, AMP и CAP для интерпретации мутаций, полученных с помощью секвенирования.

Результаты. Среди пациенток с РМЖ всего у 32 (11,8 %) были обнаружены патогенные варианты. Мутации гена *BRCA1* выявлены в 12 (4,4 %) случаях и *BRCA2* — в 13 (4,8 %). Также были представлены следующие варианты, ассоциированные с наследственными формами рака: *BLM* с.1642C>T (p.Gln548Ter), *PALB2* с.1352T>A (p.Leu451Ter), *MSH6* с.4070_4071insAGAT (p.Lys1358AspfsTer2), *CHEK2* с.599T>C (p.Ile200Thr), *PTPRJ* с.827A>C (p.Gln276Pro).

В нашем исследовании у 3 (9,7 %) пациенток с РЯ были определены мутации в генах *BRCA2* с.7007G>A (p.Arg2336His), *BLM* с.1642C>T (p.Gln548Ter) и *BRIP1* с.507G>A (p.Gln169=). При раке поджелудочной железы герминальные мутации у 2 пациентов были выявлены в гене *BRCA2* и у 2 пациентов в генах *CEBPA* с.68dup (p.His24AlafsTer84) и *PMS2* (chr7:6045600C>G, p.Gly29Ala). Патогенный вариант при РПЖ был представлен в 1 (7,7 %) случае в гене *BRCA2*.

Заключение. Экзомное секвенирование является эффективным инструментом, позволяющим наряду со скринингом мишеней таргетной терапии выявить потенциальные маркеры для применения препаратов off label в рамках клинических протоколов, а также

широкий спектр генов, ассоциированных с наследственным раком.

CD44 И ЕГО ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

С.Н. Наврузов¹, А.А. Мадалиев², Д.А. Алиева¹,
С.Т. Рахмонов¹, Х.Х. Чориев¹

¹Хирургическая клиника «Yangi Hayot», Ташкент,
Республика Узбекистан;

²Республиканский специализированный научно-практический
медицинский центр онкологии и радиологии, Ташкент,
Республика Узбекистан
e-mail: sarimbekn@list.ru

Ключевые слова: CD44, колоректальный рак, прогноз

Введение. КРР представляет собой ЗНО, которое в структуре всех нозологических единиц желудочно-кишечного тракта занимает одно из первых мест. КРР медленно прогрессирует, клиническая картина сопровождается эндогенной интоксикацией, обусловленной биохимическими процессами канцерогенеза. Развитие молекулярной онкологии требует поиска прогностических маркеров, позволяющих определять тактику ведения пациентов, исход и прогноз. CD44 является трансмембранным гликопротеином, впервые выявленным на лимфоцитах, связан с биологическими свойствами опухолей, такими как пролиферация, метастазирования, рецидивы, устойчивость к ЛТ и ХТ. В настоящее время обнаружены его изоформы, которые могут служить прогностическими факторами при КРР, осуществляя защиту от антиферментативного окисления.

Цель исследования — определение уровня изоформ CD44 и его значимости в качестве прогностического маркера при КРР.

Материалы и методы. Оценивали уровень изоформ CD44 с общей выживаемостью и клинико-патологическими особенностями больных КРР. Экспрессию уровня CD44 и его изоформ изучали в тканях опухоли верифицированного КРР после оперативного вмешательства у 33 больных, получавших лечение в условиях частной хирургической клиники Yangi Hayot. Проведена оценка уровня выживаемости, а также клинической картины с последующей статистической обработкой.

Результаты. Изучение уровня экспрессии CD44 и его изоформ показало, что высокий уровень общих изоформ достоверно связан с ухудшением общего состояния больных КРР. Установлено, что метастатический фенотип образуется за счет экспрессии изоформы CD44 v2-10, более высокий уровень CD44 v6 определяется при колоректальной карциноме. При избыточной экспрессии CD44 со стороны клинической картины наблюдается плохой прогноз и низкая выживаемость, что, по всей видимости, обусловлено низкой дифференцировкой и ее отсутствием при КРР, что подтверждается корреляцией с метастазированием как в близлежащие

лимфатические узлы, так и в отдаленные. Проведенный анализ полученных данных подтверждает имеющиеся данные о значимости этого маркера при прогнозе КРР.

Заключение. Результаты исследования по изучению и определению значимости экспрессии CD44 и его изоформ показали наличие прогностической ценности при КРР, при этом положительная экспрессия CD44 коррелирует с низкой общей выживаемостью, дифференцировкой и развитием метастазов в лимфатических узлах. Поиск маркеров этого типа требует дальнейшего изучения.

МУТАЦИОННЫЙ СТАТУС ГЕНОВ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ ДНК И РИСК РАЗВИТИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Т.В. Наседкина¹, А.М. Данишевич², С.М. Шумилова¹,
А.Ю. Иконникова¹, С.Е. Николаев², Н.А. Бодунова²

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

²ГБУЗ г. Москвы «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова ДЗМ г. Москвы», Москва
e-mail: tanased06@rambler.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, мутация, гены системы репарации, секвенирование

Введение. Мутации в генах гомологичной рекомбинации *BRCA1* и *BRCA2* значительно повышают риск развития РМЖ, однако могут объяснить не более 25 % семейных случаев РМЖ. Большой интерес представляет изучение герминальных вариантов в других генах, вовлеченных в процессы репарации и рекомбинации ДНК, и их связи с наследственным РМЖ.

Цель исследования — оценить вклад мутационного статуса широкого спектра генов системы репарации ДНК в риск развития РМЖ на основе данных генетического тестирования пациентов с РМЖ и здоровых доноров.

Материалы и методы. В исследование были включены 700 женщин с диагнозом РМЖ и 500 здоровых женщин, жителей Центральной России. Возраст пациенток с РМЖ составил от 20 до 82 лет (средний возраст 50 лет), возраст здоровых доноров — от 40 до 74 лет (средний возраст 52 года). Секвенирование проводили на платформе Illumina с использованием панели зондов для кодирующих областей 70 генов, участвующих в репарации ДНК. Клиническую значимость вариантов оценивали с использованием баз данных ClinVar, Varsome, Annotvar.

Результаты. Среди пациенток с РМЖ патогенные варианты выявлены в 19,9 %, среди здоровых доноров — в 7,4 % случаев. Частота вариантов, приводящих к обрыву белковой цепи, у пациенток с РМЖ составила 14,3 % против 5,7 % в группе здоровых доноров. В группе пациенток с РМЖ патогенные варианты были выявлены в 32 генах, наиболее часто в генах *BRCA2*

(20 %), *BRCA1* (18 %), *CHEK2* (13 %), *ATM* (7 %), *NBN* (5 %), генах анемии Фанкони (5 %), *ERCC2* (4 %), *PALB2*, *BARD1*, *MUTYH*, *RAD50* (по 3 %), *XRCC2* (2 %). В группе здоровых доноров наиболее часто выявляли мутации в генах *BRCA1* (9 %), *CHEK2* (9 %), *ATM* (9 %), *NBN* (9 %), *BRCA2* (6 %), *MUTYH* (6 %). Мутации в генах *BRCA1/2* определяли у 7,5 % пациенток с РМЖ, большая часть представлена редкими non-founder вариантами — 6,4 %. У здоровых доноров мутации *BRCA1/2* обнаруживали в 1,1 % случаев, редкие варианты составили 0,6 %. Среди редких вариантов у пациенток с РМЖ выявлены повторяющиеся мутации *BRCA1* с.1303_1309del (rs886039941) и с.4689C>G (rs80357433), *BRCA2* с.7879A>T (rs80359014).

Заключение. Патогенные варианты в генах системы репарации ДНК встречаются в 2,7 раза чаще в группе пациенток с РМЖ по сравнению со здоровыми донорами. Частота мутаций *BRCA1/2* у пациенток с РМЖ выше в 6,8 раза, мутаций *CHEK2* — в 4 раза, мутаций *ATM* — в 2,2 раза по сравнению с группой здоровых женщин. Подавляющее большинство мутаций *BRCA1/2* составили редкие варианты. Секвенирование нового поколения позволяет существенно расширить спектр выявляемых генетических изменений, ассоциированных с наследственным РМЖ.

Работа выполнена в рамках гранта Федеральной целевой программы № 05.604.21.0234 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419X0234).

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *HNF1B*, *CASC17*, *CASC8*, *CASC2*, *CASC11*, АССОЦИИРОВАННЫХ С РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ УРОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ И С ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

Н.В. Полуконова, А.Г. Демин, Т.Е. Пылаев,
А.В. Полуконова, А.М. Мыльников, А.Б. Бучарская
ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России,
Саратов
e-mail: polukonovanv@yandex.ru

Ключевые слова: генетические полиморфизмы, ассоциированные с раком предстательной железы, первично-множественные злокачественные новообразования

Введение. Развитие скрининговых исследований привело к увеличению диагностированных случаев первично-множественных ЗНО (ПМЗН) мочеполовой системы. Лидирующим по частоте встречаемости является РПЖ. Расширение спектра генетических маркеров предрасположенности к РПЖ позволит повысить точность его диагностики и прогноза развития у пациентов с ПМЗН.

Цель исследования — оценить распространенность полиморфных вариантов генов *HNFI1B*, *CASC17*, *CASC8*, *CCAT2*, *CASC11*, ассоциированных с РПЖ, среди пациентов урологического профиля.

Материалы и методы. Выделение ДНК из образцов венозной крови осуществляли на колонках коммерческим набором GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo, Германия); продукты амплификации и рестрицированные фрагменты исследовали методом горизонтального электрофореза в агарозном геле с бромистым этидием (Хеликон, Россия).

Исследовали 29 пациентов: 10 — с мочекаменной болезнью и 19 — с разными комбинациями ПМЗН: мочевого пузыря, почки и желудка, почки и предстательной железы, почки и мочевого пузыря, почки и кишечника, почки и легкого, предстательной железы и кишечника, предстательной железы и кожи, мочевого пузыря и предстательной железы, мочевого пузыря и кишечника, из них 9 пациентов имели РПЖ и 10 не имели РПЖ.

Результаты. Методом сайт-специфической ПЦР с использованием разработанных нами тест-систем для детекции мутаций, ассоциированных с риском развития РПЖ, были идентифицированы полиморфные варианты генов *CCAT2* SNP rs6983267, *CASC8* SNP rs1447295, SNPrs1859962, *CASC17* SNP rs1859962, *HNFI1B* SNP rs4430796 среди пациентов 3 групп: РПЖ, разных комбинаций ПМЗН без РПЖ, только мочекаменной болезни.

Все пациенты содержали SNP rs4430796 (C>T) гена *HNFI1B*, причем у пациентов с РПЖ гомозигот по аллелю (Т) было больше (66,7 %), чем у пациентов с разными ПМЗН без РПЖ (30 %) и чем у пациентов только с мочекаменной болезнью (10 %).

Носители мутантных аллелей генов *CASC17* (A>C) и *CASC8* (G>T) в гомо- и гетерозиготах были представлены примерно одинаково в группах с РПЖ и разными ПМЗН (по *CASC17*: 88,8 и 90 %; по *CASC8*: 44,4 и 50 %), но чаще, чем в группе мочекаменной болезни (соответственно 60 и 20 %). Наоборот, носителей SNP в гене *CCAT2* (G>T) было примерно одинаково в группах мочекаменной болезни (90 %) и РПЖ (88,9 %), но больше, чем в группе разных ПМЗН без РПЖ (60 %).

Заключение. Среди всех пациентов с патологией мочеполовой системы выявлены SNP генов *HNFI1B*, *CASC17*, *CASC8* и *CCAT2*, ассоциированные с риском развития РПЖ. Однако для обнаружения устойчивых ассоциаций исследованных SNP необходимо расширение выборки.

Работа выполнена при поддержке в рамках государственного задания (№ 121032600197-2.)

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ 20 микроРНК ПРИ СВЕТОКЛЕТОЧНОМ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОМ РАКЕ

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

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

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

Минздрава России, Москва

e-mail: zolly_sten@mail.ru

Ключевые слова: рак почки, микроРНК, таргетная терапия

Введение. По сравнению с другими видами рака почки скПКР встречается чаще и протекает клинически более агрессивно. Поскольку ХТ малоэффективна при скПКР, идентификация новых генов, связанных с патогенезом скПКР, и изучение механизмов их регуляции открывают возможности для выявления современных диагностических, прогностических маркеров и мишеней таргетной терапии скПКР.

Цель исследования — изучение экспрессии 20 микроРНК при скПКР для определения их роли в патогенезе заболевания и выявления потенциальных мишеней для диагностики и таргетной терапии.

Материалы и методы. Экспрессию 20 микроРНК в 40 парных образцах скПКР исследовали методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием наборов TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit и TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix, а также MicroRNA Assays (Applied Biosystems). Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью CFX Maestro Software (BioRad).

Результаты. Проанализированы 20 микроРНК, участвующих в регуляции генов апоптоза и ЭМП/метастазирования. Выявлены снижение экспрессии 4 исследованных микроРНК (miR-129, miR-34b, miR-375, miR-9) в 55 % случаев и более ($p < 0,01$) и повышение экспрессии miR-34a в 9 (22,5 %) случаях ($p < 0,05$), причем случаев снижения экспрессии данной микроРНК в опухолевой ткани не обнаружено. Особый интерес вызывает изменение экспрессии miR-129, уровень которой был снижен в 5 раз и более в образцах опухоли по сравнению с парным образцом гистологически неизмененной ткани почки у 36 (90 %) из 40 пациентов ($p < 0,01$), еще в 3 случаях экспрессия была снижена в 2–5 раз ($p < 0,05$).

Заключение. Выявленные нами aberrантно экспрессируемые микроРНК (miR-129, miR-34b, miR-375, miR-9 и miR-34a), вероятно, участвуют в патогенезе скПКР и в перспективе могут быть использованы в диагностике, прогнозе и разработке таргетной терапии данного заболевания.

Работа выполнена при поддержке

в рамках государственного задания

(№ FGFGU-2022-0007) Минобрнауки России учреждению ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии».

ЗНАЧИМОСТЬ АНГИОПОЭТИНА 1 И МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 9 В ОЦЕНКЕ РИСКА ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ ГЛИАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В.И. Прохорова, С.А. Красный, Т.П. Цырусь,
Л.А. Державец, Ю.Н. Грачев, О.В. Готько, О.А. Грицкова,
А.С. Мавричев, Е.И. Белевич

ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», Минск,
Республика Беларусь
e-mail: vprohorova@mail.ru

Ключевые слова: глиальные опухоли головного мозга

Введение. Известную роль в качестве предикторов опухолевой прогрессии на дооперационном этапе лечения играют ангиогенные факторы роста. Повышение уровня ангиогенных факторов роста в крови пациентов с глиальными опухолями головного мозга во многих исследованиях рассматривается в качестве нового показателя прогрессирования опухолевого процесса.

Цель исследования — оценить прогностическую значимость ангиопоэтина 1 и матриксной металлопротеиназы 9 при прогрессии глиальных опухолей головного мозга.

Материалы и методы. До начала противоопухолевого лечения методом ИФА в сыворотке крови исследованы ангиопоэтин 1 и матриксная металлопротеиназа 9 у 154 пациентов с глиальными опухолями головного мозга и 30 клинически здоровых лиц. Распределение пациентов по степени злокачественности опухоли было следующим: Grade I — 5, Grade II — 44, Grade III — 18, Grade IV — 87 пациентов. Для анализа данных использовали непараметрические методы статистики с помощью компьютерного пакета программ Statistica 10.0. Статистическую значимость различий между клинически здоровыми лицами и пациентами с глиальными опухолями головного мозга оценивали по критериям Манна—Уитни (U-тест). Для оценки степени взаимосвязи между ранговыми и количественными переменными применяли коэффициент корреляции Кендалла (τ Kendall). Статистическую значимость различий оценивали по критерию Вилкоксона. При всех видах статистического анализа различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты. Результаты исследования показали, что у пациентов с глиальными опухолями головного мозга существуют значимые различия концентрации матриксной металлопротеиназы 9 (Манна—Уитни $p = 0,042$) относительно ее значений у клинически здоровых лиц. Значимых различий концентрации ангиопоэтина 1 у пациентов с глиальными опухолями головного мозга относительно его значений у клинически здоровых лиц не отмечено (Манна—Уитни $p = 0,267$). Исследование взаимосвязи концентрации ангиопоэтина 1 и матриксной металлопротеиназы 9 выявило умеренную

взаимосвязь ангиопоэтина 1 (τ Kendall = 0,48; $p < 0,001$) и матриксной металлопротеиназы 9 (τ Kendall = 0,42; $p < 0,001$) со степенью злокачественности опухоли. В связи с этим, возможно использование ангиопоэтина 1 и матриксной металлопротеиназы 9 для оценки риска опухолевой прогрессии глиальных опухолей головного мозга.

Заключение. Ангиопоэтин 1 и матриксная металлопротеиназа 9 могут быть использованы в качестве дополнительных прогностических факторов оценки риска прогрессии глиальных опухолей головного мозга.

РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МИКРОРНК МОЧИ В ДИАГНОСТИКЕ КАСТРАЦИОННО-РЕЗИСТЕНТНОГО РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М.М. Сайткулова^{1,2}, О.Е. Брызгунова^{1,3}, П.П. Лактионов^{1,3},
И.А. Остальцев³, С.Э. Красильников³, М.Ю. Коношенко^{1,3}

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

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет»,
Новосибирск;

³ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина»
Минздрава России, Новосибирск
e-mail: m.saitkulova@g.nsu.ru

Ключевые слова: рак предстательной железы, кастрационно-резистентный рак предстательной железы, диагностика, микроРНК

Введение. РПЖ является одной из самых актуальных проблем современной онкоурологии, что объясняется неуклонным ростом заболеваемости и смертности. При кастрационно-резистентной форме РПЖ (КРРПЖ), тяжело поддающейся лечению, медиана выживаемости составляет 9–36 мес. До сих пор не разработано высокоспецифичных маркеров для ранней диагностики КРРПЖ. В качестве такого маркера предлагается использовать микроРНК — короткие некодирующие РНК, которые участвуют в посттранскрипционной регуляции белоккодирующих генов. МикроРНК стабильны и удобны в работе, присутствуют в биологических жидкостях: крови (сыворотке, плазме), моче, спинномозговой жидкости, слюне. Известно, что микроРНК вовлечены во все ключевые этапы развития КРРПЖ и, следовательно, обладают значительным потенциалом в качестве онкомаркеров КРРПЖ.

Цель исследования — формирование диагностической панели для КРРПЖ на основе оценки уровня экспрессии 9 различных микроРНК (miR-19b, miR-30e, miR-31, miR-92a, miR-125b, miR-200b, miR-205a, miR-375, miR-660) в составе внеклеточных везикул (ВВ) и бесклеточной фракции (БкФ) мочи больных гормоночувствительным РПЖ (ГЧРПЖ) и КРРПЖ.

Материалы и методы. Образцы мочи пациентов с КРРПЖ и ГЧРПЖ были получены из НМИЦ им.

акад. Е. Н. Мешалкина (Новосибирск). ВВ мочи были получены методом агрегации-преципитации с использованием полиэтиленгликоля и декстрана. МикроРНК ВВ и БкФ мочи были выделены с использованием стекловолокнистых сорбентов в присутствии октановой кислоты. Относительная экспрессия микроРНК была оценена методом stem-loop ОТ-ПЦР. Статистическую обработку данных выполняли в программе MedCalc Statistical software.

Результаты. С помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA выявлены дифференциально-экспрессированные пары микроРНК: 16 пар микроРНК ВВ и 17 пар микроРНК БкФ. Среди них выявлены пары микроРНК, относительная экспрессия которых была меньше у ГЧРПЖ, чем у КРРПЖ: 30/31, 30/125, 92/125, 375/660 (ВВ); 19/30, 19/31, 19/92, 19/125, 19/200, 19/205, 19/375, 19/660, 30/31, 30/125, 30/205, 92/205, 125/205, 200/205 (БкФ); больше у ГЧРПЖ, чем у КРРПЖ: 19/375, 30/375, 31/92, 31/200, 31/205, 31/375, 92/375, 125/200, 125/375, 125/600, 200/375, 205/375 (ВВ); 31/200, 125/200, 205/660 (БкФ).

Закключение. На основе полученных результатов сформированы диагностические алгоритмы: для микроРНК ВВ мочи — состоящий из 3 пар микроРНК (30/31, 92/125, 125/200) и позволяющий диагностировать 90 % больных КРРПЖ; для микроРНК БкФ мочи — состоящий из 3 пар микроРНК (19/200, 19/205, 200/205) и позволяющий диагностировать больных КРРПЖ с точностью 100 %.

НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА С ПРИМЕНЕНИЕМ СВЕРХЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ИММУНОАНАЛИЗА РАКОВО-СЕТЧАТОЧНЫХ АНТИГЕНОВ

Я.А. Светочева¹, Ю.М. Шляпников², Н.В. Потолдыкова¹,
Е.А. Шляпкинова², Е.А. Безруков¹, А.З. Винаров¹,
А.А. Замятин³

¹Институт урологии и репродуктивного здоровья человека
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава
России (Сеченовский Университет), Москва;

²ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной
биофизики РАН», Пущино;

³Институт молекулярной медицины ФГАОУ ВО Первый
МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский
Университет), Москва
e-mail: svetochevaYA@yandex.ru

Ключевые слова: опухоль почки, аррестин, рековерин, диагностика опухоли почки

Введение. Почечно-клеточный рак (ПКР) является распространенным урологическим ЗНО с высоким уровнем смертности и низкой частотой выявления. Одним из подходов к улучшению его диагностики могут стать поиск новых неинвазивных биомаркеров в жидкостной биопсии и разработка более чувствительных методов их выявления.

Цель исследования — определить содержание раково-сетчаточных антигенов — аррестина, рековерина, родопсинкиназы и трансдуцина — в моче у больных ПКР и здоровых доноров с помощью ультрачувствительного иммуноанализа на микрочипах с детекцией магнитными частицами.

Материалы и методы. Для обнаружения сверхнизких концентраций представленных белков в образцах мочи пациентов с ПКР и условно-здоровых доноров применен ультрачувствительный иммуноанализ на микрочипах с детекцией магнитными частицами с пределом обнаружения 0,1 пг/мл. Исследованы образцы мочи 89 пациентов с ПКР и 50 доноров, у которых опухоль почки отсутствовала.

Результаты. Результаты показали высокую диагностическую эффективность комбинации аррестина с рековерином: при пороге 0,1 пг/мл чувствительность составила 96 %, специфичность — 92 %, AUC — 0,96 (95 % ДИ 0,93–0,99). Через 7 дней после удаления опухоли концентрация антигенов вернулась к уровню, характерному для контрольной группы.

Закключение. Согласно предварительным результатам исследования аррестин в комбинации с рековерином может служить диагностическим неинвазивным мочевым биомаркером ПКР. Однако необходимо дальнейшее изучение экспрессии раково-сетчаточных антигенов как маркеров ПКР на большей популяции больных и условно-здоровых доноров.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ
(грант № 19-75-10025).

НОВЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ЛИМФОМОЙ ХОДЖКИНА

М.А. Слюсаренко, С.А. Шалаев, А.В. Малек

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава
России, Санкт-Петербург
e-mail: slusarenko_masha@mail.ru

Ключевые слова: лимфома Ходжкина, аптасенсор, внеклеточные везикулы, диагностика

Введение. Лимфома Ходжкина (ЛХ) составляет 15 % всех случаев рака у молодых людей. Несмотря на увеличение 5-летней выживаемости до 80 % при запущенных формах заболевания, отсутствует надежный метод контроля эффективности терапии. В настоящее время оценка эффективности терапии проводится с помощью позитронно-эмиссионной томографии, совмещенной с рентгеновской компьютерной томографией (ПЭТ-КТ). К недостаткам этого метода можно отнести высокую стоимость, лучевую нагрузку, сложность объективной интерпретации результатов. Экспрессия рецептора фактора некроза опухолей TNFRSF8 (или CD30) клетками Ходжкина является диагностическим критерием заболевания. В ряде экспериментальных работ было показано, что в условиях *in vitro* клетки Ходжкина секретируют CD30⁺-BHV. Количественное

определение CD30⁺-BHB в плазме представляется перспективным методом оценки состояния пациентов в процессе терапии с помощью AuNP-аптасенсора.

Цель исследования — анализ корреляции результатов оценки состояния пациентов с ЛХ в процессе ХТ с помощью ПЭТ-КТ и AuNP-аптасенсора.

Материалы и методы. В исследование были включены 43 пациента с впервые поставленным диагнозом ЛХ, классический вариант/CD30⁺. Стадия IIa–IIb диагностирована у 15 пациентов, IIIa–IIIb — у 12, IVa–IVb — у 16. Всем пациентам проведены 2 цикла ХТ по стандартной схеме ABVD. Состояние пациентов оценивали до начала терапии и после нее с помощью ПЭТ-КТ, параллельно был проведен количественный анализ CD30⁺-BHB с использованием ранее описанной технологии — AuNP-аптасенсор (DOI: 10.3390/bios12010023).

Результаты. По данным ПЭТ-КТ у всех пациентов, включенных в исследование, наблюдался хороший терапевтический эффект (I–II–III балла по шкале визуальной оценки Deauville). При этом снижение содержания CD30⁺-BHB в плазме, коррелирующее с данными ПЭТ-КТ, было обнаружено у 80 % пациентов. У части пациентов (20 %) на фоне терапии не наблюдалось ожидаемого снижения концентрации CD30⁺-BHB, хотя результаты ПЭТ-КТ указывали на хороший терапевтический эффект.

Закключение. У 20 % пациентов с ЛХ результаты оценки метаболической активности опухоли, выполненной с помощью ПЭТ-КТ (снижение TLG), не коррелируют с данными полуколичественного анализа CD30⁺-BHB в плазме, проведенного с помощью AuNP-аптасенсора. Этот феномен может быть критерием стратификации пациентов с плохим прогнозом и/или высоким риском рецидива заболевания. Для оценки прогностического значения описанного феномена необходимо расширение формата исследования.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ ПРИ УЧАСТИИ КОАКТИВАТОРОВ СТЕРОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ТКАНИ ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Л.В. Спирина, С.Ю. Чижевская, И.В. Ковалева

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: spirinalvl@mail.ru

Ключевые слова: папиллярный рак щитовидной железы, SRC-1, SRC-3, клинко-морфологические параметры опухоли, *BRAFV600E*

Введение. Изучение молекулярных особенностей развития папиллярного РЩЖ — актуальная проблема современной онкологии. Коактиваторы стероидных рецепторов SRC-1 и SRC-3 являются значимыми в регуляции инвазивного и метастатического потенциала опухоли.

Цель исследования — изучение экспрессии и содержания SRC-1, SRC-3 в ткани папиллярного РЩЖ в связи с клинко-морфологическими параметрами опухоли.

Материалы и методы. В исследование были включены 82 пациента с патологией щитовидной железы, получавших лечение в клиниках НИИ онкологии Томского НИМЦ: 46 больных с папиллярным РЩЖ T1–4N0–1M0; 36 — с доброкачественной патологией щитовидной железы (из них 6 пациентов с тиреоидитом Грейвса). Экспрессию SRC-1 и SRC-3 оценивали с помощью метода ПЦР в реальном времени. Содержание белков исследовали с использованием вестерн-блоттинга. Мутацию *BRAFV600E* определяли с помощью набора реагентов Real-time-PCR-BRAFV600E.

Результаты. Показано, что экспрессия SRC-1 увеличивалась при доброкачественной и злокачественной трансформации клеток щитовидной железы по сравнению с фоновыми воспалительными заболеваниями. При этом повышение содержания белка отмечено для SRC-3.

Для ткани папиллярного РЩЖ, имеющего метастазы в регионарных лимфатических узлах, характерна высокая экспрессия SRC-3. Противоположный характер изменений наблюдался в экспрессионном профиле SRC-1: опухоль с регионарными лимфатическими метастазами имела низкий уровень мРНК SRC-1, что было в 3,4 раза ниже по сравнению с таковым в местно-локализованной опухоли папиллярного РЩЖ.

Кроме того, отмечалось, что экспрессия SRC-1 и SRC-3 была связана с гистологическим подтипом папиллярного рака. Так, при фолликулярном подтипе наблюдалось снижение содержания белка SRC-1 в 1,4 раза, при этом экспрессия SRC-3 была повышена в 1,5 раза по сравнению с классическим вариантом папиллярного РЩЖ. Наличие мутации *BRAFV600E* было связано с повышением экспрессии и снижением содержания белка SRC-1 на фоне роста содержания белка SRC-3 по сравнению с опухолью без мутации.

Стоит отметить рост обоих показателей при наличии инвазии опухоли. Выявлены повышение содержания SRC-1 и рост экспрессии и содержания белка SRC-3, что свидетельствует об участии данных белков в формировании признаков инвазивного опухолевого роста.

Закключение. В результате проведенного исследования выявлен рост экспрессии SRC-1 и содержания SRC-3 в ткани опухолевой патологии щитовидной железы. Продemonстрирована связь изучаемых показателей в ткани папиллярного РЩЖ с размером первичной опухоли, наличием регионарных метастазов и подтипом папиллярного РЩЖ. Выявлена ассоциация уровня мРНК и содержания SRC-1 и SRC-3 со статусом гена *BRAFV600E*. Отмечена роль белков в формировании инвазивного потенциала опухоли.

ПОИСК ОПУХОЛЕВЫХ МАРКЕРОВ В СОСТАВЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С.Н. Тамкович, А.А. Шефер, Е.И. Джугашвили

ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», Новосибирск
e-mail: s.tamkovich@ngs.ru

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, нуклеопротеиновые комплексы, биомаркер

Введение. Одним из перспективных направлений разработки неинвазивных методов диагностики онкологических заболеваний является анализ циркулирующей в крови внеклеточной ДНК (внДНК). Форма циркуляции и биологические функции внДНК до сих пор остаются малоизученными. Показано, что в крови онкологических больных часть внДНК имеет опухолевое происхождение, а в ряде исследований показано ее участие в развитии метастазирования. Нуклеопротеиновые комплексы (НПК) позволяют не только увеличить длительность циркуляции внДНК благодаря защите внДНК от действия эндонуклеаз крови, но и обеспечить адресность доставки ДНК к клеткам-мишеням для осуществления различных биологических функций. Таким образом, не вызывает сомнений перспективность идентификации и характеристики протеома НПК крови здоровых женщин и больных РМЖ для понимания роли данных структур в диссеминации рака и разработки методов обогащения опухолевой внДНК для дальнейшего использования жидкостной биопсии.

Цель исследования — идентификация белков в составе НПК, циркулирующих в плазме крови здоровых женщин и больных РМЖ на начальных стадиях заболевания.

Материалы и методы. НПК из плазмы крови женщин выделяли аффинной хроматографией на сорбентах с иммобилизованными антителами против гистонов. Размер ДНК оценивали с помощью капиллярного электрофореза (Agilent Technologies Inc., США) с использованием High Sensitivity DNA Kit, белки идентифицировали методом масс-спектрометрии.

Результаты и заключение. Установлено, что у здоровых женщин в составе гистонсодержащих НПК плазмы крови преобладает ДНК длиной 170–180 п. о., в то время как в НПК больных РМЖ представлены в равном количестве ДНК длиной 170–180 п. н. и более 6 тыс. п. н. Методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии с высокой достоверностью (score >56) идентифицировано 177 белков и 169 белков в составе гистонсодержащих НПК, циркулирующих в крови здоровых женщин и больных РМЖ соответственно. Наиболее представленными универсальными белками НПК плазмы крови (представлены более чем в половине всех образцов) являются HOXC5, GPR22, PAGE3, JUND, TRAM1L1. В составе НПК крови больных РМЖ выяв-

лен 131 уникальный белок, из которого 76 (45 %) являются опухолеассоциированными, что указывает на то, что часть циркулирующей внДНК имеет опухолевое происхождение. Создана панель белков в составе НПК плазмы больных РМЖ, которая может быть использована для обогащения опухолевой внДНК путем выделения НПК плазмы за антитела против белков-мишеней. Кроме того, эти белки могут быть использованы как самостоятельные биомаркеры в мультимаркерных диагностических системах (белок + ДНК/РНК), что повысит устойчивость диагностических систем.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 22-25-00130),
<https://rscf.ru/project/22-25-00130/> (25 февраля 2022 г.).*

АСИНХРОННАЯ РЕПЛИКАЦИЯ ГЕНОВ *AURKA* И *TP53* В ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕННОГО ЛЕЧЕНИЯ КАК МАРКЕР РАННЕГО ОБНАРУЖЕНИЯ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

В.В. Цепенко, В.Н. Черкесов, Е.В. Голуб, Г.Ф. Михайлова

МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России, Обнинск
e-mail: mrgp@mrrc.obninsk.ru

Ключевые слова: опухоли желудочно-кишечного тракта, *AURKA*, *TP53*, прогноз

Цель исследования — изучить нарушение синхронности репликации генов *AURKA* и *TP53* у больных с опухолевой патологией желудочно-кишечного тракта.

Материалы и методы. Исследовали лимфоциты периферической крови больных с опухолевой патологией желудочно-кишечного тракта в период 1–5 лет после завершения лечения. Были сформированы 3 группы: после лечения без прогрессирования заболевания ($n = 64$), после лечения с прогрессированием заболевания ($n = 14$), до прогрессирования заболевания ($n = 12$) — пациенты, у которых прогрессирование заболевания было установлено через 1–13 мес после проведенного исследования лимфоцитов с асинхронной репликацией. Исследование выполняли методом интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) с использованием прямомеченых ДНК-проб (Kreatech Diagnostics, Нидерланды).

Результаты. В результате исследования было установлено, что среднегрупповая частота лимфоцитов с асинхронной репликацией составила $30,4 \pm 0,4$ % для гена *AURKA* и $21,7 \pm 0,5$ % для гена *TP53* в группе «после лечения без прогрессирования заболевания»; $39,9 \pm 1,2$ % для гена *AURKA* и $31,2 \pm 1,2$ % для гена *TP53* в группе «после лечения с прогрессированием заболевания». В процессе исследования у некоторых пациентов группы «после лечения без прогрессирования заболевания» наблюдалась высокая частота лимфоцитов с асинхронной репликацией генов. Они были

выделены в отдельную группу наблюдения, и в период 1–13 мес после проведенного исследования лимфоцитов с асинхронной репликацией у них было установлено прогрессирование заболевания. Среднегрупповая частота лимфоцитов с асинхронной репликацией в этой группе составила $34,1 \pm 1,3$ % для гена *AURKA* и $26,1 \pm 1,2$ % для гена *TP53*. Проведенный статистический анализ показал статистически значимые различия между группами для обоих генов ($p < 0,05$).

Заключение. Таким образом, возможно применение асинхронной репликации генов *AURKA* и *TP53* в качестве дополнительного теста при контрольных обследованиях пациентов после проведенного лечения онкологического заболевания для раннего выявления пациентов с предполагаемым прогрессированием заболевания.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ БЕЛКА CTLA-4 ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

А.В. Четверяков¹, В.Л. Цепелев²

¹ГУЗ «Забайкальский краевой онкологический диспансер», Чита;

²ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, Чита
e-mail: yasnogorsk94@gmail.com

Ключевые слова: CTLA-4, иммунные контрольные точки, колоректальный рак

Введение. Исследования последних лет демонстрируют, что уровень мембранного белка CTLA-4 играет важную роль в ранней диагностике ЗНО и выборе оптимальной тактики лечения.

Цель исследования — изучить уровень цитотоксического Т-лимфоцитарно-ассоциированного белка-4 (CTLA-4) и его лиганда В7.2 в сыворотке крови, опухолевой ткани и оценить диагностическую значимость данных показателей у больных КРР.

Материалы и методы. Основную группу наблюдения составили 44 больных КРР. В контрольную группу включены 25 пациентов, прооперированных в плановом порядке (пластика колостомы, сформированной ранее по поводу травмы толстой кишки). Концентрацию CTLA-4 и В7.2 определяли в сыворотке крови, а также в супернатанте гомогената ткани опухоли и лимфатических узлов с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Статистическую обработку результатов проводили с применением непараметрического метода Манна–Уитни (U).

Результаты. Установлено, что у пациентов с раком толстой кишки уровень CTLA-4 в сыворотке крови увеличивается в 2,77 раза по сравнению с таковым в контрольной группе ($p < 0,001$). Концентрация CTLA-4 в ткани новообразования у пациентов с КРР была в 2,34 раза выше аналогичного показателя в контрольной группе ($p = 0,007$). Концентрация лиганда В7.2 в сыворотке крови у пациентов с КРР превышала данный показа-

тель в контрольной группе в 2,51 раза ($p = 0,002$). Концентрация лиганда В7.2 в ткани опухоли у пациентов с КРР превышала таковую в контрольной группе в 1,68 раза ($p = 0,004$). При анализе полученных данных обращает на себя внимание то, что уровень CTLA-4 в сыворотке крови имеет умеренную корреляционную связь с уровнем CTLA-4 в ткани ($\rho = 0,37$, $p < 0,01$). При анализе полученных данных определены параметры, которые имеют значимость в структуре диагностики. Разработана математическая модель в виде уравнения, предложен коэффициент, отражающий вероятность онкологической патологии толстого кишечника (К). При значении коэффициента $K \geq 0,59$ диагностируется развитие онкологической патологии толстого кишечника. На основании этих параметров разработана компьютерная программа для определения вероятности наличия онкологической патологии толстого кишечника.

Заключение. Полученные данные демонстрируют увеличение уровня CTLA-4 и его лиганда В7.2 в сыворотке крови и ткани опухоли у пациентов с КРР, а также их прямую корреляционную связь друг с другом, что позволяет предположить роль этих белков в патогенезе ускользания опухолевых клеток от иммунного надзора при раке толстого кишечника. На основании установленных закономерностей создана программа ЭВМ для определения вероятности онкологической патологии толстого кишечника.

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА miR-371a В ПЛАЗМЕ ПРИ ГЕРМИНОГЕННОЙ ОПУХОЛИ ЯИЧКА

А.В. Шалаев, Э.М. Мамижев, М.С. Князева,
А.К. Носов, А.В. Малек

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России, Санкт-Петербург
e-mail: shalaeff.andrey@gmail.com

Ключевые слова: микроРНК, miR-371a, герминогенные опухоли яичка, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Введение. Классическими маркерами для диагностики герминогенной опухоли яичка (ГОЯ) являются α -фетопроtein, хориогонадотропин и лактатдегидрогеназа, но низкая специфичность компрометирует диагностическую ценность этих молекул. Результаты десятков научных публикаций указывают на высокий диагностический потенциал циркулирующей miR-371a, но примеров реализации этого потенциала пока нет. Ранее мы показали, что экспрессия miR-371a в клетках ГОЯ различных типов значительно повышена, что может приводить к росту концентрации этой молекулы в плазме.

Цель исследования — разработка и оценка технологии специфического выделения и последующего анализа miR-371a с помощью двухфланговой обратной транскрипции и количественной ПЦР.

Материалы и методы. Материалом для исследования служила плазма пациентов с ГОЯ ($n = 16$) и доноров ($n = 16$). Выделение проводили с помощью комплементарного ДНК-зонда и магнитных частиц. Для обратной транскрипции использовали двухфланговый праймер, ПЦР проводили с применением 2 микроРНК-специфичных праймеров и флуоресцентного зонда. Оценку аналитических характеристик ОТ-ПЦР выполняли с помощью синтетического аналога miR-371a. Результаты анализа нормализовали относительно среднего для исследуемых образцов значения St. Разницу между группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, для оценки диагностической значимости проводили ROC-анализ.

Результаты. Разработанная система ОТ-ПЦР давала возможность проводить количественный анализ miR-371a в диапазоне концентраций 10^4 – 10^{10} молекул в реакции. Чувствительность системы анализа представлялась недостаточной для работы с тотальной РНК, поэтому был разработан метод специфического выделения miR-371a, что позволило повысить чувствительность анализа в целом. Значение St при детекции miR-371a в плазме составляло 23–25 циклов. При этом статистически значимой разницы между концентрацией miR-371a в плазме пациентов и доноров не наблюдалось. Площадь под кривой при ROC-анализе не превышала 0,7, что не подтверждает данные научной литературы о высоком диагностическом потенциале miR-371a.

Закключение. Полученные результаты разошлись с данным научной литературы о высоком диагностическом потенциале miR-371a. С учетом подтвержденной аналитической состоятельности разработанного метода ОТ-ПЦР и примененной технологии специфического выделения (обогащения) miR-371a полученные результаты могут быть следствием высокого «фонового» уровня молекул микроРНК сходной структуры в плазме здоровых доноров. Специфичность технологий выделения и анализа miR-371a, основанных на комплементарном взаимодействии нуклеиновых кислот, представляется недостаточной для получения клинически значимых результатов.

МЕТАСТАЗИРУЮЩАЯ УВЕАЛЬНАЯ МЕЛАНОМА: ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА

А.Ю. Шаманова^{1,2}, И.Е. Панова³, Е.Л. Казачков²

¹ГБУЗ «Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины», Челябинск;

²кафедра патологической анатомии и судебной медицины им. проф. В.Л. Коваленко ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск;

³СПб филиал ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Санкт-Петербург
e-mail: anna-sha@bk.ru

Ключевые слова: меланома хориоидеи, метастазирование, микроокружение опухоли

Введение. Меланома хориоидеи (МХ) — самая частая внутриглазная опухоль. Прогнозирование и предотвращение метастазирования данной опухоли являются главными задачами онкоофтальмологии, имеющими целью максимально продлить безрецидивную выживаемость пациентов.

Цель исследования — изучить клеточно-стромальное микроокружение метастазирующей МХ на основе ИГХ-характеристики операционного материала в ходе прижизненной патологоанатомической диагностики.

Материалы и методы. Исследован операционный материал случаев МХ за 2013–2017 гг. Выборку составили 2 группы исследования: 1-я — случаи первичной опухоли (МХ) без отдаленных метастазов в анамнезе ($n = 25$), 2-я — случаи первичных МХ с отдаленными метастазами в печени в анамнезе ($n = 18$). В ходе подгруппового анализа 2 групп исследования изучены 10 случаев первичных МХ и их метастатические очаги в печени.

Результаты. Во 2-й группе исследования статистически значимо преобладал уровень клеток, экспрессирующих маркеры CD4, — 138,5 (99,8; 153,3), CD68 — 137 (99,5; 173,8) и CD56 — 5 (3; 6). Установлено, что показатели CD4-лимфоцитов >95 и CD68-макрофагов >104 позволяют прогнозировать появление отдаленных метастазов МХ с чувствительностью 83,3 и 72,2 % и специфичностью 76 и 76 % соответственно. Такой же прогностической ценностью обладают показатели объемной плотности кровеносных сосудов в опухоли $<3,9$ (с чувствительностью 77,8 %, специфичностью 64 %). При этом в ходе подгруппового анализа 2 групп и сравнения первичных и метастатических очагов МХ представительство туморинфильтрирующих лимфоцитов статистически значимо больше в отдаленных метастазах и составило CD4 — 383,2 (301,2; 405,0); CD8 — 190,1 (176,2; 245,3), CD56 — 11,2 (7,5; 14,2) против одноименных показателей первичной МХ (CD4 — 132,2 (43,1; 187,2); CD8 — 38,3 (13,2; 49,2), CD56 — 6,1 (2,3; 8,2) соответственно). Установлен феномен макрофагальной сосудистой мимикрии в опухоли, что крайне актуально для понимания его участия в метастазировании МХ. Экспрессия матриксных металлопротеиназ 9-го типа наблюдается в клетках опухоли и ее микроокружении больше в метастазирующих МХ. Экспрессия коллагена IV типа обнаруживается в виде разрозненных волокон в экстрацеллюлярном матриксе опухоли метастазирующих МХ.

Закключение. Метастазирующие МХ характеризуются особенностями клеточно-стромального микроокружения: показатели лимфоцитов, макрофагов и объемной плотности кровеносных сосудов в опухоли обладают прогностической ценностью с высокой чувствительностью и специфичностью для построения прогноза отдаленного метастазирования опухоли. Состояние экстрацеллюлярного матрикса в опухоли

можно использовать для оценки потенциала прогрессии МХ.

АНАЛИЗ ПРОТЕОМА ЭКЗОСОМ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ ПСЕВДОНОРМАЛЬНЫМИ ЭПИТЕЛИОЦИТАМИ И КЛЕТКАМИ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.А. Шефер^{1,2}, Л.В. Яньшолес³, Т.А. Штам⁴,
А.Е. Григорьева¹, Ю.П. Центалович³, С.Н. Тамкович^{1,2}

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

²Институт медицины и психологии В. Зельмана ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск;

³ФГБУН «Институт «Международный томографический центр» СО РАН», Новосибирск;

⁴ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина
e-mail: a.shefer@g.nsu.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, экзосомы, протеом, прогностический маркер

Введение. РМЖ является самым распространенным ЗНО среди женщин (24,5 %). В настоящее время ведется активный поиск биомаркеров, пригодных для жидкостной биопсии, в том числе в составе экзосом — мембранных ВНВ диаметром 30–150 нм. Известно, что экзосомы секретируются всеми типами клеток, а состав экзосом отражает содержимое родительских клеток.

Цель исследования — идентификация экзосомальных белков, вовлеченных в диссеминацию опухоли, а также поиск прогностических маркеров РМЖ.

Материалы и методы. Экзосомы получены методом ультрафильтрации и последовательного ультрацентрифугирования из 3 линий эпителиоцитов: псевдонормальных клеток HBL-100, клеток MCF7 (молекулярный портрет линии соответствует люминальному А подтипу РМЖ и характеризуется низким метастатическим потенциалом) и клеток BT549 (молекулярный портрет линии соответствует трижды негативному подтипу РМЖ и характеризуется высоким метастатическим потенциалом). Экзосомы охарактеризованы с помощью трансмиссионной и криоэлектронной микроскопии, трекового анализа и проточной цитофлуориметрии. Белки экзосом идентифицированы методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

Результаты. В составе экзосом идентифицирован 301 белок, из них 78, 90 и 76 являются уникальными для культур HBL-100, MCF7 и BT549 соответственно; 26 белков — универсальными для всех 3 клеточных культур и 8 белков — общими для опухолевых клеточных линий. Выявлены значительные различия между молекулярными функциями белков экзосом из культур с разным метастатическим потенциалом. Сравнение идентифицированных белков экзосом с базой данных

Human Protein Atlas, отображающей экспрессию тканевых белков, позволило выявить только 1 маркер (C6orf141) благоприятного прогноза развития заболевания в экзосомах линии MCF7.

Заключение. Выявлены значительные различия протеома экзосом в линиях HBL-100, MCF7 и BT549. Установлено, что содержимое экзосом значительно отличается от депонированной в базе Human Protein Atlas информации о гиперэкспрессированных белках в опухолевой ткани молочной железы. Полученные результаты косвенно доказывают специфический сортиг биологически активных молекул в состав экзосом и подтверждают необходимость поиска опухолевых маркеров в составе экзосом, не опираясь на базы данных по опухолевой ткани.

ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ ОПУХОЛИ KIT/PDGFR «ДИКОГО» ТИПА: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ

В.В. Югай, Н.Н. Мазуренко, Н.А. Козлов, И.В. Цыганова,
М.П. Никулин, П.П. Архири, И.С. Стилиди

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: yugay_vladimir@mail.ru

Ключевые слова: гастроинтестинальные стромальные опухоли WT, SDHB, BRAF, NF1

Введение. Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО) — наиболее распространенные саркомы желудочно-кишечного тракта с высокой частотой мутаций генов KIT или PDGFRA. Однако до 15 % ГИСО не имеют данных мутаций (ГИСО «дикого» типа (WT)) и представляют собой гетерогенную группу опухолей по клиническим и молекулярным характеристикам. ГИСО WT включают случаи с активацией генов MAPK- и PI3K-сигнальных путей, а также ГИСО с дефицитом сукцинатдегидрогеназы (SDH). Дефицит SDH вызывает неконтролируемую пролиферацию клеток и неопластический рост. ГИСО WT отличаются по чувствительности к препаратам и требуют особого внимания при назначении таргетной терапии.

Цель исследования — выявить и изучить ГИСО WT.

Материалы и методы. В ранее проведенном генетическом исследовании с включением 244 пациентов с ГИСО выявлено 45 опухолей с отсутствием мутаций в генах KIT (экзоны 8, 9, 11, 13, 17) и PDGFRA (экзоны 12, 14, 18). Проведены анализ мутаций BRAF и анализ экспрессии субъединицы В SDH в 20 ГИСО, доступных для ИГХ-исследования; изучены ГИСО, ассоциированные с NF1. Прослежена общая выживаемость больных с ГИСО с различными генетическими нарушениями.

Результаты. Мутации KIT/PDGFR не обнаружены у 45 (18,4 %) пациентов с ГИСО, среди них преобладали женщины (n = 30), медиана возраста — 49,5 года.

Из 45 пациентов у 6 детей в возрасте до 19 лет диагностировали ГИСО желудка. Экспрессия CD117 отмечена в 81,8 %, CD34 — в 63 % ГИСО WT. Наследственные синдромы имели 8 пациентов: у 6 пациенток выявлена неполная триада Карнея и у 2 — нейрофиброматоз 1-го типа. Пациенты с ГИСО WT имели тенденцию к более высокой общей выживаемости (20-летняя общая выживаемость — 59 %, медиана — 50 мес).

Однако группа пациентов с ГИСО WT неоднородна. Дефицит SDH обнаружен в 13 из 20 тестированных ГИСО или в 28,9 % (13/45) ГИСО WT, а 7 опухолей были SDH-компетентны. SDH-дефицитные ГИСО локализовались в желудке, 11 из 13 пациентов — женщины, 4 имели наследственный синдром Карнея (медиана возраста 32 года). У 11 (84,6 %) из 13 пациентов возникли метастазы, тем не менее 15-летняя общая выживаемость составила 82 %. Группа SDH-компетентных ГИСО включала 6 (13,3 %) пациентов с мутацией *BRAFV600E*, преобладали женщины, опухоли чаще возникали в желудке, метастазы отсутствовали, 10-летняя общая выживаемость составила 84 %, медиана общей выживаемости 97 мес. Пациенты с ГИСО с нейрофиброматозом 1-го типа имели метастазы на брюшине, общая выживаемость составила 36 и 48 мес. Среди остальных 24 пациентов с ГИСО WT 7 человек имели четырежды негативные (*KIT/PDGFR/BRF/SDH* WT) ГИСО и 17 — опухоли *KIT/PDGFR* WT, дальнейшее исследование которых было невозможно ввиду отсутствия материала, их общая выживаемость оказалась низкой.

Заключение. Молекулярно-генетические многообразие ГИСО отражается на выживаемости пациентов, чувствительности опухоли к различным препаратам таргетной терапии и позволяет предвидеть прогноз заболевания.

ANALYSES OF *P16INK4A* GENE PROMOTER METHYLATION IN NON SMALL CELL LUNG CANCER PATIENTS

V. Jurisic¹, J. Obradovic², B. Perin³

¹University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, Serbia;

²University of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Kragujevac, Serbia;

³Institute for Pulmonary Diseases of Vojvodina, Sremska Kamenica, Serbia

e-mail: jurisicvladimir@gmail.com

Keywords: *p16INK4a*, lung cancer, methylation

Background. It is known that the tumor suppressor gene-*p16INK4a* prevents aberrant cells' entrance to the S phase of the cell cycle. However, in tumors, it is inactivated-“silenced”, by cytosine methylation in his promoter region, and thus provokes carcinogenic downstream signals.

Aim. To examine the methylation status of *p16INK4a* promoter region in non small cell lung cancer (NSCLC) patients depending on clinical and other patients demographic and molecular characteristics.

Materials and methods. DNA was extracted from FFPE lung tumor tissue with PureLink™ Genomic DNA Kits (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as described previously. DNA was used for PCR analyses for metilation status using an EZ-DNA Methylation Kit (Zymo Research, Orange, CA, USA).

For the visual presentation of hierarchical clustering with heatmap was implemented web tool called ClustVis that combines several R packages. All statistical analyses were performed with SPSS software, version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results. A significantly higher frequency of methylated *p16INK4a* was detected in NSCLC patients (40.9 %) prior therapy and in patients with leukopenia. In addition, more *p16INK4a* methylated patients (59.1 %) was found among males ($p = 0.032$, chi-square test). The authors also used the STRING database to search for potential network connectivity between EGFR and CDKN2A (*p16INK4a*). However, this marker is not associated with EGFR SNPs.

Conclusion. Since methylation is an early event during cancerogenesis, the obtained result suggested that methylated *p16INK4a* can be an appropriate marker for the diagnosis and monitoring of NSCLC patients.

Молекулярно-биологические подходы к противоопухолевой терапии

ГЕТЕРОТИПИЧЕСКАЯ КЛЕТОЧНАЯ 3D-МОДЕЛЬ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ИМИТИРУЮЩАЯ МИКРООКРУЖЕНИЕ ОПУХОЛИ

М.М. Абдурахманова¹, Т.Н. Беловежен², С.В. Кулемзин²,
В.А. Рихтер¹, О.А. Коваль¹, А.А. Нуштаева¹

¹ФГБУН «Институт химической биологии

и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск;

²ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии
СО РАН», Новосибирск

e-mail: m.abdurakhmanova98@gmail.com

Ключевые слова: рак молочной железы, опухолевые клетки, фибробласты, NK-клетки, 3D-клеточные модели

Введение. В классических двухмерных (2D) клеточных моделях отсутствует тканевая архитектура, в которой происходит иммунный ответ, и не учитываются другие клеточные и внеклеточные взаимодействия микроокружения опухоли. Мы разработали трехмерную (3D) гетеротипическую сфероидную модель, состоящую из опухолевых клеток, фибробластов и иммунных клеток, на примере NK-клеток для исследования взаимодействия опухолевых клеток с клетками микроокружения.

Цель исследования — конструирование гетеротипической 3D-3 модели РМЖ для исследования взаимодействия опухолевых клеток с клетками микроокружения.

Материалы и методы. В качестве опухолевого компонента РМЖ были использованы клетки линий MCF7, MDA-MB-231 и SK-BR-3. В качестве стромального — фибробласты BN120f, полученные из образца нетрансформированной ткани молочной железы, а в качестве иммунного компонента — линия NK-подобных клеток YT.

Дополнительно были получены опухолевые клетки, экспрессирующие красный флуоресцентный белок mKate2, стромальные — зеленый eGFP, NK-клетки — синий BFP.

Культивировали сфероиды в режимах: 1) монокультивирования (3D) только из опухолевых клеток; 2) сокультивирования опухолевых и стромальных клеток (3D-2); 3) сокультивирования опухолевых, стромальных и иммунных клеток (3D-3).

Для оценки проникновения NK-клеток в опухово-стромальные сфероиды были приготовлены препараты «раздавленных сфероидов».

Результаты. Использование низкоадгезивного пластика Nunclon Sphera в комбинации со средой DMEM/F12 с ростовыми факторами позволило получить как 3D, так и 3D-2 модели РМЖ (Нуштаева и др., 2022).

В гетеротипической 3D-2 модели стромальные клетки выступают в роли внутреннего каркаса для формирования внешнего опухолевого эпителиального слоя, способствуя получению более крупных и оформленных клеточных структур.

Фибробласты привлекали NK-клетки внутрь 3D-3 моделей из клеток MDA-MB-231 и MCF7, при этом киллерную активность NK-клетки проявляли только в составе сфероидов из клеток MDA-MB-231. Проникновение NK-клеток в 3D-3 модели из клеток SK-BR-3 происходило менее эффективно в связи с крупными размерами сфероидов.

Закключение. Сконструированы гетеротипические 3D-клеточные модели РМЖ, в которых NK- и опухолевые клетки могут взаимодействовать в тканеподобной архитектуре.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 20-74-10039).

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ЖЕЛЕЗА – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ

Н.П. Акентьева¹, Н.А. Санина¹, С.С. Шушанов²,
Н.И. Шкондина¹, О.О. Беспалова¹, А.Р. Гизатуллин¹

¹ФГБУН «ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН», Черноголовка;

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

Минздрава России, Москва

e-mail: na_aken@icp.ac.ru

Ключевые слова: множественная миелома, динитрозильный комплекс железа, ферменты поли(АДФ-рибозо)-полимеразы, матриксная металлопротеиназа

Введение. Лимфопролиферативное заболевание ММ, морфологическим субстратом которого являются плазматические клетки, продуцирующие моноклональный иммуноглобулин, является неизлечимым. Поэтому поиск новых классов антимиеломных препаратов и их мишеней для достижения продолжительной ремиссии является актуальным. Ферменты поли(АДФ-рибозо)-полимераза (PARP) и матриксная металлопротеиназа

являются перспективными мишенями для динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ7) при ММ.

Цель исследования — изучить влияние ДНКЖ7 (донора NO) — $[\text{Fe}(\text{SC}(\text{NHCH}_3)_2)_2(\text{NO})_2]\text{BF}_4$ на экспрессию генов ферментов PARP1, PARP2, MMP (MMP7, MMP9) в клетках ММ человека.

Материалы и методы. В работе использована линия клеток ММ человека RPMI8226. Способ культивирования: суспензионный в среде RPMI1640 с 10 % телячьей эмбриональной сывороткой при 37 °С, 5 % CO_2 . Влияние ДНКЖ7 на экспрессию генов ферментов PARP1, PARP2, MMP2, MMP7, MMP9 проводили методом количественной ОТ-ПЦР. РНК выделяли с помощью реагента ExtractRNA.

Результаты. Было изучено влияние ДНКЖ7 ($3,9 \times 10^{-4}$ М) на экспрессию генов изоферментов PARP1 и PARP2 в клетках ММ человека. Результаты исследования показали, что ДНКЖ7 подавлял экспрессию генов *PARP1* на 50 % и стимулировал экспрессию генов *PARP2* в 4,5 раза. Следовательно, ДНКЖ7 является перспективным препаратом для терапии рака. Установлено, что ДНКЖ7 индуцировал экспрессию генов *MMP2* в ~3,5 раза, однако подавлял экспрессию генов *MMP9* и *MMP7* в 10 и ~12 раз соответственно. Таким образом, ДНКЖ7 обладает антиметастатическим потенциалом.

Закключение. Поскольку ДНКЖ7 подавляет экспрессию генов ферментов PARP1, MMP9 и MMP7, играющих ключевую роль в развитии и прогрессии онкологических заболеваний, он может являться перспективным препаратом для лечения ММ.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ АААА-А19-119071890015-6).

АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА Nrf2 В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ НИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С N-ЭТИЛТИОМОЧЕВИНОЙ

В.И. Амозова, Н.А. Санина, А.А. Балакина
ФГБУН «ФИЦ проблем химической физики
и медицинской химии РАН», Черноголовка
e-mail: amozovavi@gmail.com

Ключевые слова: глиобластома, Nrf2, антиоксидантная система, монооксид азота, активные формы кислорода, окислительный стресс

Введение. Глиобластома является основной формой опухолей головного мозга и одним из самых агрессивных видов рака. Фактор транскрипции Nrf2 регулирует антиоксидантный ответ на окислительный стресс при различных типах терапии ЗНО и играет важную роль в развитии резистентности опухолевых клеток. Нами был синтезирован нитрозильный комплекс железа с N-этилтиомочевинной (ЕТМ), показавший избирательную цитотоксичность на клетках глиоблас-

томы А-172 и обладающий потенциальной окислительно-восстановительной активностью.

Цель исследования — изучение действия ЕТМ на активность транскрипционного фактора Nrf2 в клетках глиобластомы человека *in vitro*.

Материалы и методы. Были использованы линии глиобластомы человека: А-172, U-87 MG и U-251 MG. Определение внутриклеточного уровня оксида азота (NO) и АФК проводили с использованием флуоресцентных красителей DAF-FM DA и DCFH-DA соответственно. Для визуализации белков и их ядерной транслокации применяли метод иммуофлуоресцентной микроскопии. Влияние исследуемого соединения на экспрессию генов было изучено с помощью ПЦР в реальном времени.

Результаты. Было показано, что действие комплекса значительно увеличивало внутриклеточный уровень NO и АФК в клетках всех 3 культур. Наиболее выражено уровень свободнорадикальных молекул повышался в клетках U-251 MG, устойчивых к действию ЕТМ.

Показано увеличение количества Nrf2, его фосфорилирование по Ser40 и ядерная транслокация при действии ЕТМ в клетках всех исследованных культур. Определено существенное увеличение экспрессии генов *HMOX1*, *NQO1*, *GPX1* и *TXN* и соответствующих белков антиоксидантной системы в клетках глиобластомы при действии комплекса. Активация Nrf2 сопровождалась снижением внутриклеточного накопления провоспалительного белка p65 и подавлением экспрессии белков семейства IAPs, ингибирующих апоптоз, в клетках наиболее восприимчивой к ЕТМ линии А-172.

Закключение. Действие нитрозильного комплекса железа с N-этилтиомочевинной приводит к активации транскрипционного фактора Nrf2 и повышению экспрессии белков антиоксидантной системы как в чувствительных (А-172), так и в резистентных (U-251 MG) клетках глиобластомы, что является следствием увеличения внутриклеточного уровня свободнорадикальных молекул. Снижение экспрессии белка p65 при действии ЕТМ может объясняться как активацией Nrf2/НО-1 пути, так и повышением внутриклеточной концентрации монооксида азота. Цитотоксическое действие ЕТМ и индукция апоптотической клеточной гибели в исследованных клетках глиобластомы вероятно не зависят от активации Nrf2.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (№ АААА-А19-119092390041-5, АААА-А19-119071890015-6).

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ КВЕРЦЕТИНА НА НУКЛЕОСОМЫ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ОДИНОЧНЫХ ЧАСТИЦ

Т.В. Андреева¹, А.В. Любителей¹, В.М. Студитский^{1,2},
А.В. Феофанов^{1,3}

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

²Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США;

³ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва
e-mail: andreeva.tatyana.2014@post.bio.msu.ru

Ключевые слова: кверцетин, нуклеосома

Введение. Кверцетин — флавоноид, обладающий противораковой активностью. Влияние кверцетина на хроматин, в частности на структуру нуклеосом, неясно.

Цель исследования — изучить действие кверцетина на нуклеосомы.

Материалы и методы. Влияние кверцетина на структуру нуклеосом изучали методом микроскопии одиночных частиц на основе эффекта Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET). Исследования проводили на моонуклеосомах, меченных донор-акцепторной парой флуорофоров в коровой области в положениях +13 и +91 п. н. от входа ДНК в нуклеосому. Структурные изменения под действием кверцетина выявляли, измеряя эффективность FRET (E) у одиночных свободно диффундирующих нуклеосом, строя частотные распределения нуклеосом по величине E и рассчитывая относительную величину субпопуляции нуклеосом с $E < 0,3$ (LE). К данной субпопуляции относятся нуклеосомы с нарушенной укладкой ДНК на октамере гистонов.

Результаты. Обнаружено, что добавление кверцетина в концентрациях свыше 6 мкМ меняет конформацию нуклеосомной ДНК, увеличивая долю нуклеосом с LE пропорционально концентрации кверцетина: доля нуклеосом с LE без кверцетина составляла 1–5 %, а при 24 мкМ кверцетина она доходила до 40 %. Таким образом, кверцетин влияет на структуру нуклеосом, отворачивая не менее 13 п. н. нуклеосомной ДНК от октамера гистонов.

Заключение. Изменение структуры нуклеосом может быть одним из проявлений эпигенетической активности кверцетина, приводящей к увеличению доступности ДНК для белковых факторов, способных к подавлению онкогенов и реактивации генов-супрессоров опухолей.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ
(грант № 21-74-20018).*

УЧАСТИЕ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ К ПРОТЕАСОМНОМУ ИНГИБИТОРУ КАРФИЛЗОМИБУ

Е.М. Барышева, Л.А. Лалетина, А.В. Вайман,
Н.И. Моисеева

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: ms.bary@bk.ru

Ключевые слова: карфилзомиб, бортезомиб, иксазомиб, множественная миелома, лекарственная устойчивость, Р-гликопротеин

Введение. Лечение ММ начинается с ХТ, основным препаратом которой является ингибитор протеасомы бортезомиб (BTZ). BTZ входит в 1-ю линию ХТ ММ, также за последние годы появились новые ингибиторы протеасомы, такие как карфилзомиб (CFZ) и иксазомиб (IXZ), которые вошли во 2-ю и 3-ю линии терапии ММ. Однако с течением времени к CFZ развивается лекарственная устойчивость. Биология резистентности к CFZ при ММ плохо изучена. Клетки ММ, устойчивые к CFZ, демонстрируют сильную активацию Р-гликопротеина (Р-gp), в отличие от устойчивых к BTZ клеток ММ. Р-gp транспортер семейства ABC опосредует резистентность опухоли к лекарственным средствам путем модуляции абсорбции, распределения и устранения ксенобиотиков. Известно, что Р-gp экспрессируется на злокачественных плазматических клетках в периферической крови. Они представляют собой наиболее агрессивное состояние клеток ММ, их количество предопределяет неблагоприятный исход.

Цель исследования — изучение влияния белка Р-gp на формирование лекарственной устойчивости к ингибитору протеасом карфилзомибу, применяемому при терапии ММ.

Материалы и методы. Использовали клеточную линию ММ АМО-1 и ее устойчивые к ингибитору протеасомы сублинии АМО-1/BTZ, АМО-1/IXZ и АМО-1/CFZ; клетки HBL-100 (эпителиальные клетки молочной железы человека, иммортализованные вирусом SV-40) и их устойчивый вариант HBL-100/Dox, полученный путем селекции с доксорубицином. Применяли МТТ-тест для оценки цитотоксичности, проточную цитометрию (определение экспрессии белков и функциональные тесты), ПЦР в реальном времени.

Результаты. Мы обнаружили, что в клетках сублинии АМО-1/BTZ подавлялась экспрессия мРНК Р-gp, тогда как в АМО-1/CFZ она возрастала в 40 раз по сравнению с клетками исходной линии АМО-1. Следующей нашей задачей стало исследование влияния гиперэкспрессии белка Р-gp на чувствительность клеток к ингибитору протеасомы, для этого мы выбрали клеточную модель HBL-100/Dox, в которой экспрессия Р-gp наблюдается в 90 % клеточной популяции. Мы показали, что клетки сублинии HBL-100/DOX обладают

78-кратной устойчивостью к CFZ в сравнении с клетками родительской линии HBL-100, при этом чувствительность к IXZ не изменялась и была в одном диапазоне для клеток линии HBL-100 и HBL-100/Dox. Функциональные тесты по выбросу родамина 123 показали, что CFZ является субстратами P-gp, а IXZ не обладает таким свойством.

Заключение. Наличие экспрессии P-gp в клетках влияет на их чувствительность к CFZ, также CFZ способствует повышению экспрессии этого белка.

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СЕЛЕНСОДЕРЖАЩИХ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЦИТОСТАТИКОВ И ИХ КОМБИНАЦИЙ С ДОНОРОМ ОКСИДА АЗОТА

Т.Н. Богатыренко¹, Н.В. Кандалицева², Т.Е. Сашенкова¹,
Г.Ю. Аллаярова¹, Е.Н. Климанова¹, Д.В. Мищенко¹

¹ФГБУН «ФИЦ проблем химической физики
и медицинской химии РАН», Черноголовка;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный
педагогический университет», Новосибирск
e-mail: btn@icp.ac.ru

Ключевые слова: противоопухолевые цитостатики, донор оксида азота, селенсодержащие антиоксиданты, терапия онкологических заболеваний

Введение. Возможность изменения редокс-баланса опухолевых клеток специфическими гибридными полифункциональными антиоксидантами и специфическими ингибиторами ферментативных механизмов продукции активированных кислородных метаболитов открывает новое направление терапии онкологических заболеваний.

Антиоксиданты могут усиливать цитотоксические эффекты противоопухолевых препаратов, снижать их токсичность относительно нормальных клеток и сами служить противоопухолевыми агентами. Эта ситуация обычно объясняется концентрационной инверсией антиоксидантного действия (превращение в прооксидантное) и делает актуальным исследовательский интерес к синтетическим ингибиторам свободнорадикальных процессов в качестве перспективных антиоксидантных методов лечения.

Цель исследования — изучить влияние полифункционального селенсодержащего антиоксиданта 17-ПЭК-Se-K и донора оксида азота на изменение активности противоопухолевых цитостатиков — циклофосфана, цисплатина и доксорубина.

Материалы и методы. Противоопухолевую активность изучали на лимфолейкозе P388 мышей линии BDF1. Критерием эффективности служили показатели изменения средней продолжительности жизни, индекс увеличения средней продолжительности жизни (ILS, %), выживаемость.

Результаты. Было исследовано влияние комбинаций селенсодержащего производного алкилированных фенолов ППК с цитостатиками циклофосфаном, цисплатином и доксорубицином и их комбинацией с донором оксида азота (NaNO₂). Как мы и предполагали, селенсодержащие производные алкилированных фенолов превосходили по ингибирующей способности свои серосодержащие аналоги. Добавление к исследуемым композициям донора оксида азота оказывало более сильный цитотоксический эффект.

Заключение. Нами было показано, что полифункциональные селенсодержащие фенольные антиоксиданты модулируют активность противоопухолевых цитостатиков и их комбинаций с донором оксида азота.

*Работа выполнена в рамках госзадания
(№ AAAA-A19 119071890015-6).*

ЭФФЕКТИВНОЕ ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА PD-1 EX VIVO В Т-ЛИМФОЦИТАХ С ПОМОЩЬЮ САМОДОСТАВЛЯЕМОЙ МИРНК

А.А. Богданов, А.К. Емельянов, Н.А. Князев, А.А. Богданов,
А.А. Корнев, В.М. Моисеенко

ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический
научно-практический центр специализированных видов
медицинской помощи (онкологический)», Санкт-Петербург
e-mail: a.bogdanov@oncocentre.ru

Ключевые слова: Т-лимфоциты, PD-1, подавление экспрессии, миРНК

Введение. Как и все МА, ингибиторы ИКТ взаимодействуют только с рецепторами на клеточной поверхности, но не с внутриклеточными белками, которые могут быть перспективной мишенью для иммунотерапии рака. Ингибиторы ИКТ могут только блокировать рецептор (например PD-1), но не снижать уровень его экспрессии. Напротив, миРНК запускают деградацию целевой мРНК (механизм РНК-интерференции), что приводит к ингибированию синтеза белка. С помощью миРНК можно регулировать уровни экспрессии как внутриклеточных, так и внеклеточных белков-мишеней. На текущий момент основной проблемой применения миРНК в качестве действующего вещества для нового класса лекарственных средств является сложность способов их эффективной и нетоксичной доставки в клетки. Перспективным в данном направлении является использование конъюгатов дуплексов миРНК с холестерином, которые, например, могут обладать свойством самодоставки внутрь лимфоцитов.

Цель исследования — разработка и исследование активности уникальной миРНК (aPD-1siRNAchol), конъюгированной с холестерином, направленной на подавление экспрессии гена PD-1 человека.

Материалы и методы. Олигонуклеотидные последовательности дуплекса aPD-1siRNAchol были разработаны и выбраны с помощью специализированного программного обеспечения. Т-лимфоциты

периферической крови человека были получены от здоровых добровольцев и активированы стандартными методами. Характеристики Т-лимфоцитов ($CD3^+$, $PD-1^+$) и эффективность трансфекции *ex vivo* aPD-1siRNAchol, меченой FAM, оценивали с помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Подавление экспрессии гена *PD-1* оценивали с помощью количественного ПЦР-РВ. В экспериментах инкубировали 2 мкМ aPD-1siRNAchol с 5×10^5 клеток в 0,5 мл объема среды.

Результаты. Доля $CD3^+$ -клеток после активации составила 98 %. Около 20 % были *PD-1* положительными. Эффективность трансфекции FAM-меченым aPD-1siRNAchol в Т-лимфоцитах составила 40 % после 24-часовой инкубации. Такая же инкубация Т-лимфоцитов с aPD-1siRNAchol достоверно снижала уровень экспрессии *PD-1* в 4,4 ($3,25 \pm 0,81$) раза по сравнению с контролем ($0,74 \pm 0,29$ раза).

Закключение. Продemonстрирована хорошая эффективность самодоставки aPD-1siRNAchol в активированные Т-лимфоциты периферической крови человека и значительное подавление экспрессии гена *PD-1*. Полученные результаты являются первоначальным доказательством концепции использования таких самодоставляемых миРНК для иммунотерапии рака.

Работа выполнена в рамках госзадания Комитета по здравоохранению Санкт-Петербурга для ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)»

АКТИВНОСТЬ ПИРРОЛСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ, ИНГИБИРУЮЩИХ ПРОЦЕССЫ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ ТУБУЛИНА

С.В. Бойчук¹, А.Р. Галембикова^{1,2}, С.С. Зыкова³,
К.Н. Сюзев^{1,2}

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

²Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Казань;

³ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, Пермь
e-mail: boichuksergei@mail.ru

Ключевые слова: таргетная терапия, химиорезистентность, FGFR-сигнальный путь, ингибиторы тирозинкиназ

Введение. Несмотря на то что ингибиторы полимеризации тубулина широко используются для лечения различных онкологических заболеваний, быстрое развитие химиорезистентности опухолей является одним из основных факторов неблагоприятного прогноза, особенно для пациентов с метастатическими, рецидивирующими и неоперабельными формами заболеваний. Поэтому разработка новых эффективных препаратов,

влияющих на динамическое состояние микротрубочек, является актуальной научно-практической задачей.

Цель исследования — оценить цитотоксическую активность синтезированных нами пирролсодержащих соединений (ПСС) и выявить механизм их действия.

Материалы и методы. Как потенциальные ингибиторы полимеризации тубулина были синтезированы 10 новых 2-амино-1-(фуран-2-карбоксамидо)-5-(2-арил/трет-бутил-2-оксоэтилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксилатов. Для анализа их цитотоксичности были выбраны линии РМЖ HCC 1806, MDA-MB-231 и HMP1 H1299. Клеточные линии инкубировали с различными концентрациями ПСС (0,01–100 мкМ) в течение 48–72 ч. Значения IC_{50} определяли с помощью MTS-теста. Методом вестерн-блоттинга определяли уровень экспрессии белков pH3 Ser10 и pNuMA Ser395 (маркеров М-фазы клеточного цикла), а также маркеров апоптоза (расщепленные формы каспазы 3 и PARP). Была изучена способность ПСС влиять на динамическое состояние микротрубочек. Методы компьютерного моделирования (слепой и индуцированный докинг, молекулярная динамика) использовали для определения приоритетного сайта связывания ПСС на поверхности димера тубулина.

Результаты. Были отобраны 2 соединения ПСС-67 и ПСС-70 с наибольшими значениями IC_{50} . Значимое повышение уровня экспрессии pH3 Ser10 и pNuMA Ser395 свидетельствовало о их способности вызывать арест клеточного цикла в М-фазе. Основным механизмом действия ПСС явилась их способность ингибировать процессы полимеризации тубулина. Было также отмечено усиление гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза, что проявлялось усилением экспрессии расщепленных форм каспазы 3 и PARP. Методами компьютерного моделирования был определен сайт связывания колхицина как наиболее приоритетный для связывания тубулина с ПСС.

Закключение. Синтезированные соединения проявляют мощную цитотоксическую активность в отношении вышеуказанных линий опухолевых клеток за счет связывания с колхициновым сайтом молекулы тубулина, что приводит к нарушению формирования веретена деления. Полученные соединения могут быть использованы в качестве потенциальной химической платформы для разработки новых и эффективных ингибиторов полимеризации тубулина, нацеленных на сайт связывания колхицина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-15-00001).

НАТРИЙЗАВИСИМЫЙ ФОСФАТНЫЙ ТРАНСПОРТЕР NaPi2b КАК ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ МИШЕНЬ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПРИРОДЫ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Л.Ф. Булатова¹, В.С. Скрипова¹, Д.Д. Решетникова¹,
Д.В. Савенкова¹, А.К. Нургалиева¹, М.В. Богданов²,
Р.Г. Киямова¹

¹Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии,
НИЛ «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины
и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет», Казань;

²кафедра биохимии и молекулярной биологии
Техасского университета, Медицинская школа МакГоверн,
Хьюстон, США
e-mail: minigulovalf@gmail.com

Ключевые слова: NaPi2b, биомаркер, опухолеспецифический эпитоп, моноклональные антитела, таргетная противоопухолевая терапия, рак яичника

Введение. Поиск опухолеспецифических мишеней — одна из приоритетных задач молекулярной онкологии. Натрийзависимый фосфатный транспортер NaPi2b, благодаря своей мембранной локализации и повышенной экспрессии в ряде злокачественных опухолей, является привлекательной мишенью для таргетной терапии МА. Распознавание эпитопа антителами зависит от посттрансляционных модификаций, включая гликозилирование и дисульфидные связи большого внеклеточного домена NaPi2b, при этом антитела специфически аккумулируются именно в опухолевых клетках при введении их пациентам с карциномой яичника.

Цель исследования — изучение особенностей распознавания NaPi2b МА в зависимости от посттрансляционных модификаций и в условиях, имитирующих опухолевое микроокружение клеток.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проводили с применением молекулярно-генетических и клеточных подходов, включая проточную цитометрию, конфокальную микроскопию, вестерн-блоттинга, а также анализа *in silico*. Для изучения роли посттрансляционных модификаций были созданы мутантные формы NaPi2b с заменой остатков цистеина и аспарагина в области внеклеточного домена транспортера с помощью сайт-направленного мутагенеза. Для имитации опухолевого микроокружения клетки культивировали в условиях гипоксии (1 % O₂) и низкого pH (6,5).

Результаты. Нами впервые показано, что распознавание эпитопа MX35 зависит от скоординированного действия дисульфидных связей и N-гликозилирования, которые участвуют в обеспечении динамичной конформации внеклеточного домена NaPi2b, определяющей доступность эпитопа MX35 в опухолевых

клетках. При восстановлении дисульфидных связей эпитоп MX35 маскируется углеводными цепями таким образом, что он становится «скрытым» эпитопом. Мы показали, что доступность «скрытого» эпитопа MX35 для антител увеличивается в опухолевых клетках в условиях гипоксии и низкого pH, как мы полагаем, в результате изменения конформации внеклеточного домена NaPi2b вследствие реаранжировки дисульфидных связей и изменения паттерна гликозилирования в условиях опухолевого микроокружения, что делает его потенциальным опухолеспецифическим эпитопом.

Заключение. Раскрытый нами механизм существования «скрытого» эпитопа транспортера NaPi2b, который может иметь опухолеспецифическую природу, открывает широкие перспективы для разработки более специфичных противоопухолевых препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

РЕПОРТЕРНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ, НЕСУЩИЕ HiBiT-ТЭГ ДЛЯ СКРИНИНГА ХИМЕРНЫХ МОЛЕКУЛ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО ПРОТЕОЛИЗА BRD4

А.С. Бунев, Р.Э. Гасанов, А.Ю. Кудинов
ФГБОУ ВО «Тольяттинский государственный
университет», Тольятти
e-mail: brglab@ttsu.ru

Ключевые слова: PROTAC, BRD4, E3-лигаза

Введение. Начиная с 2001 г. профессор Crews из Йельского университета разрабатывает альтернативную терапевтическую стратегию для лечения социально-значимых заболеваний на основе эксплуатации внутриклеточного протеостаза (J Biol Chem 2021;296:100647). Комбинированная молекула выборочного протеолиза белка (proteolysis targeting chimera, PROTAC) — бифункциональная низкомолекулярная молекула, способная эффективно образовывать двойной комплекс с рекрутируемой E3-лигазой (CRBN, VHL, IAP и др.) и белком интереса (терапевтическая мишень), что в итоге приводит к его протеолитическому расщеплению. Эффективность стратегии подтверждается тем, что в 2021 г. на первую фазу клинических испытаний вышли 15 высокоэффективных *in vitro* PROTACs, нацеленных на различные онкомишени: AR, OR, BCL-XL, BTK, BRD9, TRK и др. (Nat Rev Drug Dis 2021;20:247). Вместе тем, подходы классического рационального дизайна химерных молекул далеки от устоявшихся, вовлечение новых клинически значимых мишеней требует тонкой настройки линкера и по-прежнему влечет за собой необходимость синтеза обширной библиотеки таких соединений. Учитывая, что на данный момент «золотым стандартом» оценки уровня деградации

белка является вестерн-блоттинг, рутинность метода не позволяет обеспечить высокую пропускную способность оценки эффективности деградации (DC50) для больших комбинаторных библиотек PROTAC. В данной работе будут представлены основные результаты по генерации нескольких репортерных линий, где белок интереса BRD4 помечен тэгом HiBiT.

Цель исследования — получение репортерных линий для оценки эффективности деградации BRD4 в скрининговом формате.

Материалы и методы. С применением Flexi Cloning System (Promega) на основе вектора pFN38K были получены плазмидные конструкции, кодирующие HiBiT-тэг, слитый с N-концом BRD4 посредством линкера Gly-Ser-Ser-Gly-Gly-Ser-Ser-Gly-Ala. В дальнейшем были получены моноклональные линии MCC-PL4C (1–8) на основе родительской линии HEK293, впоследствии трансфекции (Fugene HD) и отбора на селективном антибиотике G418. Вестерн-блоттинг проводили с применением системы Nano-Glo® HiBiT Blotting System.

Результаты. Для ряда хорошо описанных PROTAC к BRD4 (dBet6, dBet4, MZ1, ARV825) определены количественные характеристики (DC50) деградации меченого белка в репортерной линии. Определены оптимальные характеристики скрининга (плотность клеток, время инкубации, уровень экспрессии HiBiT-BRD4). Полученные количественные характеристики деградации сопоставлены с данными на основе вестерн-блоттинга.

Заключение. Определение значений DC50 возможно как в низкопропускном (96 лунок), так и высокопропускном (384 лунки) скрининговом формате и хорошо согласуется с данными, полученными методом вестерн-блоттинга.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-23-00850).

ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНО МОДИФИЦИРОВАННЫХ БЕЛКОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С КАНЦЕРОГЕНЕЗОМ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА В СРАВНЕНИИ С КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППОЙ БЕЗ ОНКОПАТОЛОГИИ

А.М. Быканова¹, Е.Б. Артюшкова², В.В. Хвостовой², И.В. Станоевич²

¹ОБУЗ «Курский онкологический научно-клинический центр им. Г.Е. Островежкова», Курск;

²ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск
e-mail: kolesnicova90@mail.ru

Ключевые слова: колоректальный рак, окислительно-модифицированные белки

Введение. Ежегодный прирост заболеваемости КРР является мировой тенденцией, что обусловлено про-

должающимся распространением «западного стиля жизни». Причины, непосредственно вызывающие инициацию и прогрессирование ненаследственного КРР, точно не установлены, однако очевидно, что способствующие факторы носят сочетанный характер. Факторы, оказывающие негативное влияние на организм человека, нарушают процессы метаболизма в органах и тканях и в первую очередь оказывают влияние на окислительно-восстановительные реакции.

Цель исследования — изучение содержания окислительно-модифицированных белков (ОМБ) в сыворотке крови пациентов с КРР и здоровых лиц.

Материалы и методы. Объект исследования — 15 здоровых лиц и 15 пациентов с диагнозом КРР, сопоставимых по клиническим показаниям, возрасту и полу. По гистологическому строению отбирали пациентов с аденокарциномой высокой и низкой степени злокачественности, со II–IV стадиями онкологического процесса до и в процессе лечения, разных возрастных групп от 40 до 75 лет, мужского и женского пола. На основе анализа плазмы крови по содержанию ОМБ проводили оценку степени повреждения клеток пациентов с КРР. Содержание ОМБ определяли на основе метода, разработанного Е.Е. Дубининой, позволяющего оценить не только окислительный потенциал организма, но и его адаптационные возможности. Конечные продукты свободнорадикального окисления белков количественно реагируют с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием альдегидных и кетонных группировок.

Результаты. Общая сумма ОМБ в сыворотке крови пациентов с КРР составила 0,275 мкг метаболита/мг белка, что на порядок выше по сравнению с значениями сыворотки крови лиц контрольной группы, различия средних значений достоверны ($p \leq 0,95$). Рост количества ОМБ в сыворотке крови пациентов с КРР свидетельствует о влиянии окислительного стресса на белковые структуры органов и тканей. Количество кетондинитрофенилгидразонов нейтрального характера в сыворотке крови пациентов с КРР в 12,2 раза превышало содержание этих белков в сыворотке крови лиц контрольной группы. Содержание кетондинитрофенилгидразонов основного характера было выше в 4,7 раза по сравнению с контрольной группой. Это свидетельствует о том, что в организме пациентов с патологией преобладают процессы агрегации белков, а у лиц контрольной группы процессы агрегации и сегментации уравновешены.

Заключение. При канцерогенезе толстого кишечника наблюдается рост процессов окислительной модификации белков. Контроль за процессами окислительной модификации белков может быть прогностически значим при диагностике стадий канцерогенеза и оценке эффективности специального метода лечения, а также в дальнейшем влиять на прогноз онкологического заболевания.

CD437 ПОВЫШАЕТ ЗАХВАТ ЖЕЛЕЗА КЛЕТКАМИ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ

А.А. Вартанян, В.С. Косоруков

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: zhivotov57@mail.ru

Ключевые слова: CD437 меланома, ферритин, CD71, ферроптоз

Введение. Аналог витамина А CD437 является агонистом γ -рецептора ретиноевой кислоты (RAR γ). Известно также, что CD437 вызывает p53-независимое повреждение ДНК с помощью механизма, независимого от пути, опосредованного RAR γ . У онкологических больных дефицит железа обнаруживается постоянно, разрушена также доставка железа к тканям.

Цель исследования — изучение влияния CD437 на метаболизм железа в клетках метастатической меланомы.

Материалы и методы. В работе были использованы 2D-культивирование клеток метастатической меланомы Mel Z, фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия.

Результаты. В присутствии CD437 ферритин стали экспрессировать все клетки (100 %; $p < 0,05$). Подобный сценарий указывает на то, что CD437, по всей видимости, способствует накоплению в клетке свободного, несвязанного железа, которое может индуцировать ферроптоз. В контрольных экспериментах без добавления CD437 уровень перекисного окисления липидов мембран, индикатора ферроптоза, был незначительным. Перекисное окисление липидов, индуцированное CD437, составляло 55 ± 5 % ($p < 0,05$) интенсивности флуоресценции, индуцированной эрастином — положительным контролем.

Закключение. CD437 повышает захват железа клетками метастатической меланомы. Низкий уровень перекисного окисления липидов мембран, индуцированного CD437, не позволяет рассматривать его как индуктор ферроптоза. Нужны дополнительные исследования для поиска мишеней, связывающих железо, альтернативные ферритину.

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ SMYD3 КАК ИНДУКТОРЫ ГИБЕЛИ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ: ВЗАИМООТНОШЕНИЯ СТРУКТУРА– АКТИВНОСТЬ

В.А. Василичин¹, А.В. Трубников¹, М.В. Иванов²,
Э.Р. Гандалипов², А. дель Рио³, Е.В. Манасова¹,
М.М. Ерохин⁴, А.А. Штиль⁵, А.В. Куркин¹

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

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет
ИТМО», Санкт-Петербург;

³Институт органического синтеза и фотореактивности,
Болонья, Италия;

⁴ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

⁵ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва
e-mail: vasilichin_vlad@mail.ru

Ключевые слова: метилтрансферазы, мишень-направленные химические соединения, нейробластома

Введение. Для совершенствования лекарственной терапии нейробластомы необходимо выявить новые механизмы выживания этой опухоли.

Цель исследования — установить роль метилтрансферазы SMYD3 как молекулярной мишени, важной для выживания опухолевых клеток.

Материалы и методы. Дизайн и синтез соединений, биоинформатический анализ баз данных, изучение гибели клеток линий нейробластомы.

Результаты. На основе 5-циклопропил-N-(пиперидин-4-ил)изоксазол-3-карбоксамид синтезирована серия новых производных EM127 — лидерного ингибитора SMYD3 (Parenti et al. Eur J Med Chem 2022;243:114683). Целевые соединения содержали замены: а) циклопропильного фрагмента на азетидиноый и введение заместителей к N атому азетидина; б) пиперидинового кольца на гомопиперидиноый фрагмент и введение метильной группы в C(4); в) хлорацетильного фрагмента на другие высокоактивные остатки. Анализ базы данных DepMap указал на нейробластома как опухоль, чувствительную к CRISPR/Cas9-опосредованной делеции гена SMYD3. При исследовании интерактома выявлены виртуальные взаимодействия SMYD3 с белками, важными для биологии нейробластомы. Соединение EM127 и отдельные новые производные вызывали гибель клеток линий IMR32 (~5 копий онкогена MYCN) и SH-SY5Y (~2 копии) в микромолярных концентрациях. Таким образом, амплификация, а также различия экспрессии MYCN не оказывают существенного влияния на чувствительность к ингибированию SMYD3. На основе EM127 синтезированы первые конъюгаты для протеолитической деградации SMYD3 (PROTAC).

Закключение. Детально разработан хемотип низкомолекулярного ингибитора метилтрансферазы SMYD3 на основе изоксазола и показана цитотоксичность лидерных соединений для клеток нейробластомы.

ВНУТРИБРЮШИННАЯ ПЕРФУЗИЯ РАСТВОРОМ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ МОЖЕТ ЗНАЧИТЕЛЬНО УВЕЛИЧИТЬ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ МЫШЕЙ С АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМой ЭРЛИХА

Н.А. Верлов^{1,2}, Л.С. Гулина¹, В.С. Бурдаков^{1,2}, Н.А. Князев²,
В.В. Клименко², А.А. Богданов², В.М. Моисеенко²

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский
институт», Гатчина;

²ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)», Санкт-Петербург
e-mail: verlov_na@pnpi.nrcki.ru

Ключевые слова: перфузия, аскорбиновая кислота, рН, аденокарцинома Эрлиха, противоопухолевая терапия

Введение. Злокачественный асцит является серьезной проблемой для лечения. Исследования потенциального противоопухолевого действия аскорбиновой кислоты ведутся с 1950-х годов. В настоящее время нет четких доказательств за или против эффективности аскорбиновой кислоты при лечении рака.

Цель исследования — оценка противоопухолевого эффекта процедуры перфузии раствором бикарбоната натрия на мышах с асцитной карциномой Эрлиха.

Материалы и методы. Мышам ICR (CD-1) внутрибрюшинно вводили суспензию из 10^6 клеток карциномы Эрлиха на мышь в 0,2 мл раствора PBS. На 7-й день после трансплантации опухоли мышам перфузировали PBS (рН0; $n = 7$) и 5 % раствор аскорбиновой кислоты (рН–; $n = 7$). В контрольную группу вошли мыши с трансплантированной опухолью без лечения (контроль; $n = 7$). Процедура перфузии включала следующие этапы: эвакуация асцита, двукратное внутрибрюшинное введение PBS или 5 % аскорбиновой кислоты с инкубацией в течение 10 мин с последующей эвакуацией и промыванием PBS. Измеряли объем асцита, концентрацию клеток в асците и рН асцита.

Результаты. Значения рН асцита составили $6,9 \pm 0,1$ во всех группах. Объем эвакуированного асцита и концентрация асцитных клеток в день перфузии между группами не различались (4,5–5,5 мл, 10^8 клеток/мл). На 7-й день после перфузии для групп рН0 и рН– концентрация клеток составляла 2×10^8 клеток/мл. Визуальный осмотр животных показал, что объем асцита в группе рН– был меньше, чем в группе рН0. Медиана выживаемости составила 11 дней для контроля, 13 дней для рН0 и 17 дней для рН– ($p < 0,001$).

Заключение. На наш взгляд, использование перфузии раствором аскорбиновой кислоты имеет большой потенциал, как в области изучения противоопухолевых эффектов аскорбиновой кислоты, так и для клинического применения для повышения эффективности лечения больных со злокачественным асцитом.

Введение. Перспективным направлением для разработки новых механизмов воздействия и молекулярно-биологических подходов к противоопухолевой терапии является применение гормона эпифиза, который способен нормализовать циркадианные ритмы, устранить десинхроноз и таким образом предотвратить опухолевую прогрессию, возникающую при данном состоянии.

Цель исследования — изучение влияния экзогенного мелатонина на рост и развитие спонтанных опухолей у самцов крыс.

Материалы и методы. Опыты проведены на 312 крысах-самцах, рандомизировано разделенных на 3 группы в возрасте 25 дней: 1-я группа находилась при постоянном освещении (24 ч; LL), 2-я — в условиях естественного освещения (NL), характеризующегося годовой фотопериодичностью; 3-я группа являлась контрольной (12 ч свет/12 ч темнота; LD). В 4 мес каждая группа была разделена на 2 подгруппы, крысам одной из которых до конца жизни 5 раз в неделю подкожно вводили пептид Ala-Glu-Asp-Gly; 2-я подгруппа являлась контрольной и получала плацебо в той же дозе. За животными наблюдали до естественной смерти. Всех погибших особей вскрывали, подвергали гистологическому исследованию, классифицировали новообразования согласно рекомендациям Международного агентства по изучению рака (МАИР).

Результаты. Нарушение светового режима оказывало модифицирующее влияние на спонтанный онкогенез у самцов крыс ($p < 0,001$). Введение гормона мелатонина существенно угнетало развитие всех и злокачественных спонтанных опухолей при любом режиме освещения. Это проявлялось в снижении частоты развития опухолей и уменьшении их числа. Под влиянием мелатонина достоверно уменьшалась частота развития лейдигом яичка (в режимах LL и NL). Если в группах контроля при всех режимах освещения обнаруживались новообразования гематопоэтической системы (злокачественные лимфомы и лейкозы), то при введении мелатонина их количество было достоверно меньше.

Заключение. Введение мелатонина крысам-самцам в условиях любого режима освещения существенно тормозит развитие спонтанных новообразований, прежде всего, лейдигом яичка и лейкозов.

СПОНТАННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ У КРЫС-САМЦОВ, ДЕСИНХРОНОЗ И МЕЛАТОНИН

И.А. Виноградова

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск
e-mail: irinav@petrsu.ru

Ключевые слова: мелатонин, десинхроноз, световые режимы, спонтанный онкогенез

ПРЕОДОЛЕНИЕ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ У КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ПУТЕМ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНГИБИТОРА СИНТЕЗА HSF1

С.А. Владимирова, А.Д. Никитина, Н.Е. Кокорева,
Л.С. Кузнецова, В.Ф. Лазарев, Б.А. Маргулис, И.В. Гужова
ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: snezhana.alexandrovna@mail.ru

Ключевые слова: колоректальный рак, комбинированная терапия, лекарственная устойчивость, HSF1

Введение. Невосприимчивость клеток сразу к нескольким лекарствам является одной из причин неутошительной статистики при РПК, в связи с чем данная проблема остается актуальным вопросом в медицине и в науке. Одним из вариантов решения является применение комбинированной терапии, что уже успешно реализуется в клинике. Многообещающим подходом кажется ингибирование транскрипционного фактора теплового шока 1 (HSF1), вовлеченного во многие процессы малигнизации раковых клеток, а также ответственного за повышение устойчивости клеток к противораковым препаратам за счет синтеза белков теплового шока. Одним из соединений, способных снижать степень активации HSF1, является CL-43, который зарекомендовал себя как эффективный вспомогательный компонент в противораковой терапии.

Цель исследования — создание комбинированной терапии с использованием ингибитора синтеза HSF1 (CL-43) для лечения резистентных клеток РПК.

Материалы и методы. Для определения чувствительности первичных клеточных линий карциномы прямой кишки (НСС) человека к ряду противоопухолевых препаратов (этопозид, 5-фторурацил, цисплатин) мы использовали методы МТТ и проточной цитометрии. Также с помощью иммуноблоттинга мы определили влияние CL-43 на количество активной формы HSF1 в клетках. Далее с использованием вышеуказанных методов оценили эффективность хлороквина и комбинации хлороквина и CL-43 в отношении наших линий. Для проверки эффективности CL-43 *in vivo* провели эксперимент с «голыми» мышами, которым с помощью гетеротопической подкожной инъекции в область левого бедра вводили клетки аденокарциномы легкого, несущие ген люциферазы. Мыши были разделены на группы по схеме лечения: контроль, этопозид, CL-43, CL-43 и этопозид. В течение месяца происходили инъекции лекарств, после этого провели биолуминесцентную прижизненную съемку опухолей. Затем с помощью цервикальной дислокации мышей умерщвляли и готовили опухолевые пробы для ПЦР в реальном времени.

Результаты. Мы обнаружили, что клетки практически нечувствительны к противораковым препаратам 1-й линии, поэтому в качестве альтернативы выбрали ингибитор аутофагии, соединение хлороквин. Блокирование 2 компонентов системы протеостаза, молекулярных шаперонов и аутофагии, приводило к практически 100 % гибели клеточной популяции. Эффективность данной комбинации была также подтверждена на линейных клетках (HCT116, DLD1).

Также мы выяснили, что использование терапии с CL-43 *in vivo* замедляет рост опухоли по сравнению с монотерапией.

Заключение. Ингибитор HSF1 CL-43 является эффективным адъювантом в терапии карциномы прямой кишки, при моделировании *in vitro* и *in vivo*.

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

КОНЬЮГАТЫ БИС(ДИКАРБОЛЛИДА) КОБАЛЬТА С КУРКУМИНОМ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ БОР-НЕЙТРОНОЗАХВАТНОЙ ТЕРАПИИ РАКА

Ю.Л. Володина¹, Л.Г. Деженкова², А.А. Друзина³

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

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

³ФГБУН «Институт элементоорганических соединений
им. А.Н. Несмеянова РАН», Москва
e-mail: uvo2003@mail.ru

Ключевые слова: бор-нейтронозахватная терапия, бис(дикарболлид) кобальта, куркумин, цитотоксичность, внутриклеточное накопление

Введение. Перспективным методом борьбы с онкологическими заболеваниями представляется бор-нейтронозахватная терапия (БНЗТ). Одной из наиболее сложных областей исследований в области БНЗТ является поиск способов селективной локализации и накопления нетоксичных борсодержащих соединений в опухолевых клетках. Важное направление поиска соединений для использования в БНЗТ — создание конъюгатов борсодержащих производных с природными соединениями, обладающими противоопухолевой активностью. В представленной работе исследовались биологические свойства новых конъюгатов бис(дикарболлида) кобальта с куркумином, содержащих до 36 атомов бора в молекуле.

Цель исследования — получение новых конъюгатов бис(дикарболлида) кобальта с куркумином, которые потенциально могут быть использованы для биологических исследований в области БНЗТ; подтверждение их нетоксичности и способности проникать в опухолевые клетки.

Материалы и методы. Конъюгаты бис(дикарболлида) кобальта с куркумином, содержащие 1 и 2 борных кластера, были получены по реакции нуклеофильного раскрытия циклических оксониевых производных бис(дикарболлида) кобальта ОН-группой/ами куркумина в присутствии K_2CO_3 . В работе использовали клетки колоректальной аденокарциномы HCT-116, лейкоза K562, а также фибробласты hFB-hTERT6. Для исследования выживаемости клеток в присутствии новых конъюгатов использовали МТТ-тест. Внутриклеточное накопление анализировали методом проточной цитометрии.

Результаты. Новые соединения не обладали антипролиферативной активностью в отношении как опухолевых клеточных линий разного тканевого происхождения (лейкоз К-562, аденокарцинома НСТ-116), так и неопухолевых клеток (фибробласты человека). Изучение динамики внутриклеточного накопления показало, что новые конъюгаты проникают в клетки НСТ116, но наблюдаются определенные различия: быстрее всех (через 2 ч) накапливался моноконъюгат диоксанового производного бис(дикарболлида) кобальта с куркумином; конъюгаты бис(дикарболлида) кобальта с куркумином, содержащие 2 борных кластера, накапливались хуже (через 48 ч ~80 % клеток содержали соединения).

Заключение. В выборке из 4 конъюгатов наилучший результат накопления показал нетоксичный моноконъюгат диоксанового производного бис(дикарболлида) кобальта с куркумином, в связи с чем он является весьма перспективным производным для дальнейших биологических исследований в качестве потенциального агента для БНЗТ.

МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ СУБЛИНИИ КЛЕТОК ОСТЕОСАРКОМЫ Saos-2 С ПРИЗНАКАМИ УСТОЙЧИВОСТИ К ИФОСФАМИДУ

А.Р. Галембикова^{1,2}, С.В. Бойчук¹

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

²Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Казань
e-mail: boichuksergei@mail.ru

Ключевые слова: остеосаркома, ифосфамид, Saos-2, резистентность, репарация XRCC1

Введение. Остеосаркома характеризуется агрессивным течением, склонностью к ранним метастазам и подразумевает проведение полихимиотерапии, включающей алкилирующий агент — ифосфамид, что неизбежно ведет к развитию системных побочных эффектов и химиорезистентности.

Цель исследования — изучение механизмов резистентности сублинии остеосаркомы, обладающей устойчивостью к ифосфамиду.

Материалы и методы. Для получения сублинии клеток остеосаркомы, резистентной к ифосфамиду, была использована клеточная линия Saos-2 (ATCC, США). Культивирование клеток проводили в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂) в культуральной среде RPMI — 1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), L-глутамина (ПанЭко, Россия) и пенициллин-стрептомицина (ПанЭко, Россия). Цитотоксичность ифосфамида, этопозида, винбластина (Sigma-aldrich, США) и доксорубина

(Selleckchem, США) определяли методом MTS. Экспрессию белков-транспортеров (MDR-1, MRP-1, ABCG2 — Santa Cruze, США) и белков-репарантов (MGMT, XRCC1 — CellSignalling, США) выявляли методом иммуноблоттинга с помощью соответствующих МА.

Результаты. Сублиния с признаками резистентности к ифосфамиду (Saos-2 Ifos-R) была получена в результате культивирования опухолевых клеток линии Saos-2 в присутствии постепенно увеличивающихся доз ифосфамида (с 1 мкМ до 2 мМ) в течение 11 мес. Было выявлено двукратное увеличение значений IC₅₀ для ифосфамида у клеток Saos-2 Ifos-R по сравнению с клетками Saos-2. Была обнаружена перекрестная резистентность клеток Saos-2 Ifos-R к доксорубину, этопозиду и винбластину, что свидетельствовало о развитии МЛУ. В пользу этого свидетельствовали данные вестерн-блоттинга, выявившие экспрессию MDR1 и ABCG2, обеспечивающих трансмембранный перенос химиопрепаратов из клеток. Также было обнаружено, что сублиния клеток Saos-2 Ifos-R гиперэкспрессировала XRCC1, принимающий участие в эксцизионной репарации оснований, по сравнению с материнской линией Saos-2. В свою очередь, экспрессия MGMT, играющего, как известно, одну из ключевых ролей в процессах прямой обратной репарации Об-алкилированных повреждений ДНК, была высокой в обеих клеточных линиях. Эти изменения в состоянии системы репарации повреждений ДНК могут обуславливать устойчивость опухолевых клеток к алкилирующим препаратам, например, к ифосфамиду.

Заключение. Была получена и охарактеризована сублиния клеток Saos-2 Ifos-R, обладающая признаками МЛУ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 21-75-00014).

МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРОИЗВОДНЫХ ТЕРИНДОЛОНА

Э.Р. Гандалипов¹, А.А. Штиль², В.В. Татарский³

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Международный научный центр SCAMT “Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies”, Санкт-Петербург;

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

³ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва
e-mail: gandalipov@scamt-itmo.ru

Ключевые слова: химиотерапия, ионный дисбаланс, транскриптомика

Введение. ХТ остается одним из наиболее популярных подходов к терапии злокачественных заболеваний. Поиск новых субстанций, обладающих высокой и селективной активностью в отношении опухолевых клеток, по-прежнему является актуальной задачей. В работе

показана подобная быстрая активность нового для терапии класса химических соединений (териндолонов) в отношении опухолевых линий клеток различного происхождения и молекулярно-генетического профиля.

Цель исследования — установить особенности механизма цитотоксичности новых производных териндолона для трансформированных клеток человека.

Материалы и методы. Исследование гибели клеток линий различного гистоморфологического и молекулярно-генетического профиля, биоинформатический анализ баз данных.

Результаты. Метилтериндолон и его аналоги вызывают гибель клеток KPP НСТ-116. В настоящей работе выявлена селективность этих соединений на серии из 60 линий различного происхождения и молекулярно-генетического профиля без очевидного кластеризующего параметра. Клетки теряют способность к адгезии; в течение первых часов инкубации с препаратом отмечены снижение электрического потенциала митохондрий, выброс Ca^{2+} в цитоплазму, развитие стресса эндоплазматического ретикулаума, деполимеризация актинового цитоскелета, генерация АФК и нарушение целостности плазматической мембраны. Маркеры апоптоза и других программируемых видов клеточной гибели не обнаружены. Сделано предположение о вовлеченности ионного дисбаланса в цитотоксический эффект метилтериндолона. Биоинформатический анализ данных количественной транскриптомики (база DerMap) выявил гены *KCNC3* и *KCNAB2* как единственные, одновременно кластеризующие устойчивые и чувствительные к метилтериндолону линии ($p < 0,001$). Продукты этих генов опосредуют ионный транспорт (каналы Kv3.3 и Kv1.2).

Заключение. Скорость развития и последовательность молекулярных событий, приводящих к гибели клеток при действии метилтериндолона и близких по структуре соединений, указывают на механизм некроза. На основании биоинформатического анализа предположена роль каналов Kv3.3 и Kv1.2 в быстром некрозе.

ВЛИЯНИЕ ОДНОНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК НА ТРАНСКРИПЦИЮ НУКЛЕОСОМ

Н.С. Герасимова¹, Н.А. Пестов², В.М. Студитский³

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

²Медицинская школа университета Ратгерса, Нью-Джерси, США;

³Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США
e-mail: shordome@gmail.com

Ключевые слова: транскрипция, нуклеосома, хроматин, РНК-полимераза 2

Введение. Одними из наиболее частых повреждений ДНК являются одонитевые разрывы. Они образуются в ходе различных процессов клеточного метаболиз-

ма и препятствуют успешному функционированию ДНК, способствуют возникновению двухнитевых разрывов, повышают нестабильность генома и могут приводить к апоптозу и раку. Генетическая дисфункция белков, участвующих в их репарации, вызывает тяжелые наследственные заболевания, наиболее часто нейродегенеративные.

За узнавание одонитевых разрывов в эукариотических клетках преимущественно отвечает белок поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP1). В транскрибируемом хроматине сигналом для начала репарации может также служить остановка РНК-полимеразы 2 (РНКП) на обрыве матрицы ДНК. В то же время узнавание скрытых в структуре хроматина разрывов нематричной цепи может быть затруднено. Ранее нами было показано, что при транскрипции РНКП 2 разрывы в нематричной цепи ДНК также могут вызывать эффективную остановку фермента, но только при расположении разрывов в определенных участках внутри нуклеосомы.

Цель исследования — продолжить изучение влияния одонитевых разрывов нематричной цепи ДНК на транскрипцию хроматина с целью установить, насколько далеко внутри нуклеосомы распространяется их ингибирующее воздействие.

Материалы и методы. Исследование проводили с использованием собранных *in vitro* одиночных нуклеосом с разрывами, расположенными в различных положениях нематричной цепи ДНК относительно границы ДНК-гистоновых взаимодействий. После транскрипции таких нуклеосом *in vitro* и детального анализа длины продуктов реакции установлено влияние разрывов ДНК на эффективность паузирования элонгирующей транскрипты РНКП.

Результаты. Определено, что паузирование РНКП в присутствии разрывов происходит внутри всей ближайшей к промотору области нуклеосомы. Ингибирующее действие может распространяться на 17 п. н. вперед. Более эффективно остановка РНКП происходит в присутствии разрывов, обращенных внутрь нуклеосомы.

Заключение. В совокупности с последними структурными исследованиями можно заключить, что в некоторых положениях РНКП (с периодичностью около 10 п. н.), по-видимому, может происходить кратковременное взаимодействие гистонов и ДНК за ферментом (на расстоянии около 20 п. н. от активного центра). В этом случае формируются транскрипционные интермедиаты, содержащие внутринуклеосомную петлю ДНК с остановленной РНКП. Петли, предположительно, имеют небольшой размер (40–60 п. н.) и стабилизируются разрывами позади фермента. Предположительно, остановка РНКП *in vivo* также может служить сигналом для узнавания системой репарации ДНК скрытых в хроматиновой структуре одонитевых разрывов ДНК и способствовать сохранению целостности генома.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-64-00001).

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАРДИОТОКСИЧНОСТИ КОНЪЮГАТОВ ДАУНОРУБИЦИНА С ЭПОКСИИЗОАЛАНТОЛАКТОНОМ И ДЕГИДРОКОСТУСЛАКТОНОМ

А.А. Глоба, А.В. Семаков, С.А. Пухов, Л.В. Аникина,
С.В. Афанасьева

*Институт физиологически активных веществ
ФГБУН «ФИЦ проблем химической физики
и медицинской химии РАН», Черноголовка
e-mail: globa271194@mail.ru*

Ключевые слова: антрациклиновая кардиотоксичность, конъюгаты даунорубицина с сесквитерпеновыми лактонами

Введение. Даунорубин (DNR) — высокоэффективный антрациклиновый антибиотик, назначаемый при ХТ различных опухолей кроветворной системы. Однако, наряду с проявлением выраженного цитостатического эффекта на онкоциты, этот препарат оказывает сильное токсическое действие на нормальные клетки. Антрациклиновая кардиотоксичность является одной из основных причин поиска аналогов, обладающих высокой антипролиферативной активностью в отношении опухолевых клеток и меньшим влиянием на кардиомиоциты. Одним из подходов к снижению кардиотоксичности DNR служит его модификация сесквитерпеновыми лактонами по атому азота даунозамина. Из серии синтезированных аналогов DNR были выбраны 2 наиболее интересных и эффективных соединения — конъюгат даунорубицина с дегидрокостуслактоном (DNR-SL62), который проявил наиболее сходное с DNR действие на клеточный цикл и морфологию клеток линии A549, и с эпоксиизоалантолактоном (DNR-L04), который имел отличные от DNR и DNR-SL62 эффекты.

Цель исследования — выявить и сравнить изменения в морфологическом состоянии миокарда левого желудочка мышей после введения DNR, DNR-L04 и DNR-SL62.

Материалы и методы. Материал исследования — сердца половозрелых самцов мышей линии C57Bl (56 особей). Были сформированы 4 группы исследования (по 14 мышей): контроль с физиологическим раствором и опытные группы с введением DNR, DNR-L04 и DNR-SL62. Введение — внутрибрюшинное, 1 раз в неделю в течение 4 нед. Раствор DNR вводили до кумулятивной дозы 5 мг/кг, конъюгаты — до 20 мг/кг. Каждая группа разделена на 2 временные точки выведения животных из эксперимента (по 7 мышей): острая фаза лечения (через 1 нед после последнего введения — закончена) и восстановительный период (через 13 нед после последнего введения — продолжается).

Гистологические препараты изготавливали по стандартной методике (Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. Медгиз, 1961), срезы сердца окра-

шивали гематоксилином и эозином, по Ли (выявление ишемии) и Вейгер-Ван Гизону (визуализация коллагеновых и эластических волокон). Дополнительно проводили морфометрию в программе ImageJ 1.5. с подсчетом удельных объемов компонентов паренхимы и стромы, а также измеряли диаметры кардиомиоцитов и их ядер с расчетом их средних значений (dcp). При статистической обработке данных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, при этом показатели считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и заключение. Состояние миокарда левого желудочка мышей, получавших DNR-L04 и DNR-SL62, в острой фазе лечения сходно с контролем.

*Работа выполнена в рамках госзадания
Института физиологически активных веществ
ФГБУН «ФИЦ проблем химической физики
и медицинской химии РАН» (№ FFSN-2021-001).*

КОМБИНАЦИЯ РЕСВЕРАТРОЛА, КУРКУМИНА И АПИГЕНИНА С ДЕКСАМЕТАЗОНОМ ИНДУЦИРУЕТ АУТОФАГИЧЕСКУЮ СМЕРТЬ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.Д. Григорьева¹, Е.М. Жидкова¹, М.Г. Якубовская¹,
Е.А. Лесовая^{1,2}

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

²ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский
университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России, Рязань
e-mail: grigodidmit@gmail.com

Ключевые слова: рак молочной железы, аутофагия, глюкокортикоиды, полифенолы, дексаметазон, ресвератрол, куркумин, апигенин

Введение. Один из наиболее распространенных типов опухолей — РМЖ. Тройной негативный РМЖ характеризуется отсутствием рецепторов-мишеней (рецептора эстрогена или HER2), в связи с этим в терапии тройного негативного РМЖ используются цитотоксические химиопрепараты. Для расширения терапевтического интервала и снижения общей токсичности основных терапевтических агентов применяют синтетические глюкокортикоиды. Известно, что глюкокортикоиды способны инициировать аутофагию в клетках крови и макрофагах. Исследование действия глюкокортикоидов в сочетании с ресвератролом, куркумином и апигенином вызывает интерес, поскольку данные соединения также способны вызывать опосредованную индукцией аутофагии клеточную смерть различных типов клеток.

Цель исследования — оценка действия ресвератрола, куркумина, апигенина в комбинации с дексаметазоном на индуцируемую аутофагию в клетках тройного негативного РМЖ.

Материалы и методы. В исследовании использовали клетки линии MDA-MB-231. Для исследования

совместного действия полифенолов и дексаметазона глюкокортикоид вносили по прошествии 4 ч инкубации с фитонутриентами. С помощью вестерн-блоттинга была оценена экспрессия ключевых мишеней белкового комплекса mTOR (pS6 и p-4E-BP1), а также экспрессия белка Beclin-1 и его фосфорилированных форм (p-Beclin-1-Ser 30/Ser 93), которые являются основными маркерами активации аутофагии.

Результаты. Ресвератрол, апигенин, куркумин в комбинации с дексаметазоном повышают количество белка Beclin-1 и его фосфорилированных форм p-Beclin-1-Ser 30 и Ser 93 в 1,5–2,5 раза, что свидетельствует об активации аутофагии.

Заключение. Полифенолы в комбинации с глюкокортикоидами активируют аутофагию в клетках РМЖ, что может способствовать снижению эффективной дозы используемых цитотоксических химиопрепаратов и переходу к более безопасным протоколам терапии РМЖ.

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

ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕОСТАЗА В СОЧЕТАННОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

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

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: irina.guzh@gmail.com

Ключевые слова: рак кишечника, молекулярные шапероны, аутофагия, хлороквин, карденолид

Введение. Механизмы белкового гомеостаза, молекулярные шапероны, аутофагия определяют жизнеспособность опухолевой клетки и ее реакцию на стрессовые и терапевтические факторы. Поскольку эти механизмы имеют большое значение для защиты клетки и снижают эффективность противоопухолевой терапии, их функция должна быть подавлена применением специальных ингибиторов. Многие из существующих ингибиторов аутофагии и шаперонов, Hsp70 и, особенно, Hsp90, действуют сами по себе, но широкое применение в клинике сдерживается их токсичностью для нормальных тканей.

Цель исследования — подтверждение значимости противоопухолевой терапии с применением комбинаций ингибиторов протеостаза по отдельности и в комбинации с противоопухолевыми препаратами.

Материалы и методы. Для анализа реакции на применение комбинаций ингибиторов аутофагии и шаперонов были выбраны трансформированные клетки различного происхождения, а также клетки, полученные от онкологических больных и переведенные в культуру. Список методов для анализа активности культур включал мониторинг клеточного роста по технологии xCELLigence, клоногенный анализ, определение кле-

точной подвижности; для определения уровня экспрессии отдельных белков использовали количественный ПЦР, иммуоблоттинг и иммуноцитохимический анализ.

Результаты. По данным исследования мы пришли к заключению о том, что ингибитор аутофагии, хлороквин, и ингибитор HSF1, CL-43, использованные в комбинациях друг с другом или с известными противоопухолевыми препаратами, обладают способностью подавлять основные механизмы, функционирующие в процессе метастазирования, ЭМП, клеточную подвижность и образование колоний. Наиболее интересные данные получены при анализе действия хлороквина и CL-43, которые порознь малоактивны, а в комбинации дают высокий противоопухолевый эффект. Величина эффекта указанных выше комбинаций варьирует в зависимости от типа опухоли, однако он отчетливо проявляется даже в экспериментах с образцами первичного рака кишечника.

Заключение. Два основных вывода, которые можно сделать на основании полученных данных, состоят, во-первых, в терапевтической значимости совершенно новой комбинации ингибиторов протеостаза и, во-вторых, в подтверждении того, что наши сочетания препаратов эффективны по отношению к опухолям от онкологических больных и поэтому могут использоваться в клинической практике.

ВЛИЯНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА, АПИГЕНИНА И КУРКУМИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ И БЕЛКОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ МЕТАСТАТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.В. Демина¹, Е.С. Лылова¹, Д.Д. Григорьева¹,
Е.М. Жидкова¹, Е.А. Лесовая^{1,2}

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

²ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»

Минздрава России, Рязань
e-mail: 99.dasha.demina@mail.ru

Ключевые слова: ресвератрол, апигенин, куркумин, рак молочной железы, метастатический потенциал

Введение. В терапии РМЖ наиболее часто в качестве адъювантных препаратов совместно с цитостатическими химиопрепаратами применяются синтетические глюкокортикоиды, однако долгосрочная терапия глюкокортикоидами может способствовать развитию ряда побочных эффектов. Так, способность глюкокортикоидов инициировать разобщение межклеточных контактов приводит к увеличению метастатического потенциала и прогрессии опухоли. Ранее в нашей лаборатории было показано, что апигенин, ресвератрол и куркумин проявили значительную антипролиферативную активность в отношении клеток опухолей

кровенотворной системы и РМЖ *in vitro*. Стоит отметить, что эффекты фитонутриентов на метастатический потенциал РМЖ ранее не были изучены.

Цель исследования — оценка эффектов фитонутриентов апигенина, ресвератрола и куркумина на метастатический потенциал клеток РМЖ *in vitro*.

Материалы и методы. В работе использовали клеточные линии РМЖ MCF7, MDA-MB-231, HCC-1954. Клетки инкубировали с нетоксическими (0,1 мкМ) дозами апигенина, ресвератрола и куркумина и их комбинациями с Dex (10 мкМ). Экспрессию генов, регулирующих целостность межклеточных контактов, оценивали количественной ПЦР, а изменение количества белка Е-кадгерина — с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты. Показано, что фитонутриенты повышают экспрессию Е-кадгерина в линии MCF7, однако добавление в схему обработки Dex приводит к ингибированию данного эффекта. Апигенин, ресвератрол и куркумин повышают экспрессию кодирующих адгезионные белки генов *FBLN1* и *GJB1* во всех клеточных линиях. Ресвератрол и куркумин подавляют экспрессию онкогенов *C-JUN* и *SphK1* в линии HCC-1954, а апигенин и ресвератрол подавляют экспрессию прометастатического гена *COL1A1* в линии MCF7.

Закключение. Апигенин, ресвератрол и куркумин снижают экспрессию ряда генов, связанных с усилением подвижности и миграции клеток, и увеличивают экспрессию ряда генов, стимулирующих адгезию. Полученные данные могут стать основой для разработки подходов к снижению побочных эффектов глюкокортикоидов, ассоциированных с усилением метастазирования.

СРЕДНЕЕ ВРЕМЯ ВЫХОДА ПЕРВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ УЗЕЛКОВ МЕЛАНОМЫ В16 КАК ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ВЫБОРА СУММАРНЫХ ДОЗ ГИБРИДНЫХ ОЛОВООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВНОМ ЭТАПЕ ПЕРВИЧНОГО СКРИНИНГА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

М.А. Додохова, М.А. Алхусен-Кулягинова, Е.М. Котиева,
В.М. Котиева, А.М. Николаенко, С.И. Старостин,
А.А. Ильина, М.Д. Ермоленко

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону
e-mail: dodohova@mail.ru

Ключевые слова: гибридные оловоорганические соединения, меланома В16, новые лекарственные средства

Введение. В России увеличивается число кандидатов на противоопухолевые лекарственные средства, находящихся на этапах доклинических и клинических исследований. Несмотря на большое количество работ, посвященных расчетным методам компьютерного изучения новых фармакологически активных молекул и оценке антипролиферативной эффективности на моделях *in vitro*, решающую роль при исследовании новых субстанций играет изучение фармакологической активности на животных. Для снижения затрат на проведение скрининговых исследований новых соединений с предполагаемым противоопухолевым действием на предварительном этапе необходимо провести выбор эффективного диагностического критерия для выбора суммарных доз для введения.

Цель исследования — оценка возможности применения критерия «среднее время выхода первых опухолевых узелков меланомы В16» на предварительном этапе изучения фармакологической активности при выборе экспериментальных суммарных доз гибридных оловоорганических соединений в основном испытании.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ экспериментальных данных, полученных на предварительном (до естественной гибели животных) и основном (эвтаназия произведена на 18-е сутки после перевивки) этапах испытания фармакологической активности бис(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметилолова (Ме-3) в суммарной дозе (СД) 250 и 375 мг/кг и 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) трифенилолова (Ме-5) в СД 150 и 250 мг/кг. Животные: мыши-самки линии С57В1/6 с подкожной перевивкой меланомы В16. Субстанции Ме-3 и Ме-5 вводили 1 раз в сутки в течение 5 дней, внутрибрюшинно через 48 ч после перевивки опухолевых клеток.

Результаты. На предварительном этапе испытания было зафиксировано увеличение среднего времени выхода первых опухолевых узелков меланомы В16 на 12 % при введении Ме-3 в СД 375 мг/кг и на 47 % при введении Ме-5 в СД 250 мг/кг. При введении Ме-3 в СД 250 мг/кг и Ме-5 в СД 150 мг/кг статистически значимых изменений среднего времени выхода первых опухолевых узелков меланомы В16 не выявлено. На основном этапе исследования фармакологической активности Ме-3 и Ме-5 была получена максимальная эффективность при введении Ме-3 в СД 375 мг/кг и Ме-5 в СД 250 мг/кг.

Закключение. Для снижения затрат на проведение основного этапа скрининговых исследований новых соединений с предполагаемым противоопухолевым действием возможно использовать критерий «среднее время выхода первых опухолевых узелков» для выбора суммарных доз на основном этапе изучения противоопухолевой и антиметастатической фармакологической активности.

СЕЛЕКТИВНАЯ ИНДУКЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА КАК ОДИН ИЗ МЕХАНИЗМОВ РЕАЛИЗАЦИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГИБРИДНЫХ ОЛОВООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

М.А. Додохова¹, И.М. Котиева¹, А.В. Сафроненко¹,
С.В. Шлык¹, Н.В. Дроботя¹, Д.Б. Шпаковский²,
Е.Р. Милаева²

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

²химический факультет ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва
e-mail: dodohova@mail.ru

Ключевые слова: гибридные оловоорганические соединения, окислительный стресс, новые лекарственные средства

Введение. Гибридные оловоорганические соединения, содержащие антиоксидантный фенольный фрагмент, обладают умеренным противоопухолевым и выраженным антималярийным действием в отношении перевиваемых солидных опухолей мышей. Соотношение про/антиоксидантных фрагментов в их молекулах определяет некоторую селективность антималярийного действия в зависимости от типа экспериментальной опухолевой модели и разнонаправленные воздействия на окислительный статус клеток.

Цель исследования — сравнительная оценка влияния бис(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенилтиолат) диметиллола (Me-3) в суммарной дозе 375 мг/кг на уровень малонового диальдегида (МДА) в первичном опухолевом узле при 5-кратном внутрибрюшинном введении мышам-самкам линии C57BL/6 с перевивной меланомой В16 в классическом и отсроченном режиме.

Материалы и методы. Исследование было выполнено на мышах-самках линии C57BL/6 ($n = 36$) в возрасте 8 нед, массой 21–22 г. Субстанцию Me-3 в суммарной дозе 375 мг/кг вводили 5-кратно внутрибрюшинно в классическом (через 48 ч после перевивки) и отсроченном (после пальпаторного определения первичных узелков опухоли на месте введения) режимах. В качестве маркера активности изменения окислительного статуса клетки первичного опухолевого узла определяли содержание МДА в гомогенате ткани иммуноферментным методом (нМ/г белка). Контрольной группе 1 % раствор желатина вводили в эквивалентных режимах и объемах. Эвтаназию животных производили на гильотине через 18 сут после перевивки опухолевых клеток.

Результаты. Установлено, что при введении Me-3 в классическом режиме содержание МДА возрастает на 44 % ($p \leq 0,05$), а в отсроченном режиме — уменьшается на 26,8 % ($p \leq 0,05$) по отношению к значениям у животных контрольной группы без лечения.

Заключение. Разнонаправленное влияние Me-3 в одинаковой суммарной дозе 375 мг/кг при различных

режимах введения на уровень МДА в ткани первичного опухолевого узла меланомы В16 позволяет отнести данное соединение к модификаторам метаболизма клеток опухолевого процесса и условно здоровых клеток организма.

ВЛИЯНИЕ МИКРООПУХОЛЕВОГО ОКРУЖЕНИЯ НА ОТВЕТ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ТЕРАПИИ ДОКСОРУБИЦИНОМ

И.Н. Дружкова¹, Е.Э. Никонова², Н.И. Игнатова¹,
А.М. Мрожеров¹, И.Г. Корякина³, М.В. Зюзин³,
Е.А. Ширшин², Д.С. Козлов⁴, Е.В. Загайнова⁴,
М.В. Ширманова¹

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

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

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург;

⁴ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского» (Университет Лобачевского), Нижний Новгород
e-mail: danirin@yandex.ru

Ключевые слова: опухолевый метаболизм, межклеточный матрикс, доксорубин

Введение. Большая часть исследований ответа опухолевых клеток на ХТ учитывает только роль факторов, связанных непосредственно с клетками. Однако известно, что компоненты ВКМ опосредуют реакцию клеток на токсическое воздействие за счет молекулярных взаимодействий и формирования механического барьера, препятствующего доступу препаратов к клеткам. Таким образом, моделирование сложных систем взаимодействия ВКМ и опухолевых клеток для определения токсического эффекта и разработка методик его оценки являются важной задачей.

Цель исследования — изучить распределение препарата доксорубин в трехмерных моделях на основе коллагенового геля и оценить метаболический ответ опухолевых клеток.

Материалы и методы. Исследовали клетки рака мочевого пузыря человека T24 и нормальные фибробласты человека. Применяли микрофлюидные системы. Для оценки структуры коллагена использовали метод генерации 2-й гармоники, для оценки метаболического кофактора НАД(Ф)Н — метод флуоресцентного времязазрешенного имиджинга FLIM (fluorescence lifetime imaging). Также применяли стандартные методы оценки выживаемости и ПЦР в реальном времени, оценивали митохондриальную активность.

Результаты. С помощью микрофлюидной системы было показано, что скорость распространения препарата доксорубин в неструктурированном коллагеновом геле наименьшая по сравнению с системами без добавления геля или при наличии структурированного фибробластами коллагена.

Метаболический имиджинг продемонстрировал, что в опухолевых клетках, культивируемых без коллагена,

наблюдалось быстрое увеличение вклада свободного НАД(Ф)Н и изменения во времени жизни НАД(Ф)Н, что в данном случае свидетельствует не о метаболических изменениях, а о поражении дыхательной цепи митохондрий. В системе же с коллагеном наблюдались изменения в противоположную сторону, что, вероятно, свидетельствует об активации митохондриального дыхания. Полученные данные были подтверждены с помощью оценки основных метаболических ферментов методом ПЦР. Оценка времени жизни флуоресценции доксорубина показала более эффективное связывание препарата с макромолекулами внутри клетки при отсутствии ВКМ. Анализ выживаемости после воздействия доксорубина выявил более высокую жизнеспособность опухолевых клеток, культивируемых в коллагеновом геле.

Заключение. Установлено, что наличие и состояние коллагенового матрикса влияют на распределение препарата доксорубина и эффективность терапии.

Работа выполнена в рамках госзадания Минздрава России (№ АААА-А20-120022590098-0).

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ К ИНФИГРАТИНИБУ (BGJ398) ОБУСЛОВЛЕНА ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ РЕЦЕПТОРА ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ 2-ГО ТИПА (FGFR2)

П.Д. Дунаев¹, В.С. Скрипова², Р.Г. Киямова²,
Д.А. Фирсова², С.В. Бойчук^{1,3}

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

²ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань;

³Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования»

Минздрава России, Казань

e-mail: dunaev Pavel@mail.ru

Ключевые слова: гастроинтестинальные стромальные опухоли, инфигратиниб (BGJ398), таргетная терапия, FGF-сигнальный путь

Введение. Для пациентов с ГИСО в качестве препарата 1-й линии таргетной терапии используется иматиниб мезилат. Ранее нами было показано, что в механизмах резистентности ГИСО к иматинибу (ИМ) важную роль играет активация FGF-сигнального пути, возникающая вследствие аутокринной гиперпродукции опухолевыми клетками FGF-2. Поэтому в настоящее время изучается возможность применения в качестве таргетной терапии ГИСО ингибиторов FGF-сигнального пути.

Цель исследования — изучить цитотоксическую активность ингибитора FGFR-сигнального пути ин-

фигратиниба (BGJ398) в отношении клеток ГИСО, резистентных к ИМ.

Материалы и методы. Из клеток ГИСО линии T1, резистентных к ИМ, обладающих гиперпродукцией FGF-2 и высокой экспрессией рецепторов FGFR1 и FGFR2, были получены 3 сублинии: с нокаутом *FGF-2*, *FGFR1* и *FGFR2*. Нокаут генов проводили с использованием эндонуклеазы Cas9 и соответствующих SgRNA. Для поддержания экспрессии Cas9 и SgRNA к клеткам добавляли антибиотики Doxycycline, Puromycin и Blasticidin S (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки культивировали в присутствии ингибитора рецепторов FGFR1—4 инфигратиниба (BGJ398) (Selleckchem, США) в концентрации 1 мкмоль/л с последующей оценкой экспрессии маркеров апоптоза (расщепленные формы PARP и каспазы 3). Пролиферативную способность клеток ГИСО оценивали с помощью клеточного анализатора iCELLigence RTCA (ACEA Biosciences, США).

Результаты. Воздействие BGJ398 на клетки ГИСО с нокаутом *FGFR1* и *FGF-2* индуцировало их массовую гибель, что подтверждалось высокой экспрессией расщепленных форм PARP и каспазы 3. В то же время в присутствии BGJ398 отмечалась выживаемость клеток ГИСО с нокаутом *FGFR2*. Полученные результаты коррелировали с изменением пролиферативной способности клеток ГИСО. В присутствии BGJ398 отмечалось резкое снижение скорости пролиферации опухолевых клеток с нокаутом *FGFR1* и *FGF-2*. В то же время скорость пролиферации клеток с нокаутом *FGFR2* снижалась незначительно.

Заключение. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что чувствительность ИМ-резистентных клеток ГИСО линии T1 к ингибитору FGF-сигнального пути инфигратинибу (BGJ398) обусловлена повышенной экспрессией рецептора FGFR2. При нокауте *FGFR2* чувствительность ГИСО к BGJ398 снижалась, о чем свидетельствовали низкий уровень экспрессии маркеров апоптоза и лишь незначительное снижение пролиферативной активности опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-015-00034 А), а также за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ФАРМАКОФОРНЫЙ СКРИНИНГ АНАЛОГОВ ТИАДИАЗОЛОВ, СЕЛЕКТИВНЫХ К КЛЕТКАМ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО А549

И.А. Елисеев, Н.А. Зефирова, Е.В. Нуриева, Е.Р. Милаева,
О.Н. Зефирова

ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва
e-mail: Ilya20031999@mail.ru

Ключевые слова: тиadiaзолы, клетки карциномы А549, антипролиферативная активность, молекулярный

докинг, молекулярная динамика, EGFR киназа, теломераза, E2F-1

Введение. На химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова проведен первичный скрининг серий производных гетероциклов и их комплексов с платиной и рутением в тесте, основанном на оценке выживаемости модифицированных линий (A549_EGFP, MCF7_EGFP, VA13_Katushka, MCF10A_Katushka) по флуоресценции экспрессируемого флуоресцентного белка. Соединения с выявленной селективностью к опухолевым клеткам по сравнению с клетками неопухолевой этиологии отобрали для дальнейшего изучения.

Цель исследования — повторно синтезировать соединения IL26, EIL26 (ряда циклических изотиомочевин) и P_3070 (производное тиadiaзола), протестировать их с помощью МТТ-теста по отношению к клеткам A549, VA13, MCF7, MCF10A, HEK93T. Выполнить фармакофорный поиск для наиболее селективного соединения, предложить возможные молекулярные мишени и провести молекулярное моделирование комплексов лиганд–мишень.

Материалы и методы. Целевые соединения синтезированы по описанным методикам. Определение цитотоксичности проведено в МТТ-тесте (MTT: Sigma-Aldrich, США) с использованием многоканального планшетного спектрофотометра (Anthos Zenyth 200rt, Biochrom, Великобритания). Молекулярное моделирование проведено с помощью программы AutoDock Vina 1.1.2, а молекулярная динамика — в силовом поле CHARMM36/CGenFF 4.4 с помощью программы GROMACS 2020.3.

Результаты. Подтверждена значимая селективность соединения P_3070 (но не соединений IL26 и EIL26) к клеткам A549 по сравнению с линией VA13. Фармакофорный поиск показал, что структура P_3070 обладает высоким химическим подобием структуре ингибитора EGFR киназы gefitinib. Результаты молекулярного докинга P_3070 в модели EGFR киназы (PDB ID: 5EDQ; PDB ID: 3W2S) подтверждают этот вывод. Однако поскольку, по данным литературы, антипролиферативное действие gefitinib в клетках A549 не зависит от ингибирования EGFR и может быть связано с ингибированием экспрессии E2F-1 и теломеразной активностью, уменьшенной экспрессией циклина D1 и др., смоделированы также комплексы P_3070 с указанными белками.

Заключение. Представляет интерес изучение EGFR- и теломеразной ингибиторной активности соединения P_3070, а также изучение соотношений структура — селективность для его аналогов.

НОВЫЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-КАРБОКСАМИДА

Е.М. Жидкова¹, Д.В. Степанчева², Л.Е. Гребенкина²,
А.В. Матвеев², Е.А. Лесовая¹

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

²ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический
университет», Москва
e-mail: zhidkova_em@mail.ru

Ключевые слова: рибавирин, опухоли кроветворной системы, производные 1,2,4-триазол-3-карбоксамида, аналоги нуклеозидов

Введение. Аналоги нуклеозидов успешно применяются в терапии ЗНО. В последние годы было показано противоопухолевое действие аналогов нуклеозидов, в частности, противовирусного агента рибавирина (1-(β-D-рибофуранозил)-1,2,4-триазол-3-карбоксамида) в отношении опухолей кроветворной системы (ОКС). Однако исследования *in vitro* и *in situ* показали, что рибавирин обладает тератогенностью и генотоксичностью, что ограничивает его применение. На кафедре биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова РТУ МИРЭА была синтезирована серия производных 1,2,4-триазол-3-карбоксамида (ТКА) с различными заместителями.

Цель исследования — оценить цитотоксическое и антипролиферативное действие 5 производных 1,2,4-триазол-3-карбоксамида на клетки ОКС и первичные культуры лимфоцитов, полученных от здоровых доноров.

Материалы и методы. В работе мы использовали культуру клеток MM RPMI 8226, острого лимфобластного лейкоза CCRF-SB и лимфоциты здоровых доноров. Клетки культивировали 24, 48 или 72 ч в присутствии исследуемых препаратов, рибавирина или растворителя диметилсульфоксида. Цитотоксический эффект оценивали после инкубации 24 ч, антипролиферативный эффект — после инкубации 48 и 72 ч методом прямого подсчета клеток с окрашиванием трипановым синим. Для 2 соединений, показавших антипролиферативный эффект, методом проточной цитофлуориметрии с окрашиванием йодистым пропидием анализировали распределение клеток по фазам клеточного цикла после 24- и 72-часовой инкубации.

Результаты. После 72 ч инкубации клеток с рибавирином, 1-(тетрагидрофуран-2-ил)-ТКА или 1-(тетрагидропиран-2-ил)-ТКА наблюдали снижение пролиферации клеток линии RPMI-8226 в 2 раза в сравнении с контролем. Показано, что данные препараты вызывают клеточный арест в фазе G1. В то же время при инкубации лимфоцитов здоровых доноров с исследуемыми препаратами цитотоксических эффектов не наблюдалось.

Заключение. Для 2 производных ТКА, содержащих в качестве заместителей тетрагидрофуранильный

и тетрагидропиранильный фрагменты, было показано антипролиферативное действие на моделях ОКС.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 23-25-00382).

ИЗУЧЕНИЕ СВЯЗИ ПОЛИМОРФНЫХ МАРКЕРОВ ГЕНОВ *ERCC2*, *ERCC5* И *ABCB1* С ОТВЕТом НА ЛЕЧЕНИЕ И АКУШЕРСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ ПОСЛЕ ХИМИОТЕРАПИИ ПРЕПАРАТАМИ ПЛАТИНЫ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ НА ФОНЕ БЕРЕМЕННОСТИ

Т.М. Заварыкина^{1,2}, М.А. Капралова¹, П.К. Бреннер¹,
Е.В. Козырко², К.Ж. де Сантана², Д.С. Ходырев³,
С.В. Хохлова²

¹ФГБУН «Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии
им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва;

³ФГБУ «ФНКЦ специализированных видов медицинской
помощи и медицинских технологий ФМБА России», Москва
e-mail: tpalievskaya@yandex.ru

Ключевые слова: полиморфный маркер, беременность, препараты платины, клинический ответ, лечебный патоморфоз, масса плаценты, масса новорожденного

Введение. Известно, что 1 на 1000 беременностей осложняется раком. При настойчивом желании женщины сохранить беременность матери может быть предложена ХТ до родоразрешения. Однако остаются дискуссионными вопросы тактики лечения у таких пациенток. В связи с минимальным объемом научной информации по данному вопросу работа по индивидуализации лечения беременных женщин с онкологическими заболеваниями является крайне актуальной. В данной работе были изучены полиморфные маркеры генов как наименее подверженные метаболическим изменениям в ходе беременности.

Цель исследования — изучение связи полиморфных маркеров генов репарации ДНК *ERCC2* (rs13181), *ERCC5* (rs17655), транспортного белка *ABCB1* (rs1045642, rs2032582) с клиническим ответом, степенью патоморфологической регрессии опухоли, параметрами новорожденного и массой плаценты у беременных женщин с онкологическими заболеваниями после ХТ препаратами платины.

Материалы и методы. В исследование была включена 31 беременная с онкологическим заболеванием, в лечении которых применяли препараты платины. У пациенток при постановке диагноза был отобран образец периферической крови, из которого выделяли ДНК и проводили генотипирование методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентными аллельспецифичными зондами на приборе CFX96 (Bio-Rad, США). Результаты определения маркера сопоставляли с кли-

ническим ответом, степенью патоморфологической регрессии опухоли с использованием метода логистической регрессии, с массой и длиной новорожденного и массой плаценты методом Манна–Уитни.

Результаты. Выявлена связь полиморфного маркера rs2032582 гена *ABCB1* с наличием полного клинического ответа опухоли при отсутствии аллеля А ($p = 0,03$) и тенденция к значимости для маркера rs1045642 гена *ABCB1* ($p = 0,08$). Данные о степени патоморфоза были доступны для 14 больных. Была выявлена связь маркера rs1045642 гена *ABCB1* с достижением полной ПР и ПР 3-й степени при носительстве аллеля G ($p = 0,006$). При носительстве аллеля G маркера rs13181 *ERCC2* наблюдался тренд к уменьшению массы новорожденного ($p = 0,08$). Обнаружена тенденция к изменению массы плаценты в зависимости от носительства аллеля G маркера rs17655 *ERCC5* и аллеля А маркера rs2032582 *ABCB1* ($p = 0,11$ и $p = 0,10$ соответственно).

Заключение. В работе выявлена связь полиморфных маркеров генов *ABCB1* с клиническим ответом и степенью патоморфоза опухоли, а также тенденция к изменению массы плаценты для маркеров генов *ERCC5* и *ABCB1* и массы новорожденного для маркера гена *ERCC2*.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА CDK8/19 (SENEXIN B) НА ВЫХОД КЛЕТОК ИЗ ИНДУЦИРОВАННОГО НИЗКОЙ ДОЗОЙ ДОКСОРУБИЦИНА КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ

М.А. Замкова^{1,2}, Н.А. Персиянцева^{1,2}, В.В. Татарский¹

¹ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

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

Минздрава России, Москва

e-mail: zamkovam@gmail.com

Ключевые слова: старение, химиотерапия, CDK8/19

Введение. Высокие дозы ХТ вызывают нежелательные побочные эффекты, тогда как снижение доз приводит к появлению фенотипа клеточного старения, что снижает результат терапии за счет, в частности, способности клеток к выходу из этой стадии и формированию агрессивных клонов. Элиминация стареющих клеток, а также последствий возникновения этого фенотипа существенно увеличит эффективность терапии.

Цель исследования — показать уникальную роль ингибитора CDK8/19 в ингибировании выхода клеток, подвергшихся воздействию низкой дозы доксорубина, из стадии клеточного старения и установить его влияние на перепрограммирование транскрипции генов, регулирующих этот выход.

Материалы и методы. Использовали следующие методы: окрашивание клеток на определение активности SA-b-Gal и кристаллическим фиолетовым, точную цитофлуометрию, количественную ПЦР, вестерн-блоттинг, микроскопию.

Результаты. На клетках A549 определили дозу доксорубина, при которой клетки входят в стадию клеточного старения, но при этом способны выйти из нее с последующим возвратом к повторной пролиферации. Эта доза оказалась в 4 раза меньше стандартно используемой дозы доксорубина на этом типе клеток (25 нМ vs 100 нМ). Воздействие на клетки этой же дозы доксорубина совместно с senexin B препятствует выходу клеток из стадии старения. Используя общепринятые подходы, мы доказали наличие фенотипа старения в обработанных клетках. Для оценки развития изменений при переходе клеток из стареющих в делящиеся при обработке доксорубином и в комбинации с senexin B мы проследили динамику изменения распределения клеток по фазам клеточного цикла в этом интервале времени и обнаружили увеличение фракции клеток в фазе SubG1 при воздействии комбинации препаратов. Кроме того, оценили влияние senexin B на ключевые регуляторы старения, апоптоза и ЭМП (p21, NF-κB, Bcl-2, Akt, PARP, Snail, Slug). Мы также провели оценку изменений в уровне этих белков, используя несколько временных точек в интервале между снятием воздействия доксорубина и выходом клеток из старения (формирование дочерних колоний). Кроме того, добавление senexin B в разные временные точки, т.е. одновременно с доксорубином, в день «отмывки» от препарата, через 3 дня после «отмывки», показало, что ингибитор CDK8/19 способен препятствовать процессу колониеобразования и при его добавлении после инкубации с доксорубином. Также оценили влияние комбинации доксорубина и senexin B на формирование колоний в другой клеточной линии (MCF7) и показали, что влияние senexin B может зависеть от типа клеток, так как в этом случае комбинация препаратов не приводила (или приводила к незначительному) снижению процесса колониеобразования.

Закключение. Применение senexin B совместно с доксорубином на клетках A549 препятствует формированию дочерних клонов, что в перспективе может улучшить эффективность терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 22-24-00212).

ПРЕДИКТИВНАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ И АБЕРРАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК ГЕНОВ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.А. Здерева, М.М. Цыганов, Н.В. Литвяков,
М.К. Ибрагимова

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: zdereva.e@gmail.com

Ключевые слова: рак молочной железы, химиочувствительность

Введение. В целях установления устойчивости и чувствительности к конкретным химиотерапевтическим препаратам для персонализации лечения онкологических больных возможно определение маркеров химиочувствительности. Экспрессия некоторых генов в опухолевые ткани связана с химиорезистентностью и прогнозом у больных РМЖ. Интерес представляют исследования хромосомных aberrаций в локусах данных генов, влияющих на уровень экспрессии генов.

Цель исследования — провести анализ связи экспрессии генов химиочувствительности *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* с эффектом НХТ.

Материалы и методы. Обследованы 97 больных с морфологически верифицированным диагнозом РМЖ люминального В подтипа и клинической стадией IIА–IIIВ. Для анализа aberrаций числа копий (CNA) проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности CytoScan™ HD Array (Affymetrix, США). Для биоинформатического анализа использовали программу Chromosome Analysis Suite 4.0. Уровень экспрессии оценивали с помощью ОТ-ПЦР. Анализ выживаемости проводили по методу Каплана–Майера.

Результаты. У больных с наличием объективного ответа на лечение экспрессия *RRM1* статистически выше по сравнению с пациентами со стабилизацией и прогрессированием ($p = 0,04$). Высокие уровни экспрессии генов *TOP2α* и *TYMS* связаны с наличием объективного ответа на лечение ($p = 0,03$). Аналогичный результат показан для гена *TUBB3* у пациентов, пролеченных таксотером в монорежиме. Высокий уровень экспрессии гена *GSTP1* сопряжен с низкой эффективностью НХТ по схеме СР ($p = 0,05$). Анализ связи наличия хромосомных aberrаций в исследуемых генах химиочувствительности у пациентов с РМЖ показал, что CNA слабо коррелирует с эффектом НХТ. Пациенты с гиперэкспрессией гена *GSTP1* имеют 100 % безметастатическую выживаемость ($\log\text{-rank } p = 0,02$). У пациентов с наличием делеции гена *RRM1* наблюдаются лучшие показатели выживаемости по сравнению с нормальной копийностью данного гена и амплификацией. Наличие амплификации гена *GSTP1* обуславливает высокую выживаемость (5-летняя безметастатическая выживаемость 86 %), тогда как при делеции данный показатель чуть превышает 50 %.

Закключение. Несмотря на весьма противоречивые результаты о предиктивной и прогностической роли экспрессии и aberrаций числа копий исследуемых генов химиочувствительности, можно сказать, что в будущем оценка данных параметров будет полезна с точки зрения персонализированного подхода к выбору химиотерапевтических препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 22-25-00499).

ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ОНКОГЕНА *HRAS*, ОПОСРЕДОВАННОЕ СТАБИЛИЗАЦИЕЙ G-КВАДРУПЛЕКСОВ В ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ

Р.Г. Зенков, Н.Ю. Карпеченко, Д.С. Набережнов,
Л.В. Эктова, В.А. Еремина, М.Г. Якубовская,
К.И. Кирсанов

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: r-zenkov@mail.ru

Ключевые слова: G-квадруплекс, G4-лиганд, вторичные метаболиты растений, люциферазный репортерный анализ, cMYC, G4-FID, регуляция экспрессии генов

Введение. G-квадруплексы (G4) — альтернативные конформации ДНК, влияющие на различные процессы в клетках человека, в том числе на экспрессию генов. Соединения, стабилизирующие G4, подавляют экспрессию онкогенов, промоторы которых обогащены этими последовательностями. Одним из таких онкогенов является *HRAS*. Для некоторых соединений класса полифенолов — вторичных метаболитов растений — была показана способность стабилизировать G4 в промоторах онкогенов.

Цель исследования — изучение взаимодействия полифенолов с G4 в промоторе гена *HRAS* и сопряженного с ним влияния на экспрессию гена.

Материалы и методы. Аффинность 11 полифенолов к 2 G4-последовательностям из промотора *HRAS* измеряли методом конкурентного вытеснения флуорофора G4-FID. Нетоксичные концентрации определяли с помощью МТТ на 2 линиях опухолевых клеток человека (HeLa и HT1080) и 2 иммortalизованных линиях (NKE и HaCaT). Влияние полифенолов на экспрессию *HRAS* оценивали методом ПЦР в реальном времени. Для доказательства влияния G4-стабилизирующего действия веществ на экспрессию *HRAS* использовали люциферазный репортерный анализ. Последовательность промотора *HRAS* была клонирована в вектор, несущий ген люциферазы светлячка. В полученную плазмиду были внесены замены, нарушающие формирование обоих G4. Исходная и мутантная плазмиды были трансфицированы в клетки HeLa.

Результаты. Методом G4-FID зарегистрирована аффинность к G4 *HRAS* для сангвинарина, EGCG, кверцетина, кемпферола и тимохинона. Наибольшую аффинность показали кверцетин и кемпферол. Оба лиганда подавляют экспрессию *HRAS* в линиях опухолевых клеток. Кверцетин снижает уровень экспрессии в клетках HeLa до 50 % и в HT1080 — до 46 %. Кемпферол подавляет экспрессию до 47 % в HT1080. В иммortalизованных линиях NKE и HaCaT кверцетин вызвал падение уровня экспрессии до 41 и 59 % соответственно. В клетках NKE кемпферол подавляет экспрессию *HRAS* до 30 %.

Результаты репортерного анализа свидетельствуют о том, что полифенолы снижают экспрессию, регулируемую промотором гена *HRAS*. Это подтверждает способность соединений стабилизировать G-квадруплексы в промоторе *HRAS*. Кверцетин подавляет экспрессию до 60 % от уровня контроля. Кемпферол снижает уровень экспрессии до 45 %.

Закключение. Полученные данные указывают на то, что кверцетин и кемпферол связывают G4 в промоторе гена *HRAS*. Благодаря аффинности к G4 и их стабилизации соединения подавляют экспрессию гена. Предположительно, это является одним из механизмов противоопухолевого действия исследуемых полифенолов.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРНЫХ ТИРОЗИНКИНАЗ НА ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ РАКЕ ПОЧКИ

Ю.Г. Ивашкова¹, Д.В. Шмат¹, Т.А. Сидорова²,
Ю.А. Хоченкова², Д.А. Хоченков², Э.Ш. Соломко²

¹ФГБОУ ВО «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии —
МВА им. К.И. Скрябина», Москва;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: ivashkovaiyilia@gmail.com

Ключевые слова: рецепторные тирозинкиназы, светлоклеточный рак почки, Т-лимфоциты

Введение. Рак почки — распространенное онкологическое заболевание, затрагивающее преимущественно лиц старшего возраста. Данная патология занимает 3-е место по распространенности среди опухолей мочеполового аппарата. Разработка новых методов лечения, в частности таргетной терапии с использованием ингибиторов рецепторных тирозинкиназ (РТК), при раке почки требует более всестороннего изучения распространения и особенности функционирования и экспрессии РТК при различных вариантах ПКР, включая экспрессию на субпопуляциях лимфоцитов периферической крови, которые изучены не полностью. В дальнейшем это поможет выбрать наиболее эффективную тактику лечения с помощью таргетных препаратов и разработать мультитаргетные ингибиторы, позволяющие воздействовать на несколько биомаркеров одновременно.

Цель исследования — определить особенности экспрессии рецепторных РТК на цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитах периферической крови пациентов со светлоклеточным раком почки и здоровых доноров.

Материалы и методы. Мононуклеары периферической крови были получены из периферической крови пациентов с светлоклеточным раком почки до получения хирургического лечения ($n = 15$) и здоровых доноров ($n = 15$) при центрифугировании в градиенте Ficoll-Paque (GE Healthcare). Экспрессию РТК

оценивали методом проточной цитометрии с флуоресцентными конъюгатами антител к PTK: VEGFR1, VEGFR2, PDGFR α , PDGFR β , FGFR1, FGFR2. Для выделения субпопуляции CD8⁺-Т-лимфоцитов использовали комбинацию антител к CD45, CD3, CD8. Результаты представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Статистическую значимость различий между сравниваемыми группами оценивали по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. При сравнении значений экспрессии VEGFR1 на CD8⁺-Т-лимфоцитах периферической крови здоровых доноров и пациентов с раком почки было установлено статистически значимое различие между группами доноров — $49,4 \pm 19,4$ % и пациентов — $28,2 \pm 11,9$ % ($p < 0,05$). При сравнении значений экспрессии VEGFR2 на CD8⁺-Т-лимфоцитах периферической крови здоровых доноров и пациентов с раком почки было установлено статистически значимое различие между группами доноров — $51,1 \pm 19,7$ % и пациентов — $27,7 \pm 10,9$ % ($p < 0,05$). Аналогичная зависимость была установлена для экспрессии CD8⁺-Т-лимфоцитов PDGFR α : $59,6 \pm 27,5$ % vs $39,5 \pm 15,1$ % и FGFR2: $43,9 \pm 19,9$ % vs $20,1 \pm 9,8$ % ($p < 0,05$). При этом статистически значимых различий для PDGFR β ($52,6 \pm 23,6$ и $51,7 \pm 20,6$ %) и FGFR1 ($38,5 \pm 20,1$ и $32,6 \pm 22,9$ %) не выявлено.

Закключение. Установлено, что у здоровых доноров уровень экспрессии VEGFR1, VEGFR2, PDGFR α , FGFR2 на Т-лимфоцитах периферической крови выше, чем у пациентов с ПКР до хирургического лечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 19-15-00442П).

АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ КОФЕРМЕНТОВ В ИММУННЫХ КЛЕТКАХ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МАРКЕР РАННЕЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОТЕРАПИИ

А.В. Изосимова¹, А.М. Можеров¹, Г.В. Шаронов²,
Е.В. Загайнова³, Д.В. Южакова¹

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

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

³ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н. И. Лобачевского»
(Университет Лобачевского), Нижний Новгород
e-mail: annizosimova@gmail.com

Ключевые слова: иммунотерапия, FLIM, НАД(Ф)Н, Т-лимфоцит

Введение. В настоящее время основной задачей в области иммунотерапии является поиск надежных маркеров, позволяющих предсказать эффективность лечения на ранних этапах. Перспективным решением может стать визуализация автофлуоресцирующих метаболитических коферментов методом FLIM. Метабо-

лический статус лимфоцитов отражает их реактивность против опухоли и может служить потенциальным индикатором раннего ответа на лечение. Однако работы по метаболическому имиджингу лимфоцитов пока единичны.

Цель исследования — изучение автофлуоресценции метаболитических коферментов в иммунных клетках в качестве потенциального маркера ранней эффективности иммунотерапии.

Материалы и методы. Исследования проводили на мышах линии C57Bl/6 FoxP3-EGFP с подкожно привитой меланомой B16F0. Иммунотерапию блокирующими анти-CTLA-4-антителами (Bio X Cell, США) (250 мкг на мышь) проводили на 7, 8, 11 и 12-й дни роста опухоли. Визуализировали свежие срезы лимфатических узлов непосредственно после забора на конфокальном микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM-приставкой TCSPC (Becker & Hickl GmbH, Германия) в канале кофермента НАД(Ф)Н (возбуждение 375 нм, регистрация в диапазоне 435–485 нм).

Результаты. На предыдущем этапе исследований мы оптимизировали методику визуализации нативной автофлуоресценции иммунных клеток и впервые показали, что она отражает активацию Т-лимфоцитов в ответ на опухоль.

В текущей работе мы исследовали особенности времени жизни автофлуоресценции в группах мышей с опухолью без лечения; мышей, ответивших (с торможением роста опухоли) и не ответивших (с выраженной опухолевой прогрессией) на терапию. Установлено, что животные-респондеры демонстрируют увеличение отношения свободной компоненты к связанной $a1/a2$ по сравнению с нереспондерами, а также с контрольными мышами без лечения с аналогичным размером опухоли. Данный эффект может быть связан со сдвигом в сторону гликолитического метаболизма, обеспечивающего повышенные потребности активированных клеток. В то же время нереспондеры показывают значительное снижение $a1/a2$ даже по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать о переключении на окислительное фосфорилирование. Данные об экспрессии активационных маркеров CD25 и CD69 в популяциях CD4⁺Th и CD8⁺ подтверждают эту гипотезу.

Закключение. Продемонстрированы чувствительность автофлуоресценции иммунных клеток в канале НАД(Ф)Н к ответу на анти-CTLA-4-иммунотерапию и потенциальная возможность использования ее в качестве маркера ранней эффективности лечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-74-00101).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ МУКОЗИТА, ВЫЗВАННОГО 5-ФТОРУРАЦИЛОМ: ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КИШЕЧНИКЕ

В.А. Исакова¹, И.А. Туманян², А.А. Штиль³

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Международный научный центр SCAMT “Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies”, Санкт-Петербург;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва
e-mail: valeri.isakova@gmail.com

Ключевые слова: 5-фторурацил, мукозит, кишечник

Введение. Мукозит развивается при применении 5-фторурацила (5-ФУ) в противоопухолевой ХТ против КРР. Этот побочный эффект характеризуется воспалением и повреждением нормальных пролиферативных тканей кишечника. Изменения в экспрессии генов, вовлеченных в индуцированное 5-ФУ повреждение кишечника, могут дать информацию о степени тяжести развития мукозита.

Цель исследования — оценить изменение экспрессии генов *Fabp1*, *Fcgbp*, *Sult1A1* и *Zg16* на модели мукозита у мышей при введении 5-ФУ при вскрытии через 24 и 72 ч.

Материалы и методы. Эксперимент проводили на 6 мышах-самках линии BALB/c (12 нед, масса 20–22 г), которые содержались в стандартных условиях и имели неограниченный доступ к корму и воде. Мыши были рандомизированы на 3 группы ($n = 2$): 1-я (интактный контроль) получала плацебо, 2-я и 3-я — однократное введение 5-ФУ в дозе 100 мг/кг массы тела в/б для индуцирования мукозита. Мыши 1-й и 2-й групп были эвтаназированы одновременно через 24 ч после введения 5-ФУ, мыши 3-й группы — через 72 ч после введения 5-ФУ. Во время аутопсии тощая кишка размером до 1 см была взята и обработана реагентом для выделения РНК для дальнейшего проведения ПЦР. Полученные значения были нормализованы на β -актин.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием ПО GraphPad Prism 8. Достоверность различий между оцениваемыми параметрами оценивали с использованием ANOVA.

Результаты. Экспрессия генов *Fcgbp*, *Sult1A1* и *Zg16* была повышена приблизительно в 1,5 раза через 72 ч после введения 5-ФУ по сравнению с интактным контролем, чем через 24 ч. Экспрессия гена *Fabp1*, наоборот, уменьшилась в 1,5 раза при вскрытии мышей через 72 ч после введения цитостатика, чем через 24 ч.

Заключение. Экспрессия изученных генов возросла сильнее спустя 72 ч после введения цитостатика в сравнении с 24 ч. Экспрессия гена *Fabp1*, однако, демонстрирует обратную тенденцию. На основе изучения механизмов влияния 5-ФУ на активность генов можно

предсказать механизмы влияния других антиметаболитов и радиотерапии, которые аналогичным образом вызывают мукозит.

ЦЕПЕЦЕНТРИЧЕСКИЕ Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ – ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ И ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.А. Калинина¹, Р.Х. Зиганшин², Ю.Ю. Силаева³,
Н.И. Шарова⁴, М.Ф. Никонова⁴, Н.А. Персиянцева¹,
Т.Г. Горькова¹, Е.Е. Антошина¹, Л.С. Трюханова¹,
А.Д. Донецкова⁴, В.В. Комогорова⁴, М.М. Литвина⁴,
А.Н. Митин⁴, М.А. Замкова¹, А.В. Брутер¹, Л.М. Хромых¹,
Д.Б. Казанский¹

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

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

³ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

⁴ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва
e-mail: aakalinina89@gmail.com

Ключевые слова: адаптивная иммунотерапия, Т-клеточный рецептор, трансдукция, трансгенез, доклиническое исследование, аллоантиген, сальмонеллез, протеом, старение

Введение. Недостаточная эффективность иммунного ответа на неоантигены опухолей и быстротекущие инфекционные заболевания во многом обусловлена длительной динамикой накопления эффекторов адаптивного иммунитета, требующего прохождения ряда циклов пролиферации клонов Т-лимфоцитов, несущих уникальные рецепторы, специфичные к антигену. Мы предлагаем подход, значительно сокращающий трудоемкость и время идентификации нужных Т-клеточных рецепторов (TCR) для создания персонифицированных клеточных продуктов, которые могут быть применены не только для терапии онкологических заболеваний, но и для создания защитного иммунитета и лечения инфекционных заболеваний, а также создания организмов с врожденной устойчивостью к ним.

Цель исследования — разработка подходов к лечению онкологических и инфекционных заболеваний с использованием цепецентрических TCR, специфичность которых определяется их альфа-цепью, и проведение спектра доклинических исследований, нацеленных на выяснение биобезопасности трансгенеза и трансдуцированных Т-клеточных продуктов.

Материалы и методы. Для идентификации цепецентрических TCR использовали активацию Т-клеток памяти предварительно иммунизированных животных антигеном в культуре *in vitro* с последующим созданием библиотек кДНК и проведением NGS-секвенирования альфа-цепей TCR. После отбора последовательностей клонов, увеличивающихся в частоте в ответ

на активацию антигеном, проводили клонирование кДНК полноразмерных альфа-цепей и их трансдукцию в Т-лимфоциты интактного донора, активированные митогеном *in vitro*. Альфа-цепи, формирующие цепецентрические TCR, идентифицировали по способности формировать специфичность лимфоцитов интактного донора к исходному антигену. После клонирования в кассетные векторы MigR1 и pTa cass последовательно использовали для трансдукции Т-лимфоцитов и трансгенеза оплодотворенных яйцеклеток соответственно. Исследование токсичности, мутагенности, канцерогенности, иммунотоксичности, аллергенности, гематологических и биохимических показателей крови, а также структуры внутренних органов животных были дополнены масс-спектрометрическим исследованием компонентов плазмы крови.

Результаты. Результаты исследований на животных, получавших инъекции трансдуцированных лимфоцитов, показали безопасность исследованного клеточного продукта. У трансгенных животных отмечалось значительное усиление клеточного ответа на специфический антиген без изменения реакции на сторонний антиген, отсутствие аутоиммунных реакций, частичное подавление гуморального иммунитета и изменения в содержании отдельных минорных компонентов плазмы крови.

Закключение. Полученные результаты подтверждают перспективность дальнейшего исследования цепецентрических TCR и их практического использования.

СОЧЕТАНИЕ ЦИКЛОФИЛИНА А И НИЗКОДОЗНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ КАК НОВЫЙ ПОДХОД К ИММУНОТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

А.А. Калинина, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский

Лаборатория механизмов регуляции иммунитета
НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва
e-mail: aakalinina89@gmail.com

Ключевые слова: циклофилин А, доксорубин, низкодозная химиотерапия, иммунотерапия

Введение. Низкодозная ХТ, в отличие от конвенциональной, не является лимфодеплетной, не вызывает иммунной супрессии и позволяет добиться значительных противоопухолевых эффектов за счет активации иммунной системы пациента. Доксорубин (DOX) в низких дозах стимулирует созревание и функции дендритных клеток (ДК), повышает противоопухолевый потенциал макрофагов и NK-клеток, активирует продукцию ИЛ-2 Т-хелперами. Ранее мы показали, что рекомбинантный циклофилин А человека (рчЦФА) подавляет рост опухоли на ранних этапах ее формирования путем стимуляции врожденного и адаптивного звеньев иммунитета и изменения опухолевого микроокружения.

Цель исследования — оценить противоопухолевый эффект сочетанного действия рчЦФА и DOX в низких дозах в экспериментальных опухолевых моделях *in vivo*.

Материалы и методы. В работе использовали меланому B16 и лимфому EL-4, которые прививали подкожно мышам линии C57BL/6 в дозе 3×10^5 (B16) и 5×10^4 кл./мышь (EL-4). После прививки опухоли на 3-й или 10-й день вводили DOX внутривенно в дозе 4 мг/кг. Через 3 ч после инъекции DOX рчЦФА и далее в течение 5 дней вводили подкожно в дозе 100 мкг/мышь. Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли (ТРО) и продолжительности жизни животных.

Результаты. В модели B16 сочетанная иммунотерапия рчЦФА и DOX с 3-го дня после прививки опухоли привела к 12-му дню после лечения к 80 % ТРО по сравнению с 60 % при монотерапии (рчЦФА/DOX). При действии рчЦФА + DOX на сформированную опухоль B16 (начало терапии — на 10-й день после прививки) ТРО на 3-й день после лечения достигло 90 % по сравнению с 40 % (рчЦФА) и 60 % (DOX). Показатели ТРО к 5-му дню после иммунотерапии составили 80 % (рчЦФА + DOX) и 60 % (DOX), эффект монотерапии рчЦФА отсутствовал. Подавление роста B16 при сочетанной терапии наблюдалось до 7-го дня после лечения (21 день после прививки опухоли) и составило 45 %, эффект монотерапий на данном сроке отсутствовал. В модели лимфомы EL-4 не выявлен сочетанный эффект рчЦФА + DOX при обеих схемах. При проведении 2 последовательных курсов комбинированной терапии (введение DOX на 3-й и 10-й дни; рчЦФА — на 3–7-й и 10–14-й дни после прививки опухоли) достигнуты подавление роста EL-4 на 70 % к 6-му дню после лечения и увеличение продолжительности жизни животных на 40 %. Эффекты монотерапии рчЦФА/DOX в данной модели отсутствовали.

Закключение. Результаты исследования показали, что рчЦФА способен значительно усиливать эффекты низкодозной DOX-ХТ, а также выявили индивидуальную чувствительность экспериментальных опухолей к данной комбинированной иммунотерапии.

ПОИСК ПРЕОДОЛЕНИЯ РЕФРАКТЕРНОСТИ В ТЕРАПИИ ПЕРВИЧНОЙ МЕДИАСТИНАЛЬНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМЫ

И.А. Камаева, И.Б. Лысенко, И.А. Новикова,
Н.Н. Тимошкина

ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону
e-mail: inkamaeva@yandex.ru

Ключевые слова: первичная медиастинальная лимфома, рефрактерность, гены, сигнальные пути

Введение. Первичная медиастинальная В-крупноклеточная лимфома (ПМВКЛ) — неходжкинская лимфома, поражающая преимущественно молодых пациентов. Ее лечение уже длительное время остается

обсуждаемым вопросом. Около трети больных остаются резистентными к проводимой терапии. В литературе описаны различные сигнальные пути, которые играют роль в патогенезе ПМБКЛ, наиболее известными из которых являются JAK-STAT и NF-κB.

Цель исследования — выявление новых молекулярных мишеней, которые в дальнейшем послужат основой новых терапевтических опций для преодоления резистентности пациентов с ПМБКЛ.

Материалы и методы. В исследование включены данные о пациентах с ПМБКЛ с 2011 по 2021 г. Опухолевый биоптат 23 пациентов был исследован методом NGS, который был выполнен на секвенаторе Illumina NextSeq 550 со средним покрытием не менее 1000x с применением таргетной панели AVENIO Tumor Expanded Panel (Roche, США), включающей 77 генов. Аналитическая чувствительность детекции мутаций — 5 %. Патогенность выявленных нуклеотидных замен оценивали согласно рекомендациям ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) и AMP (Association of Molecular Pathology). Выделение геномной ДНК проводили с использованием панели Gene Read DNA FFPE Kit (QIAGEN, Германия). Концентрацию ДНК измеряли флуориметрически на Qubit 2.0 (Life Technologies, США). Обработку данных проводили с помощью AVENIO Oncology Analysis Software. Выполнен анализ генетического материала на наличие клинически значимых мутаций.

Результаты. В ходе проведенного секвенирования выявлены полиморфизмы в генах, ранее не описанные для ПМБКЛ (*ALK*, *TP53*, *CCND3*, *RNF43*, *PIK3CA*, *FGFR3*, *SMO*, *MET*, *EZH2*). Среди мутаций выделены сигнальные пути, имеющие отношение к мутированным генам (*PI3K-AKT*, *JAK-STAT*, *RAP1*, *RAS*, *MAPK*, сигнальный путь регуляции стволовых клеток). Согласно биоинформатическому анализу наиболее значимым сигнальным путем для ПМБКЛ является FGF/FGFR3, поскольку способен активировать через фактор роста FGF все вовлеченные.

Заключение. Полиморфизмы и связь мутированных генов с сигнальными путями ПМБКЛ могут служить новыми терапевтическими мишенями для пациентов с ПМБКЛ в дальнейших клинических исследованиях. Большое значение имеет активация сигнального пути FGFR, что необходимо учитывать при планировании ЛТ пациентов, так как активность данного сигнального пути задействована в развитии рефрактерности к терапии онкологических пациентов.

МУТАЦИИ ГЕНА *PALB2* В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СВЯЗЬ С ЭФФЕКТОМ ХИМИОТЕРАПИИ И ПРОГНОЗОМ ЗАБОЛЕВАНИЯ

А.А. Карчевская¹, М.К. Ибрагимова², А.А. Хозяинова²,
М.М. Цыганов²

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск;

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: 205212mafri@gmail.com

Ключевые слова: *PALB2*, абберрации числа копий ДНК, мутации, эффективность химиотерапии, прогноз

Введение. Установлено, что потеря функции гена *PALB2* может является одной из причин наследственного РМЖ, наряду с носительством мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Пациенты с наличием мутаций *PALB2* имеют более агрессивные клинико-патологические особенности опухолевого процесса, что может отразиться на эффективности лечения и прогнозе заболевания.

Цель исследования — оценка связи абберраций числа копий ДНК и мутаций в гене *PALB2* в опухоли молочной железы с эффектом ХТ и прогнозом заболевания.

Материалы и методы. В исследование были включены 66 больных РМЖ. Для оценки наличия абберраций числа копий ДНК (CNA) использовали микроматричный анализ с помощью микроматриц высокой плотности CytoScanTMHD Array. Оценку мутаций гена проводили с использованием секвенирования на приборе MiSeq™ Sequencing System с применением панели Accel-Amplicon BRCA1, BRCA2 и PALB2 Panel.

Результаты. Частота хромосомных абберраций (делетий и амплификаций) составляет 48,5 % (32/66 пациентов), у остальных пациентов наблюдается нормальная копияность гена. Показатель 5-летней безметастатической выживаемости в группе больных с делецией *PALB2* составляет 100 % vs 83 % в группе с амплификацией (*log-rank p* = 0,04). Связь с эффектом ХТ показана на уровне выраженной тенденции (*p* = 0,07). Установлено, что при элиминации в процессе НХТ делеции со сдвигом рамки считывания с.2552delA (p.Asn851fs) наблюдается объективный ответ на лечение, тогда как при появлении данной мутации у одного пациента зафиксирована стабилизация опухолевого процесса. Кроме этого, у больных с объективным ответом на лечение были обнаружены мутации с.1706_1707del (p.Lys569fs), с.1706delA (p.Lys569fs) и с.1288delC (p.Gln467fs). В опухоли до лечения чаще всего встречались несинонимичные замены (15 из 66 пациентов). Мутация с.1676A>G (p.Gln559Arg) встречалась у 12 пациентов, у 4 из них наблюдалась полная и частичная регрессия, у 8 — стабилизация и прогрессирование. Все выявленные миссенс-мутации (с.2993G>A; с.2014G>C; с.1010T>C) отмечены у пациентов с прогрессией опухоли, но только с.1010T>C имеет патогенетическую значимость.

Заключение. Исследование гена *PALB2* имеет большой потенциал для проведения тестирования, ориентированного на диагностику, профилактику и персонализированный подход к лечению онкологических больных.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-15-00169).

ПОНИЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК MIR222HG АССОЦИИРОВАНО С РАЗВИТИЕМ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ДОЦЕТАКСЕЛУ ПРИ КАСТРАЦИОННО-РЕЗИСТЕНТНОМ РАКЕ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

И.В. Катунина, Е.А. Пудова, А.А. Кобеляцкая, А.В. Снежкина, В.С. Павлов, М.С. Федорова, Г.С. Краснов, А.В. Кудрявцева

ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва
e-mail: i.katunina125@gmail.com

Ключевые слова: рак предстательной железы, кастрационно-резистентный рак предстательной железы, доцетаксел, резистентность, MIR222HG

Введение. Кастрационно-резистентный РПЖ является крайне неблагоприятной формой заболевания, которая существенно ухудшает качество и сокращает продолжительность жизни пациентов. Стандартным лечением пациентов с кастрационно-резистентным РПЖ является ХТ цитотоксическими препаратами из класса таксанов. Однако у большинства пациентов со временем наступает неизбежное развитие резистентности, что является серьезной проблемой в области современной онкоурологии. Особый класс регуляторных молекул РНК представляют собой днРНК. При различных типах рака днРНК могут действовать как опухолевые супрессоры, так и онкогены, также было неоднократно продемонстрировано их участие в развитии и прогрессировании урологических опухолей.

Цель исследования — поиск днРНК на основе RNA-Seq-анализа, экспрессия которых может быть использована в качестве перспективных маркеров ответа на доцетаксел.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы экзосом плазмы крови 10 российских пациентов с кастрационно-резистентным РПЖ в процессе терапии доцетакселом, а также образцы PC3 клеток в процессе развития резистентности к доцетакселу. Тотальная РНК была получена с помощью наборов exoRNeasy Serum-Plasma Midi Kit (QIAGEN, Германия) и RNeasy Micro Kit (QIAGEN). Приготовление мРНК библиотек было выполнено с помощью набора KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase (Roche, Швейцария). Секвенирование было проведено на приборе NextSeq 2000. Бионформатический анализ полученных данных

был выполнен в среде R с использованием пакета edgeR.

Результаты. При сопоставлении полученных результатов наблюдалось статистически значимое понижение дифференциальной экспрессии MIR222HG в обоих наборах данных. В образцах экзосом от пациентов при прогрессировании заболевания отмечалось понижение экспрессии MIR222HG в 11,8 раза ($p = 0,01$). В случае сравнения чувствительных и резистентных к доцетакселу PC3 клеток в последних было обнаружено понижение экспрессии MIR222HG в 1,84 раза ($p = 0,00009$).

Заключение. На основе проведенного RNA-Seq-анализа была идентифицирована перспективность использования экспрессии MIR222HG в качестве потенциального маркера ответа на доцетаксел, в том числе при использовании подхода к жидкостной биопсии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-24-01093).

СВОЙСТВА ЭКДИСТЕРОНА В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ МОДЕЛЯХ ЧЕЛОВЕКА

Ю.Н. Кирдеева, О.Ю. Шувалов, А.А. Дакс, О.А. Федорова, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: yulia.kirdeeva@yandex.ru

Ключевые слова: экдистерон, доксорубицин, *Cyanotis arachnoidea*, активные формы кислорода

Введение. 20-гидроксиэкдизон (далее — экдистерон) обладает различными фармакологическими активностями. Он проявляет гипогликемические, антиоксидантные и многие другие полезные свойства. В составе БАДов экдистерон известен как анаболик. В настоящее время единственным способом получения экдистерона является его экстракция и очистка из растений-продуцентов. Подавляющее большинство препаратов экдистерона — экстракты различной степени очистки 2 растений: китайского *Cyanotis arachnoidea* и сибирского *Leuzea carthamoides*. В нескольких научных работах показана противоопухолевая активность экдистерона. При этом в исследованиях использовали экдистерон, полученный из вышеупомянутых растений, с различной степенью очистки. Поскольку очистка экдистерона до чистоты ≥ 90 % является трудноосуществимой задачей, экдистерон чистотой ≥ 97 % редко используется в экспериментах. В свою очередь, экдистеронсодержащие экстракты из растений могут содержать и другие биологически активные вещества. Это может являться причиной противоречивых результатов научных исследований. Поэтому необходимо сравнить фармакологические эффекты и лежащие в их основе молекулярные механизмы, опосредованные «чистым» экдистероном и его коммерческими концентрированными экстрактами.

Цель исследования — изучение биологических свойств «высокоочищенного» экдистерона и его коммерческого

концентрированного препарата из *Cyanotis arachnoidea* в опухолевых клеточных моделях человека.

Материалы и методы. Оценка воздействия эктистерона на пролиферацию опухолевых клеток и их устойчивость к доксорубину. Изучение влияния эктистерона на мембранный потенциал митохондрий и АФК.

Результаты. Эктистерон высокой степени очистки и коммерческий концентрированный экстракт из *Cyanotis arachnoidea* не влияли на пролиферацию опухолевых клеток. Коммерческий препарат эктистерона, в отличие от «высокоочищенного», сенсибилизировал опухолевые клетки к генотоксическому агенту доксорубину. Методом проточной цитометрии показано, что «высокоочищенный» и коммерческий экстракт эктистерона повышали уровень АФК и вызывали противоположные изменения мембранного потенциала митохондрий.

Заключение. Скорее всего, полученные результаты объясняются наличием в коммерческом экстракте эктистерона других биологически активных молекул. Основываясь на данных результатах, видно, насколько важна процедура стандартизации растительного сырья. Также необходимы дальнейшие исследования по изучению молекулярных механизмов, опосредующих эктистеронзависимую сенсибилизацию к доксорубину, для более глубокого понимания возможности использования эктистерона в адъювантной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 21-75-10138).

ПОКАЗАТЕЛЬ КОПИЙНОСТИ ГЕНОВ КАК МАРКЕР ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ К ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ

Д.С. Кутилин, Н.Н. Цаплина, Н.В. Порханова

ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, Ростов-на-Дону
e-mail: k.denees@yandex.ru

Ключевые слова: рак шейки матки, копияность генов, лучевая терапия, внеклеточная ДНК

Введение. В стандарты лечения ранней стадии РШМ входит радикальная гистерэктомия или только ЛТ, а местно-распространенные формы лечат только ЛТ. Полный клинический ответ при ЛТ достигается лишь у части пациентов, что обусловлено формированием радиорезистентности опухолевых клеток. К настоящему времени выявлен значительный перечень маркеров для предсказания ответа на ЛТ, однако ни один из них пока не вошел в клиническую практику.

Цель исследования — биоинформатический и лабораторный скрининг молекулярных маркеров для малоинвазивного определения чувствительности РШМ к ЛТ.

Материалы и методы. В исследование были включены 300 больных РШМ (IB1, IB2, ПА1, опухоль <4 см) и 30 доноров без онкопатологии. Для идентификации потенциальных маркеров проводился анализ базы данных TCGA (использован пакет TCGABiolinks языка R). Для идентификации областей генома, размер которых значительно изменялся, применяли алгоритм GISTIC. Валидацию данных биоинформатического анализа выполняли на срезах тканей из FFPE-блоков и плазме крови. С помощью ПЦР в реальном времени определяли копияность генов (CNV) в образцах ДНК, выделенной из опухолевых и нормальных клеток, и внеклеточной ДНК. Клетки из тканей выделяли с помощью лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом (Palm MicroBeam). Дистанционную ЛТ выполняли на линейном ускорителе Varian TrueBeam (VMAT/IMRT, СОД 50 Гр). Для оценки различий применяли критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони.

Результаты. По результатам ЛТ пациентки были разделены на 2 группы: 1-я — чувствительные к ЛТ ($n = 170$); 2-я — резистентные ($n = 130$). Биоинформатический анализ выявил гены, изменяющие копияность и ассоциированные с чувствительностью к ЛТ, — *YAP1*, *MIR569*, *LRRC31*, *SPRED3*, *MIR4456*, *CYP1A*, *-A2*, *CYP11A1*, *MIR4786*, *TIGD1*, *GPX4*, *ST14*, *LINC00167*, *LINC00558*, *ENOX1*, *EPSTI1*, *NEK5*, *KCTD4*, *MIR621*, *SOD2*, *MIR3939*, *ATM*, *CASP-1*, *-4*, *-5*, *CHEK1* и *H2AFX*. В 1-й группе обнаружено уменьшение ($p < 0,05$) CNV генов *H2AFX*, *ATM*, *CHEK1* и увеличение ($p < 0,05$) CNV генов *CASP-1*, *-4*, *-5*, *CYP1A1*, *-A2* и *GPX4* в опухолевых клетках. Во 2-й группе обнаружено уменьшение ($p < 0,05$) CNV *CASP4-5*, *CYP1A1*, *YAP1* и увеличение CNV ($p < 0,05$) *H2AFX*, *CHEK1* в опухолевых клетках. Также в 1-й группе обнаружено уменьшение ($p < 0,05$) CNV *H2AFX*, *ATM*, *CHEK1*, *LINC00558* и увеличение ($p < 0,05$) CNV *CASP-1*, *-4*, *-5*, *CYP1A1*, *-A2* и *GPX4* во внДНК. Во 2-й группе обнаружено уменьшение ($p < 0,05$) CNV *CASP4-5*, *CYP1A1*, *YAP1* и *MIR569* и увеличение CNV ($p < 0,05$) *H2AFX*, *ATM*, *CHEK1* во внДНК.

Заключение. Выявленные с помощью комбинации биоинформатических и молекулярных подходов маркеры — *H2AFX*, *ATM*, *CHEK1*, *MIR569*, *LINC00558*, *CASP4-5* и *CYP1A1-2* во внДНК — могут стать основой малоинвазивного определения чувствительности РШМ к ЛТ.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ДЕТЕРМИНАНТ СИГНАЛЬНОГО КАСКАДА ФЕРРОПТОЗА В CD133⁺-СТВОЛОВЫХ И CD133⁻-ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИБЛАСТОМЫ

Т.И. Кушнир, Н.Е. Арноцкая, И.А. Кудрявцев,
А.А. Митрофанов, А.Х. Бекашев, В.Е. Шевченко

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: winard2@mail.ru

Ключевые слова: стволовые клетки глиобластомы, ферроптоз, мультиформная глиобластома, протеом, масс-спектрометрия

Введение. Терапия мультиформной глиобластомы (МГБ) остается малоэффективной из-за быстроразвивающихся рецидивов опухоли, обусловленных высоким туморогенным потенциалом, резистентностью МГБ к химиолучевой терапии и повышенной диссеминацией стволовых клеток глиобластомы (СКГ). Актуальным становится идентификация потенциальных терапевтических мишеней, позволяющих более эффективно уничтожать СКГ. В связи с этим большое значение приобретает изучение ферроптоза, способного вызывать гибель опухолевых клеток с высокозлокачественным фенотипом. Однако ферроптоз и его регуляторные пути в СКГ до конца не изучены. В настоящее время также не ясно, чем отличается ферроптоз для СКГ и дифференцированных клеток глиобластомы (ДКГ).

Цель исследования — методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения изучить экспрессию детерминант сигнального каскада ферроптоза в CD133⁺-стволовых и CD133⁻-дифференцированных клетках МГБ.

Материалы и методы. Использовали протеомную масс-спектрометрию высокого разрешения и современные клеточные технологии.

Результаты. Из 1970 идентифицированных белков 15 являлись детерминантами сигнального каскада ферроптоза. В СКГ по сравнению с ДКГ обнаружена положительная регуляция 12 протеинов ферроптоза, 10 из которых (ACSL1, ACSL3, COPZ1, FTH1, FTL, GPX1, GPX4, SLC3A2, TFRC, VDAC2) имели повышенную экспрессию более чем в 2 раза и могут рассматриваться в качестве потенциальных таргетных мишеней для СКГ. Отмечена дисрегуляция в уровнях белков ферроптоза 1-го и 2-го типов, регуляторных протеинов и белков, участвующих в метаболизме железа. Согласно представленным данным, сигнальный каскад ферроптоза менее активен в CD133⁺-СКГ по сравнению с CD133⁻-ДКГ, что имеет важное значение для более эффективного уничтожения СКГ при использовании терапевтических схем, содержащих индукторы ферроптоза.

Заключение. Установлены важные закономерности в экспрессии детерминант ферроптоза и протеинов, контролирующих этот процесс в стволовых клетках МГБ, которые могут использоваться при разработке новых подходов к обнаружению потенциальных мишеней для терапии МГБ.

СОЗДАНИЕ ПАНЕЛИ КЛЕТОК С ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМИ РЕПОРТЕРАМИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ, ФОРМИРОВАНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И РАЗРАБОТКИ ПОДХОДОВ К КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

Т.Д. Лебедев, В.С. Прасолов

ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва
e-mail: lebedevtd@gmail.com

Ключевые слова: флуоресцентные репортеры, клеточные модели, визуализация, большие данные

Введение. Систематический подход к определению механизмов действия противораковых препаратов является перспективным для разработки новых подходов к противораковой терапии. Наиболее распространенным подходом к систематизации действия противораковых препаратов является анализ транскриптома или протеома клеток под их действием. Однако такие технологии требуют больших затрат. Альтернативным подходом является использование данных о морфологических изменениях в клетках под действием противораковых препаратов, которые могут быть получены с помощью флуоресцентного микроскопа. Мы дополнили данный подход флуоресцентными репортерами для измерения активности киназ ERK, AKT, p38, а также фаз клеточного цикла. Важной особенностью является возможность проводить прижизненный анализ на уровне индивидуальных клеток, что позволяет получить данные о динамике действия препаратов. Это позволяет классифицировать противораковые препараты по их влиянию на основные клеточные процессы и в будущем определять механизмы действия новых препаратов.

Цель исследования — создать панель репортерных клеток различных злокачественных заболеваний для анализа механизмов действия противораковых препаратов.

Материалы и методы. Мы создали более 30 клеточных линий, имеющих репортеры активности киназ или прогрессии клеточного цикла, которые относятся к 10 различным типам злокачественных опухолей. Визуализацию клеток и флуоресцентных репортеров проводили с помощью автоматизированного флуоресцентного микроскопа. Для программной обработки изображений были созданы алгоритмы на базе CellProfiler, Cellpose и Napari, а также алгоритмы на Python для постобработки данных.

Результаты. На настоящий момент получены данные для >2000 уникальных воздействий и 4 млн индивидуальных клеток. Мы протестировали основные классы противораковых препаратов: цитостатические химиопрепараты, таргетные ингибиторы рецепторных киназ, ингибиторы основных внутриклеточных каскадов,

эпигенетические модуляторы, ингибиторы клеточного цикла, индукторы апоптоза. Показана возможность использования панели репортерных клеток для выявления механизмов лекарственной резистентности за счет активации ERK, препаратов, индуцирующих дифференцировку, определения синергичных сочетаний противораковых препаратов и селективности действия ингибиторов.

Заключение. Полученная панель репортерных клеток и разработанные алгоритмы послужат основой для систематизированного тестирования противораковых препаратов, определения их механизмов действия и возможных синергических взаимодействий.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ С ХИМЕРНЫМИ АНТИГЕННЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ПРОТИВ МИШЕНЕЙ CD87, PD-L1 И ЛИГАНДОВ АКТИВАЦИОННОГО РЕЦЕПТОРА NKG2D ДЛЯ ОЦЕНКИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

К.А. Левчук, А.В. Петухов

ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России,
Санкт-Петербург
e-mail: ksenialevchuk2@gmail.com

Ключевые слова: CAR-T-терапия, лиганд-основанные химерные антигенные рецепторы, солидные опухоли

Введение. Разработка эффективных подходов к терапии солидных опухолей представляет собой одну из актуальных проблем онкологии. Успех адоптивной CAR-T-клеточной терапии относительно пациентов с лимфомами, ММ и регистрация 7 клеточных продуктов CAR-T в Управлении по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) позволяют охарактеризовать данный подход как мощный инструмент, перспективы применения которого в онкологии значительны и многообещающи. Разработка эффективного подхода к элиминации солидных опухолей включает поиск и оптимизацию репертуара антигенов-мишеней, обеспечивающих эффективность терапии. Паттерн экспрессии мембранных маркеров CD87, PD-L1 и лигандов активационного рецептора NKG2D различен для опухолей эпителиального происхождения, наряду с регуляцией экспрессии каждого. В настоящей работе получены конструкции химерных антигенных рецепторов к антигенам CD87, PD-L1 и лигандам активационного рецептора NKG2D, имеющие различную молекулярную структуру и механизм Т-клеточной активации.

Цель исследования — изучение эффективности цитотоксического эффекта CAR-T-клеточных продуктов относительно опухолей эпителиального происхожде-

ния, а также сравнение характера цитотоксического ответа при различном молекулярном дизайне химерных антигенных рецепторов — лиганд-основанные молекулы и классическое строение МА с добавлением активационных трансмембранных доменов.

Материалы и методы. Все конструкции химерных антигенных рецепторов были получены методами молекулярного клонирования, а также синтезом генов *de novo*. Экспрессию лигандов на клеточных линиях солидных опухолей верифицировали с помощью точной цитометрии. Специфическую эффективность CAR-T-клеток, полученных методом лентивирусной трансдукции Т-лимфоцитов, оценивали *in vitro* с помощью теста RTCA.

Результаты. В ходе работы были получены экспрессионные плазмидные векторы, несущие последовательности химерного антигенного рецептора к CD87 с участком МА и активационного домена CD28, внеклеточный домен белка PD-1 с активационным доменом CD28, полноразмерный рецептор NKG2D, слитый с участком CD3z-цепи и несущий вспомогательный активационный белок DAP-10. Клетки CAR-T с вышеупомянутыми химерными рецепторами проявляют специфическую цитотоксическую активность относительно линий-мишеней.

Заключение. С помощью использования клеток CAR-T с химерными антигенными рецепторами к антигену CD87, лигандам PD-1, лигандам NKG2D возможно получить платформу для терапии спектра солидных новообразований. Все исследуемые линии экспрессируют одновременно лиганды минимум 2 химерных антигенных рецепторов. Среди исследуемых клеточных линий HeLa, CaCo2, HepG2, H460, A431, SW837, T-47D процент экспрессии CD87 составил 90 %, PD-L1/2 — 50 %, MICA/B и ULBP1–6 — 95 % соответственно.

АКТИВАЦИЯ РЕТРОТРАНСПОЗИЦИИ LINE1 КОМБИНАЦИЯМИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ДЕСТАБИЛИЗАТОРАМИ ХРОМАТИНА В КЛЕТКАХ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

Х.М. Магомедова¹, О.А. Власова¹, И.А. Чернова¹,
А.А. Борунова¹, Т.Н. Заботина¹, К.И. Кирсанов^{1,2},
М.Г. Якубовская¹

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

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
Москва

e-mail: h_magomedova2000@mail.ru

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, вориностат, кверцетин, амсакрин, длинные диспергированные повторы

Введение. Терапевтический эффект деметилирующих агентов и ингибиторов гистоновых деацетилаз

при лечении ОМЛ связывают с активацией генов опухолевых супрессоров, обусловленной снятием эпигенетической репрессии. Особый интерес представляют комбинации препаратов с дополняющими друг друга механизмами действия, направленными на увеличение участков ДНК, доступных для факторов транскрипции. Однако при этом может наблюдаться активация экспрессии в норме репрессированных некодирующих последовательностей в гетерохроматине, в том числе ретротранспозонов LINE1, что связывают с ростом генетической нестабильности. Таким образом, для адекватной оценки перспективности использования комбинаций эпигенетически активных препаратов с различным механизмом действия необходимо учитывать их влияние на ретротранспозицию LINE1.

Цель исследования — изучение влияния ингибитора гистоновых деацетилаз вориностата, гипометилирующих агентов 5-азациитидина и децитабина, дестабилизаторов хроматина амсакрина и кверцетина и их комбинаций на экспрессию LINE1.

Материалы и методы. Уровень специфической транскрипции LINE1 оценивали методом иммунофлуоресцентного окрашивания клеток (антителами к белкам ORF1 LINE1 и H2Ax- γ) с последующим анализом распределений популяций обработанных и контрольных клеток на проточном цитометре (BD FACS Calibur). Клетки THP1 были обработаны соединениями интереса в нетоксичных концентрациях с временной экспозицией 24 ч. Популяции клеток в исследуемых пробах содержали не более 5 % апоптотических клеток. Типы взаимодействий препаратов из 2 исследуемых групп соединений определяли с помощью резазуринового теста (метода по оценке цитотоксичности) на клетках линии THP1.

Результаты. При комбинировании эпигенетически активных соединений (5-азациитидин, децитабин, вориностат) с дестабилизаторами хроматина (амсакрин, кверцетин) в ряде случаев наблюдался синергизм и потенцирующее действие препаратов. Также было показано увеличение в 2,2 и 1,8 раза количества белка ORF1 LINE1 в клетках популяции для комбинаций вориностата (10 μ M) с амсакрином (0,26 μ M) и с кверцетином (0,54 μ M) соответственно и увеличение в 4,9 и 3,2 раза количества белка H2Ax- γ для тех же комбинаций, в отличие от популяции необработанных клеток. Исследуемые соединения в тех же концентрациях, используемые по отдельности, не вызвали статистически значимого увеличения LINE1 и H2Ax- γ .

Заключение. Использование ингибитора гистоновых деацетилаз — вориностата и хроматин-дестабилизирующих соединений — кверцетина и амсакрина в комбинации приводит к появлению статистически значимого увеличения экспрессии ретротранспозонов LINE1.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-75-10163).

Flt3-L27P-ЛИГАНД В КАЧЕСТВЕ УЗНАЮЩЕГО ДОМЕНА БЕЗАНТИТЕЛЬНЫХ Flt3-CAR-T-КЛЕТОК ДЛЯ ТЕРАПИИ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА

В.Е. Майорова, М.Д. Моллаев, П.Н. Вихрева,
А.В. Кибардин, М.А. Масчан, С.С. Ларин

ФГБУ «НМИЦ детской гематологии, онкологии
и иммунологии им. Дмитрия Рогачева»
Минздрава России, Москва
e-mail: maiorova.varvara@yandex.ru

Ключевые слова: безантительные CAR-T-клетки, острый миелоидный лейкоз, Flt3, Flt3-L27P-лиганд

Введение. Безантительные Flt3-CAR-T-клетки, содержащие полноразмерную последовательность Flt3-лиганда в качестве узнающей части Flt3-CAR-рецептора, специфически таргетируют рецептор Flt3. Однако, узнавая рецептор Flt3, Flt3-CAR-T-клетки могут активировать Flt3-обусловленную пролиферацию клеток-мишеней и уход рецептора Flt3 с поверхности клеток. Ранее было показано, что Flt3-лиганд с точечной заменой L27P значительно слабее активировал Flt3 рецептор, по сравнению с Flt3-лигандом «дикого» типа. Таргетировать рецептор Flt3 с использованием последовательности Flt3-L27P-лиганда может быть безопаснее, чем с использованием последовательности Flt3-лиганда «дикого» типа, так как с меньшей вероятностью может происходить Flt3-CAR-опосредованная активация рецептора Flt3 бластных клеток и снижение его представленности на поверхности бластных клеток.

Цель исследования — получение Flt3 m-CAR-T-клеток с использованием полноразмерной последовательности Flt3-L27P-лиганда в качестве узнающей части Flt3 m-CAR-рецептора, тестирование их специфичной цитотоксичности и изучение активации Flt3 m-CAR-T-клеток.

Материалы и методы. С использованием клеток-продуцентов CHO с последующей иммуноаффинной очисткой был получен Flt3-L27P-лиганд. Его биоактивность оценивали через определение ED50 на модели стимулированной пролиферации клеток THP-1. Конструкция Flt3 m-CAR была получена методом сайт-направленного мутагенеза и упакована в лентивирусные частицы. Представленность Flt3-рецептора на поверхности клеток оценивали методом проточной цитометрии. Цитотоксичность Flt3 m-CAR-T-клеток изучали с использованием системы прижизненного наблюдения IncuCyte Live-Cell Imagine System.

Результаты. В работе был получен рекомбинантный Flt3-L27P-лиганд и определена ED50 на модельной системе стимулированной пролиферации THP-1. Лиганд Flt3-L27P в концентрации 2 нг/мл не стимулировал уход Flt3 рецептора с поверхности клеток THP-1. Получена конструкция рецептора Flt3 m-CAR, содержащего в качестве узнающего домена полноразмерный

Flt3-L27P-лиганд. Внесение мутации L27P в последовательность Flt3-лиганда для Flt3 m-CAR-рецептора не нарушило специфичность узнавания Flt3 m-CAR-T-клетками молекулы-мишени Flt3. Избыток рекомбинантного Flt3-лиганда «дикого» типа ингибировал цитотоксические свойства Flt3 m-CAR-T-клеток, тогда как избыток Flt3-L27P-лиганда не влиял на Flt3 m-CAR-T-опосредованное элиминирование Flt3-позитивных клеток ТНР-1.

Заключение. В работе были получены безантительные Flt3 m-CAR-T-клетки, содержащие в качестве узнающего домена Flt3 m-CAR-последовательность Flt3-L27P-лиганда и специфически узнающие Flt3-рецептор в *in vitro* модели ОМЛ. Сделан вывод, что Flt3 m-CAR-T-клетки с меньшей вероятностью будут активировать рецептор Flt3 в опухолевых клетках или стимулировать уход рецептора Flt3 с поверхности клеток-мишеней.

ВЛИЯНИЕ ВОРИНОСТАТА НА ЭКСПРЕССИЮ ГИСТОНОВЫХ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ

Ю.В. Макусъ, В.П. Максимова, В.Г. Попова, О.Г. Усалка, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: ymakus@yandex.ru

Ключевые слова: эпигенетическая противоопухолевая терапия, вориностат, метилирование гистонов, гистоновые метилтрансферазы

Введение. Прогрессирование онкологических заболеваний обуславливается различными изменениями в экспрессии генов, вызванными как эпигенетическими, так и генетическими aberrациями. Эпигенетические изменения обратимы, что дает возможность рассматривать хроматин-модифицирующие ферменты в качестве мишеней для противоопухолевой терапии. Вориностат — ингибитор гистоновых деацетилаз, применяемый в терапии кожной Т-клеточной лимфомы. Результаты ряда исследований продемонстрировали, что вориностат также является эффективным ингибитором ДНК-метилтрансфераз и некоторых гистоновых деметилаз. Однако активность вориностата в отношении гистоновых метилтрансфераз была изучена только для ограниченного перечня ферментов.

Цель исследования — оценка влияния вориностата на экспрессию гистоновых метилтрансфераз, изменение уровня экспрессии которых ассоциировано с прогрессией ЗНО: SUV420H1, SUV420H2, SUV39H1, SUV39H2, EZH2, DOT1L, GLP и G9a.

Материалы и методы. В исследовании использовали клетки карциномы шейки матки HeLa. Клетки инкубировали с вориностатом (5 мкМ) в течение 24 ч, после чего выделяли общую фракцию белка буфером RIPA. Далее проводили анализ влияния вориностата на экспрессию HMTs с помощью вестерн-блоттинга.

Все эксперименты были выполнены в 3 повторах. Для оценки значимости различий уровней экспрессии применяли непарный двухвыборочный t-тест Стьюдента с пороговым уровнем статистической значимости $p < 0,05$ (с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9).

Результаты. При действии вориностата было зарегистрировано снижение уровня экспрессии ферментов, отвечающих за метилирование H3K9, — SUV39H1 (1,5 раза), SUV39H2 (1,9 раза) и G9a (1,8 раза); а также уменьшение количества белков EZH2 (1,6 раза) и DOT1L (2 раза), участвующих в метилировании H3K27 и H3K79 соответственно. Кроме того, наблюдалось снижение уровня экспрессии фермента SUV420H1 (1,3 раза), отвечающего за метилирование H4K20. Для белков GLP (H3K9me2) и SUV420H2 (H4K20me2/3) статистически значимых изменений при действии вориностата показано не было.

Заключение. Нами впервые была показана способность вориностата снижать уровни экспрессии ряда HMTs, которые повышены при различных формах ЗНО. Полученные данные дают возможность рассматривать вориностат в качестве перспективного агента в терапии ЗНО с aberrантным уровнем метилирования гистонов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 21-75-10163).

АУТОИММУННЫЙ ГАПЛОТИП АН8.1 ПОДАВЛЯЕТ ПРОДУКЦИЮ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Т.Ф. Маливанова, Т.А. Астрелина, И.В. Кобзева, В.А. Никитина, Ю.Б. Сучкова, А.С. Осташкин, Д.Ю. Усупжанова, В.А. Брумберг, В.А. Брунчуков, Е.И. Добровольская, А.А. Расторгуева, Е.Е. Ломоносова, Е.С. Любаева, Е.Ю. Кретьова, Н.Г. Степанянц, М.Ю. Сухова, А.С. Самойлов

ФГБУ «ГНЦ Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва
e-mail: tmalivanova@yandex.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, фактор некроза опухоли, анти-ФНО-терапия

Введение. ФНО играет важную роль в патогенезе РМЖ. Аллель -308A полиморфизма -308(G/A)TNF входит в аутоиммунный наследственный гаплотип АН8.1, ассоциированный с повышенным уровнем сывороточного ФНО (сФНО). Ранее нами было показано снижение общей выживаемости для носителей -308A/АН8.1—.

Цель исследования — оценка влияния гаплотипа АН8.1 на уровень сФНО и клинико-морфологические характеристики больных РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены 100 больных РМЖ, получавших АДЛТ. Концен-

трацию сФНО определяли методом ИФА. Дополнительно генотипировали 30 архивных образцов ДНК первичных больных РМЖ — носителей аллеля -308A с известным уровнем сФНО. Аллели -308(G/A)TNF и маркерные аллели гаплотипа АН8.1 (HLA-A*01, HLA-B*08 и HLA-DRB1*03) определяли аллель-специфической ПЦР.

Результаты. Больные РМЖ, выделенные в группы сравнения: (а) носители -308GG гена *TNF* независимо от гаплотипа АН8.1 (76 %); (б) -308A/АН8.1— (9 %) и (в) -308A/М (АН8.1)+ носители хотя бы одного аллеля гаплотипа АН8.1 (15 %), не различались по клинико-морфологическим характеристикам. Уровень сФНО был достоверно выше в генетической группе -308A/АН8.1— по сравнению с другими больными РМЖ как до операции, так до и после АДЛТ.

Заключение. У больных РМЖ-носителей аллеля -308A гена *TNF* аутоиммунный гаплотип АН8.1 подавляет продукцию сФНО. Определена генетическая группа -308A/АН8.1— с повышенным уровнем сФНО, для которой, имея в виду ее прогностическую неблагоприятность, может быть предложена анти-ФНО-терапия, причем в ранние сроки лечения РМЖ. Полученные результаты могут быть использованы в рамках персонализированной медицины.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ PARP1–НУКЛЕОСОМА

Н.В. Малюченко¹, Д.О. Кошкина¹, А.Н. Коровина¹,
В.М. Студитский², А.В. Феофанов³

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

²Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США;

³ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад.
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва
e-mail: mal_nat@mail.ru

Ключевые слова: поли(АДФ-рибоза-)полимераза 1, PARP1, ингибитор PARP1, талазапариб, олапариб, велипариб, нуклеосомы, хроматин

Введение. Ядерный белок PARP1 вовлечен в процессы репарации, транскрипции, репликации, регуляции клеточного цикла и программируемой клеточной гибели. Нарушение метаболизма PARP1 сопряжено с развитием опухолевых, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. Ингибиторы ферментативной активности PARP1 (PARPi) используют в противоопухолевой терапии и исследуют применительно к лечению других метаболических заболеваний. Ранее на клетках обнаружено 2 механизма действия PARPi: (1) ингибирование каталитического центра фермента, (2) захват и удержание (траппинг) комплексов PARP1 в хроматине, которые могут дополнять и усиливать друг друга. При этом исследования захвата PARP1 в экспериментах на свободной ДНК дают противоречивые результаты, либо подтверждая, либо

демонстрируя отсутствие этого эффекта. Скорее всего, особенности организации ДНК в хроматине обуславливают траппинг PARPi, что требует специального изучения.

Цель исследования — изучить особенности действия ингибиторов PARP на PARP1 в хроматине, используя нуклеосомы как модельную систему.

Материалы и методы. Были сконструированы нуклеосомы, в соседние супервитки ДНК которых вводили пару флуоресцентных меток. Структурные изменения в нуклеосомах регистрировали по изменению эффективности FRET между этими метками на уровне одиночных супрамолекулярных комплексов. Стехиометрию комплексообразования PARP1 с нуклеосомами в присутствии PARP1 исследовали биохимическими методами. На нуклеосомной ДНК системе было изучено действие трех PARPi: олапариба (Ola), талазапариба (Tala) и велипариба (Veli).

Результаты. Было показано, что: 1) при отсутствии PARP1 все исследуемые ингибиторы в диапазоне концентраций 1–100 мкМ не влияют на структуру нуклеосомной ДНК; 2) действие PARPi, приводящее как к ингибированию каталитической функции PARP1, так и захвату фермента на хроматине, может воспроизводиться на ДНК в составе нуклеосом; 3) для Tala, Ola и Veli на нуклеосомах наблюдалось снижение способности удерживать PARP1 в комплексах в ряду Tala > Ola > Veli, также как это наблюдалось в клетках. Установлено, что Ola и Tala облегчают связывание PARP1 с нуклеосомами, а Veli — нет.

Заключение. Наши данные позволяют предположить, что эффективному захвату комплексов ингибиторами PARP1 способствуют топологические особенности нуклеосомной ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-74-20018).

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К ПРЕОДОЛЕНИЮ РЕЗИСТЕНТНОСТИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМ К ДЕЙСТВИЮ ХИМИОТЕРАПИИ ПОСРЕДСТВОМ ОЦЕНКИ ИХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО СТАТУСА

В.И. Мещерякова¹, М.Ю. Кордюкова², Т.О. Абакумова¹,
В.В. Белоусов²

¹РДКБ ФГАОУ ВО «РНХМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

²ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий»
ФМБА России, Москва

e-mail: valeriya.i.meshcheryakova@gmail.com

Ключевые слова: глиобластома, химиотерапия, лекарственная резистентность

Введение. Глиобластома — одна из самых распространенных опухолей головного мозга, характеризующаяся высокой агрессивностью и резистентностью к лечению. Действие ЛТ и многих химиопрепаратов

(в частности темозоломида, применяемого при лечении глиобластомы) во многом основано на индукции окислительного стресса, приводящего к гибели раковых клеток. Было показано, что опухолевые клетки могут приобретать резистентность к окислительному стрессу путем активации антиоксидантных систем, тиоредоксиновой и глутатионовой. Однако для глиобластомы не были получены целостные данные об участии упомянутых систем в формировании резистентности. Также не изучены механизмы толерантности к окислительному стрессу СКГ, которые, как правило, являются более устойчивыми к терапии, чем остальные клетки опухоли и служат движущей силой рецидивов.

Цель исследования — изучить устойчивость первичных культур СКГ к ингибиторам антиоксидантных систем.

Материалы и методы. Первичные культуры СКГ были получены из постоперационного материала, определена чувствительность СКГ к ингибитору тиоредоксиновой системы ауранофину и ингибитору синтеза глутатиона БСО, изучен окислительно-восстановительный статус клеток с помощью генетически кодируемого сенсора к пероксиду водорода (H_2O_2) HyPer7.

Результаты. Мы показали, что СКГ в целом чувствительны к ауранофину. Ауранофин также сенситизировал клетки к темозоломиду. Однако часть полученных нами культур оказалась более чувствительна к ауранофину ($n = 5$, $LC50 = 0,65 \pm 0,23$ мкМ), а другая часть — менее чувствительна ($n = 3$, $LC50 = 2,1 \pm 0,79$ мкМ). При этом на более чувствительные культуры БСО не оказывал выраженного цитотоксического действия, в то время как менее чувствительные к ауранофину СКГ оказались более восприимчивы к БСО. Мы предположили, что менее чувствительные к ауранофину культуры задействуют обе антиоксидантные системы в борьбе с окислительным стрессом. Для проверки этого предположения мы исследовали содержание основной АФК, H_2O_2 , в клетках с помощью генетически кодируемого сенсора HyPer7. В более устойчивых к ауранофину культурах после инкубации с БСО в клетках увеличивалось содержание H_2O_2 , в отличие от чувствительных к ауранофину. Также в этих клетках под действием комбинации ауранофина и БСО генерация H_2O_2 была выше, чем под действием только ауранофина.

Заключение. Большая часть СКГ высокочувствительна к ингибитору тиоредоксиновой системы. Ауранофин способен сенситизировать СКГ к действию ХТ. Некоторые культуры СКГ могут использовать также глутатионовую систему для защиты от окислительного стресса. Полученные нами данные о снижении резистентности СКГ к терапии под действием ауранофина могут служить основой для создания новых схем терапии для лечения глиобластомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-75-10151).

ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ Hsp70 С GAPDH ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК ГЛИОМЫ К ГИПОКСИИ

М.А. Микеладзе, Б.А. Маргулис, И.В. Гужова,
В.Ф. Лазарев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: marinamikeladze.cytspb@gmail.com

Ключевые слова: Hsp70, GAPDH, гипоксия, противоопухолевая терапия, глиома

Введение. Онкологические заболевания остаются серьезной проблемой для медицины и все больше исследований направлено на изучение физиологических факторов, влияющих на развитие новообразований. Одним из таких факторов является гипоксия, уровень которой в опухоли варьируется от легкой до тяжелой. Легкая гипоксия стимулирует адаптивные механизмы через активацию фактора HIF-1 α и последующее повышение уровня гликолиза. Важный участник гликолиза — фермент GAPDH, поэтому его активная форма необходима для энергетического метаболизма раковых клеток в условиях пониженной оксигенации. Вместе с тем, тяжелая гипоксия блокирует антиоксидантную систему, что ведет к накоплению ROS. Эти события влияют на химические модификации GAPDH, приводя к его агрегации. Однако раковая клетка снабжена молекулярными шаперонами, в частности Hsp70, который утилизирует белки с нарушенной конформацией, тем самым предотвращая гибель опухоли. Мы предположили, что ингибирование Hsp70-опосредованного шаперонирования поврежденного фермента будет способствовать накоплению цитотоксичных олигомеров GAPDH, а нарушение взаимодействия Hsp70 и GAPDH с помощью AEAC может стать перспективным терапевтическим подходом к лечению глиом.

Цель исследования — установить роль комплекса Hsp70—GAPDH в устойчивости клеток глиомы к гипоксии.

Материалы и методы. В качестве модели была выбрана клеточная линия глиомы головного мозга крысы С6. Гипоксию *in vitro* имитировали с помощью активатора HIF-1 α — CoCl₂. Изменение метаболической активности клеток С6 в зависимости от уровня гипоксии определяли с помощью методов застарения царапины, МТТ и образования колоний, а уровень экспрессии GAPDH и Hsp70 фиксировали с использованием ПЦР в реальном времени. Накопление белковых продуктов и агрегатов анализировали методами иммуноблоттинга и дотблоттинга соответственно. Способность AEAC препятствовать образованию комплекса проверяли с помощью иммунопреципитации и «сэндвич» — ИФА. Физиологическое значение уровня GAPDH и нарушение его взаимодействия с Hsp70 во время гипоксии исследовали на модели глиомы крысы *in vivo*.

Результаты. Мы установили, что легкая гипоксия повышала количество и синтез GAPDH, активировала пролиферацию и образование колоний в клетках С6, в то время как острая гипоксия приводила к накоплению цитотоксических олигомеров фермента и гибели раковых клеток. Вместе с тем препарат АЕАС уже в микромолярных концентрациях препятствовал взаимодействию Hsp70 с GAPDH, индуцируя агрегацию фермента и дальнейшую гибель опухолевой массы. Действие АЕАС как терапевтического средства было также продемонстрировано на животной модели.

Заключение. Таким образом, АЕАС нарушает Hsp70-опосредованное шаперонирование GAPDH, что приводит к последующей денатурации фермента, образованию цитотоксичных агрегатов и способствует гибели опухолевых клеток в условиях гипоксии.

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

АКТИВНОСТЬ ХОНОКИОЛА В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПЕРВИЧНОЙ И ПРИОБРЕТЕННОЙ ГОРМОНРЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ

Е.И. Михеевич¹, Д.В. Сорокин¹, О.Е. Андреева¹,
Ф.Б. Богданов^{1,2}, А.М. Щербаков¹

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

²факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО
«МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва
e-mail: k.mihayevich@gmail.com

Ключевые слова: лигнаны, рак молочной железы, хонокиол, апоптоз, Bcl-2, ERα

Введение. Опухолевые заболевания до сих пор представляют собой значительную проблему для современной медицины во всем мире, в том числе в связи с высокой токсичностью противоопухолевых агентов и развитием резистентности опухоли к их воздействию. В последние десятилетия значительное внимание уделяется противоопухолевым соединениям растительного происхождения, особенно лигнанам. Накоплен значительный объем данных об их активности *in vitro* и *in vivo* в отношении разных типов опухолей, а также о возможных механизмах ее реализации.

Цель исследования — оценка активности ряда лигнанов, в том числе хонокиола, в отношении клеток РМЖ и исследование влияния хонокиола на сигнальные пути в комбинации с метформином.

Материалы и методы. Линии клеток РМЖ человека MCF7 (гормонозависимая), MDA-MB-231, SKBR3 (гормоннезависимые) были получены из АТСС. Гормонрезистентная сублиния MCF7/HT была получена путем длительного культивирования клеток MCF7 с гидрокситамоксифеном. Лигнаны арктиин, хонокиол, матаиресиноп, пиноресиноп, мирислиган, энтеродиол и энтеролактон были произведены Sigma и Cayman

Chemical. Оценку антипролиферативной активности соединений проводили с помощью метода МТТ. Экспрессию белков сигнальных путей оценивали с помощью иммуноблоттинга.

Результаты. На 1-м этапе исследования была проведена оценка антипролиферативной активности лигнанов в диапазоне концентраций 3–50 мкМ на линиях клеток РМЖ с различным уровнем гормональной зависимости. В качестве лидирующего соединения был выбран хонокиол: значения IC₅₀ для хонокиола в отношении клеток РМЖ составляли 12–20 мкМ, тогда как IC₅₀ других лигнанов превышали 50 мкМ. Далее оценивали влияние хонокиола в концентрации значительно ниже IC₅₀ на сигнальные пути клеток MCF7 и MCF7/HT, связанные с их выживаемостью, индивидуально и в сочетании с ингибитором комплекса I митохондрий метформином. Эффекты хонокиола в комбинации с метформином были более выражены в гормонорезистентных клетках MCF7/HT. Комбинация хонокиола с метформином индуцировала в них выраженный апоптоз, что подтверждено накоплением расщепленной формы PARP, а также снижала экспрессию Bcl-2 и ERα.

Заключение. Хонокиол продемонстрировал значительную антипролиферативную активность в отношении как гормонозависимого РМЖ линии MCF7, так и линий с первичной и приобретенной гормонорезистентностью. Комбинация метформина с хонокиолом в низких дозах эффективно индуцирует апоптоз в гормонорезистентных клетках. Хонокиол представляет интерес как доступное природное соединение, проявляющее антипролиферативную активность в отношении РМЖ, включая резистентные формы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-25-00628).

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ SRC-КИНАЗ В ВЫЖИВАНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК

А.М. Михеева, Т.Д. Лебедев, В.С. Прасолов

ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва
e-mail: alesyamikheeva@gmail.com

Ключевые слова: SRC-киназы, корреляция, ингибиторы

Введение. Киназы семейства SRC — это нерецепторные тирозинкиназы, которые вовлечены в передачу сигнала, делая важный вклад в регуляцию пролиферации, деления, апоптоза, миграции и адгезии. Семейство SRC включает 11 белков, активность которых зависит от типа клеток. Известно, что сбой в регуляции фосфорилирования киназ приводит к нарушению передачи сигнала, что способствует развитию злокачественных опухолей. Ингибирование SRC является перспективным направлением в области лечения онкологии, однако действие ингибиторов осложнено

функциональной избыточностью киназ SRC, сложной взаимной регуляцией и различным паттерном экспрессии в тканях человека.

Цель исследования — выявление роли отдельных киназ семейства SRC в выживании злокачественных клеток различной природы, что позволит выявить типы злокачественных опухолей, наиболее чувствительных к ингибированию SRC.

Материалы и методы. Уровень экспрессии SRC-киназ был измерен методом ПЦР в реальном времени. Определение концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) для препаратов бозутиниб, дазатиниб, саракатиниб, бафетиниб, gefитиниб, кабозантиниб и доксорубицин было проведено на основе подсчетов клеток в камере Нойбауера через 72 ч на линиях 10 типов рака. Далее была рассчитана корреляционная зависимость Спирмена (r) между уровнем экспрессии SRC-киназ и чувствительности клеток к ингибиторам.

Результаты. Полученные данные свидетельствуют о наличии статистически значимой прямой корреляционной зависимости между экспрессией гена *FGR* и значением IC_{50} бозутиниба, дазатиниба и саракатиниба, а также экспрессией *LCK* и *IC50* бозутиниба, *HCK* и IC_{50} саракатиниба. Кроме того, зафиксировано изменение уровня экспрессии рецепторных тирозинкиназ под действием ингибиторов. Анализ применения ингибиторов SRC в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами показал, что синергия наблюдается на линии H1299 у дазатиниба с кабозантинибом и на линии A549 у бозутиниба с gefитинибом.

Заключение. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что клетки с высокой экспрессией генов *FGR*, *LCK* и *HCK* менее подвержены действию ингибиторов SRC, а также о потенциале использования ингибиторов SRC для комбинированной терапии.

СРАВНЕНИЕ ИНДЕКСА КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67 В КУЛЬТУРАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ОПУХОЛЕЙ ЛЮМИНАЛЬНЫХ В ПОДТИПОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

А.С. Могиленских, Е.В. Гребенюк, Ф.А. Фадеев,
С.В. Сазонов, С.М. Демидов

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
Екатеринбург;

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Екатеринбург
e-mail: annasajler@yandex.ru

Ключевые слова: Ki-67, первичная клеточная культура

Введение. Одной из наиболее важных характеристик для РМЖ является его потенциал роста. Индекс клеточной пролиферации Ki-67 рекомендован в качестве биомаркера прогноза и чувствительности опухолевых клеток к гормональной терапии и ХТ. Первичные клеточные культуры используются как модели для пер-

сонализированной терапии, однако данных об изменении этого показателя при культивировании недостаточно.

Цель исследования — оценить изменение уровня Ki-67 на ранних пассажах при получении первичных клеточных культур РМЖ.

Материалы и методы. Материал был получен от 6 пациенток с РМЖ, образец опухоли измельчали и помещали в смесь ферментов на ночь. После диссоциации раствор центрифугировали при 0,7 RPM (30 с), супернатант сливали. Полученный осадок дважды ресуспендировали ферментами: трипсином и смесью диспаза — ДНКазы, после чего смесь разбавляли HF (раствор Хэнкса с 10 % FBS) 1:1 и центрифугировали при 1,4 RPM (5 мин). Супернатант повторно сливали, затем помещали в питательную среду Mammocult (STEMCELL, Канада) во флаконы 5 мл. Иммуноцитохимическую реакцию осуществляли в автостейнере (DAKO, Дания). Для опеределения индекса клеточной пролиферации использовали антитела Ki-67 (Clone SP6, Spring Bioscience, США). Ядра клеток докрашивали гематоксилином. Для статистической обработки определялось среднее арифметическое значение, стандартная ошибка среднего арифметического, а также ДИ для среднего. Для сравнительного анализа независимых количественных переменных использовали анализ четырехпольных таблиц сопряженности, χ^2 -критерий, критерий значимости различий $p \leq 0,05$.

Результаты. При сравнении уровня индекса клеточной пролиферации в культурах РМЖ, полученных от опухолей люминального В HER2-негативного подтипа, с культурами, полученными от опухолей люминального В HER2-позитивного подтипа, были обнаружены значимые различия на 1-м пассаже. В 1-й группе средний уровень Ki-67 составил $51,3 \pm 3,5$ % (ДИ 44,4–58,2; $p = 0,001$), во 2-й — $6 \pm 1,9$ % (ДИ 2–9 %). Достоверных различий между группами на 2-м пассаже не обнаружено, уровень Ki-67 составил $19,5 \pm 1,5$ % (ДИ 16,6–22,4) и $22,1 \pm 5,6$ % (ДИ 11–32) соответственно. На 3-м пассаже уровень пролиферации составил $20,1 \pm 3$ % (ДИ 12–25) и $42,7 \pm 3,1$ % (ДИ 36,5–48,9; $p = 0,001$).

Заключение. Уровень клеточной пролиферации Ki-67 при получении первичных клеточных культур изменяется на ранних пассажах. Имеются значимые различия показателя на 1-м и 3-м пассажах между культурами, полученными от опухолей люминального В HER2-негативного подтипа РМЖ, и культурами, полученными от опухолей люминального В HER2-позитивного подтипа.

РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ СООТНОШЕНИЙ ВОРИНОСТАТА И ДОКСОРУБИЦИНА ДЛЯ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ С ПОМОЩЬЮ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ

М.Р. Моллаева, Н.Г. Яббаров, М.Б. Сокол, М.В. Чиркина,
Е.Д. Никольская

ФГБУН «Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва
e-mail: mollaevamariia@gmail.com

Ключевые слова: доксорубин, вориностат, полихимиотерапия, рак молочной железы, синергизм, цитотоксическая активность

Введение. Вориностат (SAHA) повышает чувствительность опухолевых клеток к доксорубину (DOX), поэтому применение комбинации SAHA и DOX в полихимиотерапии вызывает большой интерес. При поиске соотношения препаратов возникают проблемы выбора его эффективности и наличия эффектов взаимодействия веществ. Одним из решений данной проблемы может стать оценка синергизма комбинаций препаратов с помощью моделей HSA, Bliss, ZIP, Loewe.

Цель исследования — поиск эффективного соотношения SAHA и DOX для лечения HER2-позитивного РМЖ с помощью математических моделей HSA, Bliss, ZIP, Loewe.

Материалы и методы. Методом МТТ-теста определяли значения IC_{50} для SAHA и DOX в отношении клеток линии HCC-1954. Значения IC_{50} (0,5 мкМ для DOX и 370 мкМ для SAHA) использовали как исходные для составления матрицы. Она состояла из 9 концентраций DOX (0,5; 0,25; 0,125; 0,063; 0,031; 0,015; 0,007; 0,004 и 0 мкМ) и 9 концентраций SAHA (0; 2,9; 5,8; 11,6; 23,1; 46,3; 92,5; 185,0 и 370,0 мкМ). По составленной матрице проводили МТТ-тест и определяли выживаемость клеток. Полученные значения выживаемости клеток вносили в программу SynergyFinder 2.0 и рассчитывали индекс синергизма для 64 исследуемых комбинаций по моделям HSA, Bliss, ZIP, Loewe.

Результаты. Полученные данные свидетельствуют о синергетическом эффекте комбинации SAHA и DOX в отношении клеток линии HCC-1954 (23,01 по HSA, 17,74 по Bliss, 17,64 по ZIP, 21,58 по Loewe, значения >10 свидетельствуют о синергизме). По значениям наибольших индексов синергизма для каждой математической модели (HSA, Bliss, ZIP, Loewe) были определены концентрации SAHA и DOX: 5,78–0,12; 5,8–0,063; 5,8–0,12 и 11,6–0,063 мкМ. На основе полученных пар было определено среднее значение концентраций препаратов и выявлено эффективное соотношение SAHA:DOX — 70:1 соответственно.

Заключение. С помощью математических моделей HSA, Bliss, ZIP, Loewe был подтвержден синергетический эффект комбинации SAHA/DOX, а также определено оптимальное соотношение SAHA/DOX в отношении клеток линии HCC-1954.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ
(грант № 22-25-00293).

ВЛИЯНИЕ ОПУХОЛЕВОГО СУПРЕССОРА p53 НА АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В КЛЕТКАХ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ HepG2

В.А. Мумятова, В.Д. Сень, А.А. Терентьев

ФГБУН «ФИЦ проблем химической физики
и медицинской химии РАН», Черноголовка
e-mail: mumyatova@icp.ac.ru

Ключевые слова: p53, экспрессия генов, супероксиддисмутаза, каталаза, РНК-интерференция, нокдаун гена p53

Введение. Белок p53 является онкосупрессором, который активируется в ответ на различные виды стресса, в том числе в ответ на действие ДНК-повреждающих агентов. Он контролирует процессы клеточной пролиферации, клеточной гибели, репарации ДНК, а также может влиять на окислительно-восстановительный баланс клетки через регуляцию про- и антиоксидантных генов. Характер влияния p53 на экспрессию генов антиоксидантной системы противоречив и может зависеть от типа клеточной линии, степени повреждающего воздействия и уровня экспрессии p53.

Цель исследования — изучение влияния белка p53 на экспрессию генов антиоксидантной системы при действии комплексов 2- и 4-валентной платины на клетки гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 в норме и при нокдауне гена p53.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на клеточной линии HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека; Институт цитологии РАН). Для получения стабильной клеточной линии с нокдауном p53 проводили РНК-интерференцию с помощью лентивирусного вектора pGPV-sh-p53 (Evrogen, Россия) со смысловой последовательностью участка гена p53. Эффективность нокдауна p53 подтверждена иммуноблоттингом. Экспрессию генов p21, супероксиддисмутазы (SOD2) и каталазы (CAT) исследовали с помощью ПЦР в реальном времени. В качестве генотоксических соединений использованы комплексы 2- и 4-валентной платины.

Результаты. Установлена p53-опосредованная активация гена SOD2 при действии генотоксических соединений. Действие платиновых комплексов вызывает накопление белка p53 и активацию его эффекторного гена p21. В клетках с нокдауном гена p53 накопление белка p53 и активация гена p21 не наблюдается. Платиновые комплексы вызывают активацию гена SOD2 в клетках HepG2, однако при нокдауне p53 экспрессия SOD2 остается на контрольном уровне, что свидетельствует о p53-зависимой активации гена SOD2. Экспрессия гена CAT не изменяется при действии исследуемых соединений в норме и при нокдауне гена p53.

Заключение. В клетках HepG2 генотоксические соединения вызывают р53-зависимую активацию гена *SOD2*, однако не влияют на экспрессию гена *CAT* как в норме, так и при нокдауне гена *p53*. Таким образом, часть генов антиоксидантной системы связаны с функционированием белка р53.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (№ АААА-А19-119092390041-5, АААА-А19-119071890015-6).

РИСК-АДАПТИРОВАННАЯ СТРАТИФИКАЦИЯ И ЛЕЧЕНИЕ СЛОЖНОГО СЛУЧАЯ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ МРТ 3D-МОДЕЛИРОВАНИЯ, ФДГ-ПЭТ И ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА

Д.А. Мурашко^{1,2}, Е.А. Бардина³, И.В. Ребрикова⁴,
А.П. Поляков⁴, К.Ю. Слащук⁵, П.О. Румянцев⁵

¹АНО «Межотраслевой исследовательский центр», Москва;

²ФГБУ «ФИЦ химической физики

им. Н.Н. Семенова РАН», Москва;

³ГБУЗ г. Москвы «ГКБ им. С.И. Спасокукоцкого ДЗМ», Москва;

⁴МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ

«НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва;

⁵ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва
e-mail: murashko.dmitrij@gmail.com

Ключевые слова: папиллярная карцинома щитовидной железы, транскриптомный анализ, магнитно-резонансная томография щитовидной железы, позитронно-эмиссионная томография щитовидной железы, радиойодтерапия

Введение. В структуре онкологии РЩЖ составляет до 3 %, мультиузловой рост — до 2 % РЩЖ. Хирургия в объеме геми- или тиреоидэктомии является стандартом, но сложности стратификации приводят к операциям меньшего объема, как в отношении первичной опухоли, так и регионарных метастазов, и делают неопределенными дальнейшую тактику лечения и прогноз. В связи с этим применение дополнительной визуализации и транскриптомных тестов при стратификации и лечении РЩЖ является актуальной задачей.

Цель исследования — применение максимально возможной визуализации и транскриптомных подходов в риск-адаптированной стратификации и лечении РЩЖ на примере клинического случая.

Материалы и методы. Стратификацию и лечение выполняли по стандартному комплексному протоколу с расширением методов визуализации (магнитно-резонансная томография (МРТ) 3,0 Тл (Патеро Клиник, Москва), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с фтордезоксиглюкозой (ФДГ) (ПЭТ-Технологии, Москва)) в объеме тиреоидэктомии с лимфаденэктомией (МНИОИ им. П.А. Герцена, Москва), с транскриптомным анализом (Геноаналитика, Москва) и радиойодтерапией (НМИЦ эндокринологии, Москва).

3D-МРТ и наложение ПЭТ выполняли в программной среде Slicer 3D (slicer.org).

Результаты. Пациент, 44 года, поступил с диагнозом папиллярный РЩЖ, направлением на гемитиреоидэктомию и сцинтиграфию с ⁹⁹Tc. Учитывая быстрый характер роста опухоли, сцинтиграфия с ⁹⁹Tc была заменена МРТ 3,0 Тл, которой зарегистрировано билатеральное поражение щитовидной железы и множественное поражение лимфатических узлов, и ФДГ ПЭТ, где ИН первичного узла (>2 см) соответствовал папиллярному раку (ИН = 3,8, Cut off = 4,0), а поражения лимфатических узлов (ИН = 2,2–3,2) отличались от лимфаденопатии (ИН = 8). Была построена 3D-модель МРТ с наложением ПЭТ, проведена микрохирургическая операция в объеме тиреоидэктомии с лимфаденэктомией, получена ткань для проведения транскриптомного анализа, результат которого более соответствовал папиллярной карциноме BRAF-like подтипа с измененной экспрессией DUO1, DUO2, BCL2, DUSP1, MET, EPS8. Последнее было учтено в дополнение к клинической картине, и при проведении радиойодтерапии активность была скорректирована в большую сторону. Пациент получил заместительную терапию, по результатам контрольных обследований на протяжении 16 мес уровень тиреоглобулина не определялся, что вместе с результатами других контрольных обследований свидетельствует о ремиссии.

Заключение. Максимальная визуализация и транскриптомика находят свое место в риск-адаптированной стратификации в лечении РЩЖ, что должно далее исследоваться. Приведен клинический случай с применением данного подхода к лечению пациента с мультиузловым ростом РЩЖ и метастатическим поражением лимфатических узлов.

МЕНЕДЖМЕНТ ПАЦИЕНТОВ С ПОЛНЫМ МОЛЕКУЛЯРНЫМ ОТВЕТОМ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

В.Г. Мустяцэ, В.Г. Стратан, К.Т. Попа, Л.З. Мустяцэ,
И.И. Клипка, Н.В. Сгибнева-Бобейко,
К.В. Дудник, Д.С. Уреску

Государственный медицинский и фармацевтический университет им. Николае Тестемичану, Кишинев,
Республика Молдова

e-mail: vasile.musteata@usmf.md

Ключевые слова: хронический миелолейкоз, транскрипты гена *BCR-ABL*, полный молекулярный ответ, прекращение лечения, молекулярный рецидив

Введение. Хронический миелолейкоз (ХМЛ) — относительно частое миелопролиферативное новообразование в структуре заболеваемости гемобластозами с поражением костного мозга, характеризующееся в поздних фазах рецидивирующим течением, значительным бременем болезни и неблагоприятным прогнозом. Исследования по прекращению приема ингибиторов

тирозинкиназы (ИТК) показывают противоречивые результаты в отношении сохранения полных гематологических и молекулярных ответов.

Цель исследования — сравнительный анализ результатов прекращения лечения ХМЛ у пациентов с полным гематологическим и молекулярным ответом.

Материалы и методы. В исследование включены 22 пациента с хронической фазой ХМЛ, получавших лечение в Институте онкологии Молдовы в 2017–2022 гг. Возраст пациентов составил 29–73 года; 14 (63,6 %) больных были моложе 50 лет. Диагноз ХМЛ был установлен посредством цитогенетического и молекулярного исследований костного мозга и периферической крови. При диагностике ХМЛ применяли количественную ПЦР в режиме реального времени для определения экспрессии транскриптов химерного гена *BCR-ABL*. Количественная ПЦР выявила широкие пределы транскрипта p210: 21,84–100 % IS. Исходное содержание *BCR-ABL* p210-положительных клеток крови в 7 (31,8 %) случаях не превышало 50 %.

Результаты. Полные молекулярные ответы (ПМО) были получены в 15 (68,2 %) случаях на фоне лечения иматинибом и в 7 (31,8 %) случаях на фоне лечения ИТК 2-го поколения. Терапия ИТК была прекращена по разным причинам у всех пациентов после достижения ПМО. Прекратили лечение ИТК в связи с беременностью 2 (9,0 %) пациентки. Беременности у этих женщин с ПМО завершились рождением здоровых новорожденных. Молекулярные рецидивы развились у 6 (27,3 %) пациентов, в том числе у 1 (4,5 %) женщины после родов. Гематологических рецидивов не последовало. Исходная экспрессия транскрипта p210 превышала 50 % у всех пациентов с молекулярными рецидивами. При постановке диагноза 1 (4,5 %) из них был положительным по транскрипту p190. У пациентов с рецидивами продолжительность ПМО варьировала в пределах 2,5–26 мес. Количественный диапазон транскрипта p210 химерного гена *BCR-ABL* в случаях с молекулярными рецидивами составлял 0,002–0,56 %. Эти пациенты достигли двух ПМО после возобновления лечения ИТК более нового поколения или в увеличенной дозе. У рецидивировавших пациентов после достижения двух ПМО 2-е молекулярные рецидивы не развились. Пациенты достигли состояния физической реабилитации и социальной реинтеграции.

Заключение. Отмена ИТК может быть рекомендована как вариант менеджмента у пациентов с хронической фазой ХМЛ, ПМО и изначально низкой экспрессией транскриптов химерного гена *BCR-ABL*. Пациенты с малопроцентными молекулярными рецидивами ХМЛ могут достичь двух ПМО после возобновления лечения ИТК.

ФТОРУГЛЕРОДНАЯ НАНОЭМУЛЬСИЯ С ФТОРИРОВАННЫМ ХЛОРИНОМ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА

М.Т. Нгуен^{1,2}, А.А. Маркова^{1,2}, Е.В. Беляева¹,
А.В. Шибаева², А.Е. Егоров², Ю.Л. Володина³,
М.В. Дмитриева³, А.С. Хачатрян³, Н.Д. Чкаников¹, А.А. Штиль³

¹ФГБУН «Институт элементоорганических соединений
им. А.Н. Несмеянова РАН», Москва;

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

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: tuantonix@yahoo.com

Ключевые слова: перфторуглероды, фторуглеродная эмульсия, фотодинамическая терапия рака, некроз, апоптоз, гипоксия

Введение. Эффективность фотодинамической терапии рака (ФДТ) зависит от содержания кислорода в опухоли и сильно ограничена гипоксией. Газотранспортные эмульсии перфторуглеродов с фотосенсибилизатором создают оптимальные условия для одновременной оксигенации опухолевых клеток и инициации их фотоиндуцированной гибели.

Цель исследования — изучение фотохимических и биологических свойств фторированного хлорина в перфторуглеродной формуляции *in vitro* в условиях нормоксии и гипоксии.

Материалы и методы. В качестве фотосенсибилизатора использовали полифторалкилированный хлорин, растворимый в перфторуглеродах. Характеризовали методами спектрофотометрии, спектрофлуориметрии, оптической оксиметрии. Методом ультразвукового диспергирования получали фторуглеродные наноэмульсии. Исследование цитотоксичности проводили на клетках карциномы толстой кишки человека HCT116 с помощью МТТ-теста. Гибель клеток исследовали методами проточной цитофлуориметрии, конфокальной микроскопии, иммуноблоттинга.

Результаты. Фторхлорин в перфторуглеродах обладает спектральными характеристиками, перспективными для ФДТ: способностью переходить в триплетное состояние, генерировать АФК (синглетный кислород и супероксид-анион радикал), наличием флуоресценции. Накопление эмульсии в клетках наблюдается уже к 2 ч как в нормоксии, так и в гипоксии. Возможность оксигенации клеток в гипоксии (1 % кислорода) растворенным в эмульсии кислородом — 8 ч после максимального накопления эмульсии клетками. Фотовозбуждение наноэмульсии и в нормоксии, и в гипоксии приводит к дозозависимой гибели клеток. В зависимости от дозы светового облучения инициируется гибель по механизму некроза или апоптоза/некроптоза. Гибель клеток развивается в течение 3 ч или 24–72 ч после фотовозбуждения. Эмульсия накапливается в митохондриях и лизосомах, но не в ядре, исследуемые механизмы гибели — некроз, апоптоз, некроптоз.

Заключение. Разработанные фторуглеродные эмульсии с фторированным фотосенсибилизатором способны преодолеть гипоксию для применения кислородозависимых методов (ФДТ) и вызвать гибель опухолевых клеток как в нормоксии, так и в гипоксии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 21-73-00249).

ОЦЕНКА ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПЕРВИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА КАК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ОПУХОЛИ

Е.Ю. Николаева¹, Е.А. Зайцева², А.А. Полетаева²,
И.В. Холоденко³, А.Ю. Лупатов³, Ю.И. Амму¹,
Т.В. Наседкина⁴, А.А. Митрофанов², Д.Р. Насхлеташвили²,
А.Х. Бекашев², О.Ю. Сусова²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва;

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

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва;

⁴ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва
e-mail: abekyashev@gmail.com

Ключевые слова: глиобластома, гетерогенность, первичные клеточные культуры

Введение. МГБ — гетерогенная опухоль головного мозга. Несмотря на достижения терапии, глиобластома остается агрессивной опухолью с медианой выживаемости 15 мес. Клеточные культуры, полученные из операционного материала, являются доступной экспериментальной моделью глиобластомы. В них сохраняются различные субпопуляции клеток и мутационный профиль, что отражает опухолевую гетерогенность. Методы получения и характеристики первичных культур представляют успешный инструмент для моделирования в целях изучения процессов роста опухоли и поиска новых кандидатов в противоопухолевые лекарства.

Цель исследования — характеристика первичных культур глиобластомы человека по молекулярным маркерам для поиска возможной гетерогенности и создания модели для дальнейшего исследования процессов опухолевого роста.

Материалы и методы. Использовали операционный материал пациентов с диагнозом глиобластомы, получавших лечение в нейрохирургическом отделении НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Анализ проводили методом иммунофлуоресценции. Отрицательным контролем выбрана неопухолевая эпителиальная клеточная линия MCF10A. Визуализация результатов проведена на флуоресцентном микроскопе Zeiss AxioPlan 2 Imaging. Обработка и анализ — с помощью программного обеспечения ImageJ/FIJI. Цитофлуориметричес-

кий анализ — на проточном цитофлуориметре-сортере BD FACSAria III. Обработка результатов — в программе FlowJo. Оценку цитотоксичности осуществляли методом МТТ.

Результаты. Получена коллекция из 8 первичных клеточных культур. Окрашивание проведено по 4 дифференциальным маркерам: βIII-тубулину, глиально-фибрилярному белку (GFAP), нестину (Nestin) и маркеру стволовых клеток Oct-4. Все исследуемые культуры глиобластомы выявили положительную окраску на нестин и Oct-4. Культура Gbl16 не выявила окраски по βIII-тубулину и GFAP; культура Gbl25 не обнаружила βIII-тубулин, а культура Gbl45 — отрицательно на GFAP.

Поиск маркеров ОСК методом проточной цитофлуориметрии показал присутствие в исследуемых культурах канонических CD44 и крайне редко CD133. Были оценены маркеры CD90 и CD95, контролем выступила линия U251. Чувствительность линий глиобластом к темозоломиду, карбоплатину и доксорубину была существенно ниже U251. Авастин не проявил цитотоксических свойств на исследованных линиях и U251.

Заключение. В результате работы получена и охарактеризована уникальная коллекция первичных культур глиобластом для дальнейшего использования в качестве экспериментальной модели в целях изучения процессов роста опухоли.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 22-15-00304).

СОВМЕСТНОЕ ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ В НАНОЧАСТИЦЫ КАК НОВАЯ СТРАТЕГИЯ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.Д. Никольская¹, М.Р. Моллаева¹, М.Б. Сокол¹,
И.А. Гуляев^{1,2}, М.А. Клименко^{1,2}, М.В. Чиркина¹,
Н.Г. Яббаров¹

¹ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

²ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», Москва
e-mail: elenanikolskaja@gmail.com

Ключевые слова: полимерные наночастицы, доксорубин, вориностат, комбинированная химиотерапия, синергизм, рак молочной железы

Введение. Применение комбинации вориностата (SANA) и доксорубина (DOX) в полихимиотерапии представляет большой интерес, поскольку SANA способствует повышению чувствительности опухолевых клеток к DOX. При поиске соотношения лекарственных препаратов исследователи сталкиваются с проблемами выбора эффективных соответствий и наличием

эффектов взаимодействия препаратов. Одним из решений данной проблемы может стать оценка синергизма комбинаций препаратов. На сегодняшний момент инкапсулирование веществ в матрицу носителя является эффективным подходом для улучшения профиля безопасности препарата. Снижению нежелательных эффектов также способствует тот факт, что препараты в носителе накапливаются специфично в органе-мишени за счет эффекта повышенной проницаемости и удерживания. Более того, инкапсуляция в носитель позволяет преодолеть химиорезистентность при проведении ХТ.

Цель исследования — получение наночастиц на основе ПЛГА с совместным инкапсулированием DOX и SANA для лечения РМЖ.

Материалы и методы. Методом МТТ-теста определяли значения IC_{50} для SANA и DOX в отношении линий клеток молочной железы. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проведена количественная оценка содержания препаратов в наночастицах. Наночастицы, содержащие SANA и DOX, были получены методом двойного эмульгирования с использованием планов Бокса—Бенкена. Частицы характеризовали по таким показателям, как средний диаметр, дзета-потенциал, индекс полидисперсности.

Результаты. Засвидетельствован синергетический эффект комбинации SANA и DOX в отношении клеток линии HCC-1954 (23,01 по HSA, 17,74 по Bliss, 17,64 по ZIP, 21,58 по Loewe, значения >10 свидетельствуют о синергизме). Определено среднее значение концентраций препаратов и выявлено эффективное соотношение SANA:DOX — 70:1. Оптимизирован метод получения наночастиц с помощью планов Бокса—Бенкена. Наночастицы обладали средним диаметром ≤ 300 нм и дзета-потенциалом не выше -15 мВ. Разработан и валидирован метод ВЭЖХ одновременного определения SANA и DOX в наночастицах.

Закключение. С помощью математических моделей подтвержден синергетический эффект комбинации SANA/DOX, определено оптимальное соотношение SANA/DOX, разработан метод получения наночастиц, содержащих SANA и DOX, и метод ВЭЖХ их количественного определения. Полученные результаты являются уникальными, обладающими практической значимостью для дальнейшего применения как учеными, так и врачами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-25-00293)

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ СФЕРОИДОВ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК MCF7 С ГИПЕРЭКСПРЕССИЕЙ EGFR

Д.Д. Новак^{1,2}, О.С. Троицкая², А.А. Нуштаева², М.Е. Варламов^{1,2}, М.М. Абдурахманова^{1,2}, О.А. Коваль^{1,2}

¹ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск;

²ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск
e-mail: d.novak@g.nsu.ru

Ключевые слова: сфероиды, EGFR, MCF7, рак молочной железы

Введение. Эффективность противоопухолевых препаратов для терапии солидных опухолей обычно исследуют в режиме *in vitro* на 2D-культурах клеток, культивируемых в виде монослоя. Однако в условиях организма взаимодействие между соседними раковыми клетками и клетками микроокружения опухоли, а также состояние гипоксии могут значительно влиять на чувствительность клеток к противоопухолевым препаратам.

Важной молекулярной характеристикой опухолевых клеток является профиль экспрессии факторов роста, регулирующих их пролиферацию. Хотя рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) присутствует на поверхности нормальных клеток, показана его гиперэкспрессия в различных опухолях эпителиального происхождения. Поэтому трехмерная клеточная модель с гиперэкспрессией EGFR может быть востребована при оценке эффективности противоопухолевых препаратов, в том числе таргетных к EGFR.

Цель исследования — получение и характеристика линии клеток аденокарциномы молочной железы MCF7, гиперэкспрессирующей EGFR человека.

Материалы и методы. Трансгенную линию клеток получали методом ретровирусной трансдукции. В качестве исходной культуры клеток использовали клеточную линию MCF7. Анализ поверхностных маркеров проводили методом проточной цитометрии. Белки межклеточных контактов визуализировали методом иммуноцитохимии. Исследование туморогенности проводили на мышах линии SCID.

Результаты. На основе линии клеток MCF7 «дикого» типа с низким уровнем EGFR методом ретровирусной трансдукции была получена линия клеток MCF7-EGFR. Установлено, что гиперэкспрессия EGFR в клетках MCF7 приводит к спонтанному сферообразованию в стандартных условиях культивирования. Гистологический анализ показал наличие некротического ядра в центре крупных сфероидов. В сфероиде MCF7-EGFR хорошо визуализируются белок плотных контактов ZO-1 и белок межклеточной адгезии E-кадгерин, участвующие в негативной регуляции клеточной миграции. Показано, что часть клеток сфероидов

MCF7-EGFR теряют рецепторы HER2 и HER3. Установлено, что в сфероиде MCF7-EGFR увеличивается популяция клеток с фенотипом CD24⁻/low/CD44⁻/low и уменьшается популяция CD24⁺/CD44⁺ по сравнению с клетками «дикого» типа. Применение таргетного к EGFR препарата цетуксимаб снижало жизнеспособность клеток сфероидов. Также была проанализирована туморогенность сфероидов на модели ксенографта на иммунодефицитных мышах SCID.

Заключение. Таким образом, сфероиды MCF7-EGFR являются 3D-моделью для исследования таргетных к EGFR препаратов.

Работа поддержана грантом РНФ № 20-74-10039 и частично грантом Правительства НСО за 2022 г. (№ Гр-7).

BRAF-МУТАЦИИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Н.А. Огнерубов^{1,2}, В.Д. Сычев²

¹ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина», Тамбов;

²ГБУЗ «Тамбовский областной онкологический клинический диспансер», Тамбов
e-mail: ognerubov_n.a@mail.ru

Ключевые слова: колоректальный рак, мутации, BRAF, лечение

Введение. KPP является наиболее распространенным нозологическим вариантом среди злокачественных опухолей в мире, занимая 3-е место, а в структуре смертности — 2-е. Молекулярная характеристика опухоли имеет важное значение для выработки персонализированной тактики лечения.

Цель исследования — изучить особенности BRAF-мутаций при KPP.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование 2019–2022 гг. включены 157 пациентов с I–IV стадией KPP в возрасте 32–80 лет, медиана — 63,9 года. Исследования выполняли на образцах ДНК опухоли, выделенной из парафиновых блоков. Генотипирование выполняли методом ПЦР. Гистологически у всех больных выявлена аденокарцинома различной дифференцировки. Мужчин было 43,3 %, женщин — 56,7 %.

Результаты. Мутации в онкогене *BRAF* обнаружены у 7 пациентов (6 женщин и 1 мужчина в возрастном интервале 40–73 года, медиана — 63,4 года), что составило 4,5 %. Как правило, 90 % мутаций в этом гене сопровождалось заменой глутамата на валин в кодоне 600–V600E. Исходно BRAF-мутации выявлены при метастатическом опухолевом процессе у 6 пациентов. При гистологическом исследовании у всех больных была диагностирована низкодифференцированная аденокарцинома.

Первичная опухоль в 85,7 % локализовалась в правой половине ободочной кишки, а именно: в слепой — у 1 пациентки, в восходящем отделе — в 3 случаях, в поперечно-ободочной кишке — у 2 больных и только лишь в 1 наблюдении — в сигмовидной кишке у мужчины.

Изложенные события свидетельствуют о преобладании (6 пациенток) BRAF-мутаций у женщин и при опухолях правой половины ободочной кишки. Кроме того, у больной 73 лет с опухолью поперечно-ободочной кишки, наряду с BRAF-мутацией, выявлена коассоциация с микросателлитной нестабильностью (MSI).

Заключение. Согласно полученным данным, BRAF-мутации при KPP выявлены у 7/4,5 % пациентов.

В подавляющем большинстве случаев (85,7 %) они наблюдались у женщин и при локализации опухоли в правой половине ободочной кишки.

Наличие BRAF-мутаций характеризует когорту пациентов с неблагоприятным клиническим прогнозом, поскольку они были обнаружены при метастатическом опухолевом процессе.

Современное лечение такого биологического варианта KPP включает применение цитотоксической терапии 1-й линии в сочетании с бевацизумабом. При прогрессировании процесса применяют комбинацию BRAF-ингибиторов и эпидермального фактора роста — цетуксимаб.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПРЕОДОЛЕНИЮ ПРИОБРЕТЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

А.В. Онян¹, О.Г. Ковтун¹, А.А. Рудакова¹, С.М. Андреев²,
Н.А. Королева¹, А.А. Лушникова¹

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

²ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва
e-mail: anapaul@yandex.ru

Ключевые слова: резистентность, лекарственная устойчивость, пептид

Введение. Преодоление резистентности к противоопухолевым препаратам, возникающей на фоне лечения, — актуальная задача современной онкологии. Приобретенная лекарственная устойчивость (ЛУ) часто опосредована белками семейства ABC-транспортеров, в том числе P-gp (MDR1; CD243), обеспечивающего трансмембранный перенос веществ в клетку. Например, лекарственная устойчивость клеток РМЖ к доксорубину (DOX) связана с гиперэкспрессией генов *ABCB1*, кодирующих P-gp. Приобретенная лекарственная устойчивость мезенхимальных опухолей желудочно-кишечного тракта (включая ГИСО) к иматинибу связана с мутациями генов *KIT* и *PDGFRα*, с ингибированием экспрессии KIT (CD117) в комбинации с гиперэкспрессией ряда тирозинкиназ, в том числе MET, FGFR2α и др. Ряд механизмов резистентности ММ к ингибитору протеасом бортезомибу связан с нарушениями его взаимодействия с β5-субъединицей протеасомы (PSMB5), неполным ингибированием ее активности и супрессией антиапоптотических сигнальных путей, а частично — с функциями P-gp. Ранее мы обнаружили, что для изучаемых линий опухолевых клеток характерен

высокий уровень экспрессии шаперонных белков нуклеолина/NCL и нуклеофозмина/NPM на мембране (NCL) и в ядре (NCL, NPM). Рецепторный NCL рассматривается как молекулярная мишень для различных лигандов, в том числе для катионных пептидов (КП).

Цель исследования — анализ механизмов избирательной цитотоксичности ряда КП в чувствительных опухолевых клетках и клетках с лекарственной устойчивостью, приобретенной в результате культивирования *in vitro* с DOX, иматинибом или бортезомибом.

Материалы и методы. Селекция резистентных клеток РМЖ сублинии HBL-100/DOX (гиперэкспрессия ABCB1/P-gr) и клеток ГИСО линии GIST IMRT1 (делеция C-KIT 11ex del.V560-Y578) и ММ сублинии RPMI 8226 BTZ проведена в присутствии соответствующего препарата при IC_{50} . Соответствующие культуры любезно предоставлены Н.И. Моисеевой, Л.А. Лалетиной, П.Б. Копниным (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина). Выживаемость клеток сублиний с приобретенной лекарственной устойчивостью и исходных сублиний при 3-суточной инкубации их с 4 КП (0,5–4 мкг/мл) определяли методом МТТ. Оценивали лекарственную устойчивость опухолевых клеток и контроля — фибробластов кожи линий H1036 и Wi-38. Также использовали проточную цитометрию и цитофлуориметрию (Muse Millipore), иммуноблоттинг и конфокальную флуоресцентную микроскопию с меченым КП Су5-NC811, межмолекулярные взаимодействия подтверждены парным докингом (пакет Maestro_11).

Результаты. Выявлена высокая цитотоксичность тестируемых КП как для клеток исходных сублиний РМЖ, ГИСО и ММ, так и для производных резистентных сублиний ($IC_{50} = 1$ мкг/мл), в контроле выживаемость клеток достоверно не изменилась. Наблюдали апоптоз клеток HBL100 с активацией каспаз 3, 8, 9 и клеток HBL100/DOX с активацией каспаз 9, 2 и р53-сигнального каскада, избирательный апоптоз обнаружен в ~50 % клеток ГИСО с лекарственной устойчивостью и в 30 % резистентных к бортезомибу клеток ММ. Анализ путем молекулярного докинга между КП и NPM, КП и NCL, КП и белком P-gr; КП-DOX и P-gr выявил достоверно более энергетически выгодное связывание (scores по модулю) КП с гликозилированным NCL. Это позволяет КП, включая и конъюгат с доксорубицином КК-13-DOX, преодолеть выброс, обусловленный гиперактивацией P-gr в резистентных клетках линии HBL100/DOX, а затем индуцировать апоптоз в опухолевых клетках из резистентных сублиний путем инактивации молекул NCL, гиперэкспрессированных на поверхности злокачественных клеток с последующим ингибированием нуклеофозмина (NPM) и развитием апоптоза по типу ядрышкового стресса.

Заключение. Тестируемые КП интересны как малотоксичные для нормальных клеток соединения, индуцирующие апоптоз резистентных к доксорубицину, иматинибу и бортезомибу клеток РМЖ, ГИСО и ММ соответственно. На основе этих КП возможна разра-

ботка соединений для преодоления МЛУ опухолевых клеток.

ДИЗАЙН, СИНТЕЗ И ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗ

В.Н. Осипов¹, Д.А. Хоченков¹, А.А. Вартамян¹,
О.В. Тиньков², А.В. Колотаев³, Д.С. Хачатрян³

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

²ГОУ «Приднестровский государственный университет
им. Т.Г. Шевченко», Тирасполь;

³ФГБУ «НИЦ Курчатовский институт», Москва
e-mail: ovn65@yandex.ru

Ключевые слова: ингибирование гистондеацетилаз, синтез, гидроксамовые кислоты, производные хиназолинов, цитотоксичность, селективные ингибиторы

Введение. Нарушения экспрессии гистоновых деацетилаз (HDAC) связаны с развитием многих типов рака и нейродегенеративных заболеваний, что делает HDAC интересными молекулярными мишенями для разработки новых эффективных лекарств, а их избирательное ингибирование или деградация служат основой для новых методов лечения. Одним из основных классов ингибиторов HDAC являются гидроксамовые кислоты.

Цель исследования — дизайн, синтез и оценка биологических свойств производных гидроксамовой кислоты, которые могут использоваться в качестве ингибиторов гистондеацетилаз различных изоформ.

Материалы и методы. Синтез соединений проводили с использованием классических методов органической химии и модифицированных методик. Цитотоксическую активность заявляемых соединений определяли с помощью МТТ-теста. Для определения их влияния на активность ферментов HDAC люминесцентным методом использовали коммерческий скрининговый набор HDAC-Glo (ТМ). Влияние на инвазивный потенциал и на способность опухолевых клеток формировать сосудистоподобные структуры исследовали на клетках SN-12C. Способность блокирования миграционной активности клеток SN-12C определяли методом заживления раны.

Результаты. Методом компьютерного моделирования QSAR проведен рациональный молекулярный дизайн и определены структуры 4 соединений, которые по разработанной нами консенсусной модели QSAR предсказываются как активные в отношении HDAC6 и обладают высокой биодоступностью. Химическим синтезом получены 2 аналога выявленных соединений на основе транексамовой кислоты, присоединенной к производным хиназолина по 4-му положению. Соединения обладают цитотоксической активностью в микромолярном диапазоне на 5 линиях опухолевых клеток. Активность соединений по отношению

к ферменту HDAC6 превышает или сравнима с активностью известного ингибитора HDAC — вориностата. При этом необходимо отметить высокую селективность соединений к ферменту HDAC6 по сравнению с HDAC1. Полученные соединения также обладают высокой антиангиогенной активностью.

Закключение. Исследованные соединения селективно ингибируют HDAC6 по сравнению с HDAC1. Селективное ингибирование HDAC6 может стать многообещающей терапевтической стратегией для лечения рака, что делает разработку ингибиторов HDAC6 особенно привлекательной. Исследованные соединения являются основой для дизайна и изучения новых аналогов, которые могут использоваться в медицине для лечения ряда заболеваний посредством ингибирования гистоновых деацетилаз, например при лечении онкологических и нейродегенеративных заболеваний.

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СПОСОБНОСТИ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Д.В. Петроченко¹, А.А. Крюков², Е.Б. Артюшкова²,
В.В. Хвостовой², Ю.В. Фурман², И.В. Станоевич²

¹ОБУЗ «Курский онкологический научно-клинический центр
им. Г.Е. Островерхова», Курск;

²ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Курск
e-mail: petrochenko.dima@yandex.ru

Ключевые слова: рак желудка, антиоксидантная система, окислительный стресс

Введение. Одно из ведущих мест в структуре онкологической заболеваемости желудочно-кишечного тракта принадлежит РЖ. Это прогрессирующая опухоль, развитие которой связано с возрастом больного. Патогенез заболевания связан с генерацией АФК, продуктами окислительной модификации белков и перекисного окисления липидов. Известно, что в клетках организма человека имеются антиоксидантные системы, позволяющие нейтрализовать эндогенную интоксикацию окислительного стресса. Однако их потенциал ограничен, в особенности в возрастном аспекте. Величина антиоксидантной способности организма больного может являться прогностическим показателем.

Цель исследования — изучить прогностическую значимость антиоксидантной активности плазмы крови больных РЖ различных возрастных групп.

Материалы и методы. Объектом исследования служила плазма крови 40 больных с диагнозом РЖ возрастных групп 40, 50, 60, 70 лет и старше. Величину антиоксидантной активности плазмы крови больных определяли с помощью набора реактивов фирмы Solario Life Sciences с последующей спектрофотометрией на планшетном спектрофотометре Multiskan MCC-340. Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 10.

Результаты. В результате проведенных исследований в плазме крови больных РЖ было выявлено стойкое снижение антиокислительной способности организма больного по мере старения. В группе 40–49 лет ее величина составила 0,761 ммоль/мл, в группе 50–59 лет — 0,750 ммоль/мл, в группе 60–69 лет — 0,755 ммоль/мл и в группе 70 лет и старше — 0,740 ммоль/мл. Снижение антиоксидантной способности, связанное с возрастом больного, требует коррекции лечебных мероприятий, проводимых с больными этих возрастных категорий.

Закключение. Результаты исследований свидетельствуют о том, что при лечении больных с диагнозом РЖ необходимо учитывать возраст пациентов ввиду ограниченного антиоксидативного потенциала в целях корректировки проведения лечебных и профилактических мероприятий.

ГЕНДЕРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ В АНТИОКСИДАНТНОЙ СПОСОБНОСТИ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

Д.В. Петроченко¹, А.А. Крюков², Е.Б. Артюшкова²,
В.В. Хвостовой², Ю.В. Фурман², И.В. Станоевич²

¹ОБУЗ «Курский онкологический научно-клинический центр
им. Г.Е. Островерхова», Курск;

²ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Курск
e-mail: petrochenko.dima@yandex.ru

Ключевые слова: рак желудка, антиоксидантная система, окислительный стресс

Введение. В патогенезе многих онкологических заболеваний, в том числе РЖ, ведущую роль играет окислительный стресс — процесс повреждения АФК органов и тканей. Он происходит тогда, когда образование АФК в организме превышает способность их нейтрализовать и элиминировать.

Цель исследования — изучить гендерные различия антиоксидантной способности плазмы крови больных с диагнозом РЖ.

Материалы и методы. Объектом исследования служила плазма крови 40 больных (20 мужчин и 20 женщин) с морфологически верифицированным диагнозом РЖ II–IV стадий опухолевого процесса, разных возрастных групп, в условиях стационара Курского онкологического научно-клинического центра им. Г.Е. Островерхова. Величину антиоксидантной способности плазмы крови больных определяли с помощью набора реактивов фирмы Solario Life Sciences с последующей спектрофотометрией на планшетном спектрофотометре Multiskan MCC-340. Распределение данных в исследуемых группах было нормальным, что подтверждается расчетами по критерию Колмогорова—Смирнова, это позволило использовать в вычислении достоверности различий средних значений коэффициент Стьюдента. В результате установлено, что показатели антиоксидантной способности плазмы крови больных

РЖ мужчин и женщин различаются достоверно ($p \leq 0,05$). Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программы Statistica 10.

Результаты. Установлено, что величина антиоксидантной способности в плазме крови больных РЖ у мужчин составляет $0,714 \pm 0,022$ ммоль/мл, у женщин — $0,755 \pm 0,027$ ммоль/мл.

Заключение. Уровень антиоксидантной способности плазмы крови женщин, больных РЖ, выше по сравнению с мужчинами. Необходимо учитывать гендерные различия антиоксидантной способности организма пациентов в процессе проведения лечебных мероприятий.

СОДЕРЖАНИЕ МЕДИ, ЦИНКА И МАРГАНЦА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА ДО ИНИЦИИИ ПОЛИХИМИОТЕРАПИИ

Д.В. Петроченко¹, А.Ю. Саламатина², В.В. Хвостовой³,
И.В. Ермилов², И.В. Станоевич³

¹ОБУЗ «Курский онкологический научно-клинический центр им. Г.Е. Островерхова», Курск;

²ОБУ «Курская областная ветеринарная лаборатория», Курск;

³ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России, Курск
e-mail: petrochenko.dima@yandex.ru

Ключевые слова: микроэлементы, полихимиотерапия, рак желудка

Введение. Неотъемлемой частью комплексного лечения РЖ является проведение ХТ, в то же время анализ результатов значительного количества исследований свидетельствует о важной роли дисмикроэлементоза как в процессе канцерогенеза, так и опухолевой прогрессии. Медь, цинк и марганец являются необходимыми компонентами антиоксидантной защиты клеток, а также детоксикации ксенобиотиков, в том числе химиопрепаратов.

Цель исследования — определение содержания микроэлементов меди, цинка и марганца в сыворотке крови больных РЖ перед проведением полихимиотерапии.

Материалы и методы. Объектом исследования служила сыворотка крови 15 больных с диагнозом РЖ разных возрастных групп, полученная до начала проведения полихимиотерапии в условиях круглосуточно-го стационара Курского онкологического научно-клинического центра им. Г.Е. Островерхова. В исследование были включены пациенты со II–IV стадиями опухолевого процесса, с гистологическим вариантом аденокарцинома low grade и high grade. Уровень содержания микроэлементов в сыворотке крови больных определяли с помощью атомно-абсорбционного спектрометра Shimadzu AA-7000, укомплектованного электротермическим атомизатором, корректором фонового поглощения и источником резонансного излучения цинка,

меди и марганца. Статистический анализ полученных данных осуществляли с применением статистического пакета Statistica 10.

Результаты. Установлено следующее: содержание меди в сыворотке крови составило $697,03 \pm 196,73$ мкг/л, содержание марганца — $1075,83 \pm 450,04$ мкг/л, уровень цинка в сыворотке крови больных РЖ — $1007,96 [850,96; 1401,10]$. Нормальность распределения количественных данных оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. В связи с тем, что количественные данные по содержанию цинка не подчинялись закону нормального распределения, они представлены в виде медианы, 1-го и 3-го квартилей (Me [Q1; Q3]); данные по содержанию меди и цинка подчинялись закону нормального распределения и представлены в виде среднего и среднеквадратичного отклонения.

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о том, что уровень содержания меди и цинка у больных РЖ до инициации полихимиотерапии оставался в пределах референсных значений, в то же время содержание марганца в сыворотке крови превышало нормативные показатели.

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗМОЖНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ПРЕДРАКОВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЖЕЛУДКА В УСЛОВИЯХ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ

Н.А. Плотникова, В.М. Курусин, Е.В. Курусина

Медицинский институт, кафедра нормальной и патологической анатомии с курсом судебной медицины
ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва», Саранск;
ГБУЗ Республики Мордовия «Республиканский онкологический диспансер», Саранск
e-mail: plonka@mail.ru

Ключевые слова: обратная трансформация, атипичные клетки, предраковые заболевания, комбинированный терапевтический метод лечения

Введение. В настоящее время в диагностике и лечении онкопатологий ведется поиск новых направлений. В данном исследовании предлагается метод предопухолевых изменений с возможной обратной трансформацией неопластических клеток в нормальные (Михалева Л.М., Бирюков А.Е., Плахов Р.В. Современный клиничко-морфологический подход к раннему раку желудка. Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова 2014;(4):35–41).

Цель исследования — изучение обратной трансформации атипичных клеток в относительно нормальные без апоптоза и атипии окружающих тканей после комбинированного терапевтического лечения с включением фитотерапии.

Материалы и методы. За период 2005–2021 гг. проведен анализ данных 80 больных с предраковыми заболеваниями верхних отделов желудочно-кишечного тракта. Все пациенты отказались от оперативного лечения. В работе использовали эзофагогастроскопы с применением биопсийных щипцов. Пациентам проводили гистологические исследования предраковых изменений желудка до и после лечения комбинированным терапевтическим методом. Исследовались анализы крови до и после терапии на выявляемость токсического действия данного способа лечения.

Проведено лечение согласно патентам на изобретение № 2467758 от 27 ноября 2012 г. «Способ лечения предраковых и ранних стадий раковых заболеваний желудка» (автор В.М. Курусин) и № 2646450 2018 г. Всего исследовано: полипы желудка – 55 случаев (аденоматозные – 25, гиперпластические – 30), неоплазии III стадии – 17, доброкачественные подслизистые опухоли – 2, ранние раки пищевода и желудка – 5 случаев. Возраст пациентов составил 25–90 лет.

Результаты. При эндоскопическом исследовании у 80 пациентов с предраковыми заболеваниями и ранними стадиями рака при применении комбинированного лечения определялись регрессии всех изучаемых форм патологии. При гистологическом исследовании было выявлено, что данный метод лечения сопровождается обратной трансформацией атипичных клеток в относительно нормальные, без их апоптоза и деструкции окружающих клеток (Курусин В.М., Плотникова Н.А. Влияние комбинированной терапии на динамику предопухолевых процессов в желудке. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки 2015;3(35):78–89).

Закключение. Комбинированный терапевтический метод способствует регрессии атипичных клеток в нормальные без разрушения как самих атипичных, так и окружающих клеток, что подтверждается гистологическими исследованиями. Рекомендуемая дозировка не оказывает отрицательного воздействия на организм человека, что подтверждается показателями анализов крови. Проводимая терапия является весомым основанием для дальнейшего пристального изучения обратной регрессии опухолевых процессов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРЕОДОЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ПОЧКИ ЧЕЛОВЕКА А498 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО

Н.В. Полуконова, А.Г. Демин, А.В. Полуконова,
Н.А. Наволокин

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского»
Минздрава России, Саратов
e-mail: polukonovanv@yandex.ru

Ключевые слова: SQSTM1, экстракт аврана лекарственного, преодоление резистентности клеток, аутофагия, А498, индукция апоптоза

Введение. Ранее нами было установлено, что аутофагия, возникающая под действием экстракта аврана в низких концентрациях в опухолевых клетках, не приводит к их гибели, а, наоборот, способствует выживанию опухолевой клетки. В то время как повышение концентрации экстракта приводит к преодолению резистентности опухолевых клеток и их массовой гибели апоптозом (Полуконова и др., 2019). В культуре карциномы почки человека А498 наиболее экспрессирован ген *SQSTM1*, ассоциированный с аутофагией (Демин и др., 2019). Его продукт – белок Р62 играет важную роль и в аутофагии, и апоптозе: он активирует аутофагию, взаимодействуя с LC3, и затем индуцирует апоптоз через активацию каспазы 8 на мембране аутофагосомы (Moscat, Diaz-Meco, 2009; Islam et al., 2018).

Цель исследования – изучить относительную экспрессию гена *SQSTM1* в культуре клеток карциномы почки человека А498 под действием экстракта аврана.

Материалы и методы. Нами был использован экстракт аврана (RU 2482863) при 0,02 мг/мл (с наибольшим числом LC3В-положительных клеток) и 0,3 мг/мл (с наибольшим числом апоптотических клеток). Клетки линии А498 из Банка клеточных линий НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина выращивали в среде DMEM с добавлением 10 % сыворотки эмбриональной телячьей (HyClone, США), пенициллина-стрептомицина, L-глутамина и пирувата натрия, витаминов и аминокислот (ПанЭко, Россия). Оценку аутофагии проводили с помощью Autophagy LC3-Antibody Based Kit (Abcam, США), индукцию апоптоза – Annexin-V FITC Apoptosis Kit (Invitrogen, Life Technologies, США), выделение РНК – Rneasy Plus Micro Kit, синтез кДНК на матрице РНК выполняли методом ОТ-ПЦР с помощью RT² First Strand Kit, ПЦР в реальном времени осуществляли с помощью RT² Profiler PCR Array Human Cell Death PathwayFinder (QIAGEN, Германия).

Результаты. В контроле и под действием экстракта аврана при 0,02 мг/мл отмечена экспрессия гена *SQSTM1*. При концентрации экстракта 0,3 мг/мл экспрессия *SQSTM1* повышена.

Экспрессия *SQSTM1* в контроле согласуется с устойчивостью рака почки к ХТ за счет активации селективной аутофагии. Тенденция повышения экспрессии гена *SQSTM1* при 0,3 мг/мл, отмеченная на фоне максимального количества клеток, погибших апоптозом, согласуется с известным механизмом действия его белка: активацией аутофагии и индукцией апоптоза на мембране аутофагосомы.

Закключение. Экстракт аврана при 0,3 мг/мл усиливает экспрессию гена *SQSTM1* в культуре клеток А498, что в итоге приводит к преодолению опухолевой резистентности и индукции апоптоза опухолевых клеток.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (гранты № АААА-А18-118012290218-1,
SSMU-2021-003).*

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК РАКА ПОЧКИ ЧЕЛОВЕКА A498 К АПОПТОЗУ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО

Н.В. Полуконова, А.В. Полуконова, А.Г. Демин

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России,
Саратов
e-mail: polukonovanv@yandex.ru

Ключевые слова: негативный регулятор Mcl-1, апоптоз, антиапоптотический ген *MCL1*, экстракт аврана, A498

Введение. В лечении опухолевых заболеваний особая роль отводится разработке лекарственных средств, способствующих запуску апоптоза. Одним из механизмов гибели опухолевой клетки путем апоптоза является негативная регуляция антиапоптотических генов. Продуктами антиапоптотического гена *MCL1* являются 2 белка: онкогенный антиапоптотический белок — *MCL1* (Myeloid cell leukemia-1), функцией которого является защита опухолевых клеток от апоптоза, и укороченный белок — Mcl-1S, образующийся в ходе альтернативного сплайсинга и служащий негативным регулятором Mcl-1. Повышение уровня Mcl-1S ведет к ингибированию Mcl-1 (Сеничкин В.В., 2018) и гибели опухолевой клетки путем апоптоза.

Цель исследования — изучить относительную экспрессию гена *MCL1* в культуре клеток рака почки человека A498 под действием противоопухолевого экстракта аврана.

Материалы и методы. Мы использовали экстракт аврана лекарственного (Полуконова Н.В. и др., 2012; RU 2482863) в концентрациях 0,02 и 0,3 мг/мл. Клетки линии A498 из Банка клеточных линий НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина выращивали в среде DMEM с добавлением 10 % сыворотки эмбриональной телячьей (HyClone, США), пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия), L-глутамин (ПанЭко), пирувата натрия, витаминов и аминокислот (ПанЭко). Выделение РНК выполнено набором RNeasy Plus Micro Kit; синтез кДНК на матрице РНК методом ОТ-ПЦР — набором RT² First Strand Kit; реакция ПЦР в реальном времени — набором RT² Profiler PCR Array Human Cell Death PathwayFinder (QIAGEN, Германия).

Результаты. В контроле и под действием экстракта при 0,02 мг/мл апоптотических телец не образовывалось, и экспрессия гена *MCL1* была ниже, чем при 0,3 мг/мл. При 0,3 мг/мл экспрессия гена *MCL1* была заметно выше, и при этом наблюдалась гибель клеток

A498 апоптозом. По-видимому, под действием экстракта при 0,3 мг/мл происходит синтез другого белка — Mcl-1S, кодируемого тем же геном, но в ходе альтернативного сплайсинга. Повышение уровня белка Mcl-1S ведет к ингибированию защищающего от апоптоза Mcl-1 и, следовательно, гибели опухолевой клетки путем апоптоза.

Заключение. Выявлена концентрациянезависимая способность противоопухолевого экстракта аврана лекарственного приводить к альтернативному сплайсингу и синтезу белка Mcl-1S, негативного регулятора Mcl-1, и, следовательно, к гибели опухолевых клеток путем апоптоза.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (гранты № АААА-А18-118012290218-1,
SSMU-2021-003).*

ИССЛЕДОВАНИЕ Poly(I:C) И РИДОСТИНА ПРО В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТОВ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПЕПТИДНЫХ ВАКЦИН

**А.В. Пономарев¹, М.А. Барышникова¹, П.В. Царапаев¹,
А.А. Рудакова¹, З.А. Соколова¹, Н.В. Голубцова¹,
Г.М. Левагина², Е.Д. Даниленко², В.С. Косоруков¹**

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

²Институт медицинской биотехнологии ФБН
«Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск
e-mail: kl8546@yandex.ru

Ключевые слова: Poly(I:C), Ридостин Про, неоантигенная пептидная вакцина, B16-F10

Введение. Для усиления эффективности противоопухолевых пептидных неоантигенных вакцин требуется наличие в их составе адьюванта. В исследованиях противоопухолевых вакцин на мышинных моделях в качестве адьюванта часто применяется Poly(I:C), агонист TRL-3, но его применение у людей имеет серьезные ограничения. В связи с этим остается актуальной потребность в адьюванте для неоантигенных противоопухолевых вакцин, который был бы способен индуцировать сильный Т-клеточный ответ, но при этом являлся бы доступным и безопасным. В ГНЦ ВБ «Вектор» разработан препарат Ридостин Про, являющийся индуктором ИФН пролонгированного действия. В состав препарата в качестве действующего вещества входит природный комплекс натриевых солей двуспиральных и односпиральных РНК из киллерного штамма пекарских дрожжей, а в качестве стабилизатора, обеспечивающего пролонгацию биологических эффектов, выступает поливинилпирролидон.

Цель исследования — оценить способность адьювантов Ридостин Про и Poly(I:C) к антиген-специфическому праймированию Т-клеток с использованием синтетических пептидов. Оценить противоопухолевый

эффект 2 вакцин с одинаковым пептидом, но разными адъювантами — Ридостином Про или Poly(I:C).

Материалы и методы. С помощью ELISPOT оценивали иммуногенность пептидов после вакцинации с адъювантами Ридостин Про или Poly(I:C). На мышинной модели меланомы B16-F10 оценивали противоопухолевый эффект вакцин с исследуемыми адъювантами по влиянию на скорость роста опухоли и выживаемость мышей.

Результаты. Вакцинация мышей неоантигенными пептидами совместно с Ридостином Про или Poly(I:C) приводила к появлению специфического иммунного ответа к пептидам, входившим в состав вакцины. Вакцина с адъювантом Ридостин Про тормозила рост опухоли и увеличивала продолжительность жизни мышей с меланомой B16-F10.

Заключение. Ридостин Про способствует формированию специфического иммунного ответа на пептидную вакцину, усиливает противоопухолевый эффект вакцины. Эти результаты подтверждают, что Ридостин Про может оказаться эффективным адъювантом для персонализированных неоантигенных пептидных вакцин.

ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКА

В.Е. Попов¹, А.К. Нургалиева¹, И.Р. Халитова¹,
В.С. Скрипова¹, К.А. Кузин², М.Г. Якубовская²,
К.И. Кирсанов³, Р.Г. Киямова¹

¹Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии НИЛ
«Биомаркер» Института фундаментальной медицины
и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский)
федеральный университет», Казань;

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

³Медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский
университет дружбы народов», Москва
e-mail: veropov1@gmail.com

Ключевые слова: рак яичника, предиктивные маркеры, лекарственная устойчивость, химиотерапия

Введение. Устойчивость опухолей больных РЯ к химиотерапевтическим препаратам — одна из проблем современной онкологии. Механизмы возникновения устойчивости к карбоплатину и цисплатину, 1-й линии ХТ при РЯ, связаны с измененным ответом клеток рецидивирующей опухоли на повреждение ДНК, вызванное химиотерапевтическими препаратами. Поиск генов, продукты которых вовлечены в регуляцию чувствительности клеток РЯ к химиотерапевтическим агентам, важен для понимания механизмов возникновения этой устойчивости и для выявления новых предиктивных маркеров ответа на химиотерапевтическое лечение.

Цель исследования — выявление новых потенциальных предиктивных маркеров ответа на ХТ при РЯ.

Материалы и методы. Для выявления потенциальных маркеров ответа на терапию при РЯ проводили анализ корреляции между уровнем экспрессии 6 генов в образцах карциномы яичника пациентов и индексом чувствительности (SI) первичных клеточных линий, полученных из этих же опухолевых образцов, к 8 химиотерапевтическим препаратам (карбоплатин, цисплатин, паклитаксел, этопозид, доксорубин, гемцитабин, оксалиплатин, топотекан). Уровень экспрессии этих 6 генов, ранее идентифицированных в качестве потенциальных предиктивных маркеров рака головы и шеи (*RAD54L*, *POLR2I*, *WDHD1*, *DSCC1*, *UBE2V2*, *CSNK2B*), оценивали по относительному уровню мРНК с помощью ПЦР в режиме реального времени. Индекс чувствительности к препаратам рассчитывали по формуле $SI = 600 - \sum TGI_{200-6,2TDC}$, где TGI — процент ингибирования роста клеток, TDC — стандартные тестовые концентрации. Корреляционный анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 22.0.

Результаты. Повышенная экспрессия гена *CSNK2B* связана с чувствительностью к карбоплатину ($R = 0,539$, $p = 0,038$), тогда как низкая экспрессия гена *CSNK2B* связана с чувствительностью к гемцитабину ($R = -0,847$, $p = 0,016$). Низкая экспрессия генов *UBE2V2* ($R = -0,669$, $p = 0,024$) и *WDHD1* ($R = -0,827$, $p = 0,003$) связана с чувствительностью к доксорубину, а низкая экспрессия гена *POLR2I* — с чувствительностью к топотекану ($R = -0,757$, $p = 0,049$).

Заключение. Мы обнаружили, что относительный уровень экспрессии генов *CSNK2B*, *UBE2V2*, *WDHD1* и *POLR2I* коррелирует с чувствительностью к ряду химиотерапевтических препаратов. Таким образом, относительные уровни мРНК генов *CSNK2B*, *UBE2V2*, *WDHD1* и *POLR2I* являются потенциальными маркерами ответа на ХТ при РЯ.

Работа выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ВАРИАНТОВ ЛЕЙКЕМИИ P388 МЫШЕЙ СУБТЕРАПЕВТИЧЕСКИМИ ДОЗАМИ ЦИТОСТАТИКОВ И РЕДОКС-АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

Т.А. Раевская¹, Д.В. Казакова², Ю.В. Солдатова¹,
С.А. Гончарова¹, Т.Н. Богатыренко¹, Н.В. Кандалицева³,
И.И. Файнгольд¹

¹ФГБУН «ФИЦ проблем химической физики
и медицинской химии РАН», Черноголовка;

²ФГБОУ ВО «Ивановский государственный
университет», Иваново;

³ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный

педагогический университет», Новосибирск
e-mail: tara@icp.ac.ru

Ключевые слова: серосодержащий фенольный антиоксидант (ТС-13), донор оксида азота, редокс-свойства, химиотерапия, лекарственно-устойчивые опухоли

Введение. Работа связана с поиском химиопрепаратов или комбинаций веществ с различными механизмами действия, способных усилить окислительное повреждение и вызвать гибель опухолевых клеток.

Цель исследования — оценить *in vivo* эффективность терапии серосодержащим фенольным антиоксидантом 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил) — пропилтиосульфонатом натрия (ТС-13) и донором оксида азота (NO) нитритом натрия (NaNO_2) в комбинациях с низкими дозами адриамицина (ADR) и цисплатина (сPt) на мышах с двумя лекарственно-устойчивыми вариантами лимфолейкоза P388, а также исследовать антиоксидантную активность ТС-13, донора NO и их комбинаций.

Материалы и методы. ХТ проводили на мышах-гибридах BDF1 с лекарственно-устойчивыми опухолями. Опухолевые клетки устойчивого к циклофосфану (P388/ЦФ) и цисплатину (P388/сPt) штаммов обладают измененным редокс-статусом по сравнению с лекарственно-чувствительным штаммом. Содержание глутатиона и уровень экспрессии гена *GCLM* (глутаматцистеинлигазы) в клетках этих штаммов достоверно повышены. В клетках штамма P388/ЦФ повышена экспрессия других генов биосинтеза глутатиона (*GPX1*) и (*GSR*) и обнаружена активация фактора Nrf2. Критерием эффективности терапии служил показатель увеличения продолжительности жизни (УПЖ, %). Использовали дозы ниже терапевтических — для сPt в 6,7 раза, а для ADR — в 5 раз. Антиоксидантную активность ТС-13, донора NO и их комбинаций определяли в модельных системах на гомогенатах клеток разных штаммов методом хемилюминесценции.

Результаты. На штамме P388/ЦФ применение сPt + ТС-13 (УПЖ 163 %) и сPt + NaNO_2 (УПЖ 223 %) дало повышение УПЖ по сравнению с сPt (УПЖ 100 %) на 63 и 123 %. Комбинация сPt + NaNO_2 + ТС-13 не дала желаемого аддитивного эффекта (УПЖ 244 %). На штамме P388/сPt комбинация ADR + NaNO_2 (УПЖ 104 %) была более эффективной по сравнению с ADR (УПЖ 66 %) и комбинацией ADR + NaNO_2 + ТС-13 (УПЖ 47 %). При применении ADR + ТС-13 УПЖ составило 70 %. По отдельности и в комбинации NaNO_2 и ТС-13 не показали п/о активности на обоих лекарственно-устойчивых штаммах. В модельных системах выявлено антиоксидантное действие ТС-13 и прооксидантное действие донора NO.

Закключение. При лечении данных лекарственно-устойчивых опухолей более эффективным является раздельное применение антиоксиданта и донора NO в комбинациях с цитостатиками. По-видимому, причиной уменьшения действия окислительного стресса является измененное редокс-состояние клеток штаммов P388/ЦФ и P388/сPt.

АНАЛИЗ АКТИВАЦИИ АДАПТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА В МОДЕЛИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ВАКЦИНАЦИИ ФДТ-ИНДУЦИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ГЛИОМЫ GL261

Т.С. Редькин¹, Е.Е. Слепцова¹, А.С. Абузова¹, М.О. Савюк¹,
Т.А. Мищенко¹, М.В. Ведунова¹, В.Д. Турубанова¹,
Д.В. Крысько²

¹ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского»

(Университет Лобачевского), Нижний Новгород;

²лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT),
Гентский университет, Гент, Бельгия

e-mail: big.tnsdav@outlook.com

Ключевые слова: иммуногенная клеточная смерть, фотосенсибилизатор, порфиразины, глиома, профилактическая противоопухолевая вакцинация, фотодинамическая терапия, молекулы, ассоциированные с повреждением

Введение. На сегодняшний день не разработано оптимального метода терапии онкологических заболеваний, который бы гарантировал выздоровление пациенту и отсутствие рецидива. Концепция иммуногенной клеточной смерти (immunogenic cell death, ICD) подразумевает активацию специфической противоопухолевой иммунной реакции в ответ на испускание молекул, ассоциированных с повреждением (DAMPs) вследствие смерти опухолевой клетки. ФДТ — один из способов борьбы с малигнизированными клетками, который способен вызвать ICD.

Цель исследования — изучение механизма активации специфического противоопухолевого иммунного ответа на ортотопический модели глиобластомы при иммунизации ФДТ-индуцированными опухолевыми клетками.

Материалы и методы. Клеточную линию глиомы GL261 подвергали ФДТ в дозе 20 Дж/см² с использованием тетра(арил)тетрацианопорфиразинов с разными арильными заместителями (pz I–IV). Суспензию умирающих/мертвых клеток вводили подкожно дважды с разницей в 7 дней самкам мышей линии C57Bl/6 (6–8 нед). Интракраниальная опухоль моделировали путем введения суспензии живых клеток GL261 по стереотаксическим координатам через 7 дней после последней иммунизации. В доклинических моделях иммунизации ИЛ-12 является мощным индуктором противоопухолевого иммунитета. Его появление говорит об активации адаптивной противоопухолевой реакции и коррелирует с лучшей выживаемостью животных (<https://doi.org/10.1038/cdd.2014.134>). Усилению продукции этого цитокина способствует взаимодействие в ходе антигенпрезентации CD40 костимулирующей молекулы на Т-клетке, а также ИФН- γ , активирующего антигенпрезентирующие клетки. Цитокины анализировали через 48 ч после привития опухоли. Активацию адаптивного противоопухолевого иммунного

ответа определяли по наличию в плазме крови животного CD8⁺-клеток (ИФН-γ) и γδ Т-клеток (ИЛ-12). Уровень цитокинов анализировали через 48 ч после привития опухоли ([https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80413-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80413-6)).

Результаты. Возможность активации адаптивного звена иммунной системы делает индукторы ICD — тетра(арил)тетрацианопорфиразины привлекательными для использования в терапии глиом.

Закключение. Увеличение уровня ИФН-γ и ИЛ-12 в биологическом материале животных после иммунизации в совокупности с выраженным противоопухолевым действием умирающих/мертвых клеток в качестве вакцины от интракраниальной опухоли говорит об активации опухолеспецифичного противоопухолевого иммунного ответа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-25-00716).

ВЛИЯНИЕ СТАТУСА БЕЛКА p53 НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ И ТРАНСЛЯЦИОННУЮ РЕГУЛЯЦИЮ МЕТАЛЛОШАПЕРОНА Atox1

А.Г. Рефельд, С.А. Цымбал, О.А. Кучур
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
университет ИТМО», Санкт-Петербург
e-mail: refeld@scamt-itmo.ru

Ключевые слова: p53, опухолевые клетки, метаболизм меди, Atox1, химиотерапия

Введение. Белок p53 ассоциирован со многими случаями приобретенной резистентности опухолевых клеток к терапии цитостатическими препаратами и ионизирующим излучением. При умеренных и низких дозах терапии он не направляет клетку по пути апоптоза, а способствует репарации повреждений генома. В литературе встречаются свидетельства, что этому может способствовать металлошаперон Atox1 — антиоксидант и транскрипционный фактор, запускающий экспрессию циклина D1. Однако сведения об их корегуляции противоречивы. Исследование молекулярных путей их взаимодействия может играть важную роль при выборе оптимальной стратегии комбинированной терапии различных типов злокачественных опухолей.

Цель исследования — установить взаимосвязь статуса p53 с активностью металлошаперона меди Atox1 на транскрипционном и трансляционном уровне в ходе ХТ на клеточных линиях HCT116 и A549.

Материалы и методы. В ходе исследования были использованы клеточные линии KPP (HCT116) и альвеолярной аденокарциномы (A549) человека с диким (WT) либо нокаутным p53 (p53KO). Для анализа транскрипции генов и индукции белков применены такие методы, как ПЦР в реальном времени, иммуноблоттинг, флуоресцентная микроскопия.

Результаты. Установлено, что в клетках с функционирующим p53 снижена экспрессия гена и индукция белка Atox1, ответы на цитостатические препараты, среди которых цисплатин, доксорубицин, блеомицин, а также на индуктор АФК (H₂O₂), также были статистически незначимыми. Экспрессия циклина D1 в клетках с диким типом p53 подавлена схожим образом. В то же время в клетках HCT116p53KO и A549p53KO активность как Atox1, так и циклина D1 значительно выше, особенно заметен рост индукции в 2–3 раза при обработке цисплатином, доксорубицином и блеомицином. В случае воздействия гамма-излучением (4 Гр) логика сохраняется: радиация активирует p53, при этом экспрессия Atox1 подавляется. В случае нокаутных по p53 клеточных линий после облучения наблюдается повышение активности Atox1 на ~30–40 %. Микроскопия на Atox1 в линиях A549 (WT и p53KO) подтверждает приведенные выше данные: белок p53 супрессирует активность металлошаперона Atox1.

Закключение. Согласно полученным данным, p53 подавляет экспрессию Atox1 как в интактных клетках, так и при индукции препаратами, гамма-радиацией. В клетках с инактивированным p53 индукция Atox1 заметно выше. Обоснование этого может заключаться в свойствах Atox1 как транскрипционного фактора, способного запускать экспрессию циклина D1. В этом случае роль p53 состоит в ингибировании Atox1 с целью не допустить прохождение клетки с повреждениями ДНК далее по клеточному циклу. Планируется изучение морфофункциональных и молекулярных характеристик опухолевых клеток с инактивированными генами TP53, Atox1 при химио- и радиотерапевтическом воздействии.

ИММУНОТЕРАПИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ

М.Ю. Рыков¹, И.С. Долгополов¹, Г.З. Чкадуа²

¹ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, Тверь;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: wordex2006@rambler.ru

Ключевые слова: глиобластома, иммунотерапия, дендритная вакцина, адаптивная терапия аллогенными клетками

Введение. Частота глиом высокой степени злокачественности составляет 35–46 % всех опухолей центральной нервной системы. Несмотря на комбинированную терапию, включающую хирургическое вмешательство, ЛТ и ХТ, общая 5-летняя выживаемость не превышает 10 %. Появление новых иммунотерапевтических стратегий послужило началом для нового направления в лечении данной категории пациентов.

Цель исследования — изучение возможности повышения выживаемости пациентов с глиомами.

Материалы и методы. В исследование были включены 5 пациентов в возрасте 2–16 лет (средний возраст 7,6 года). У 3 из них диагностирована анапластическая астроцитома, у 1 пациента — МГ (3-й рецидив) и еще у 1 пациента — диффузная глиома ствола мозга. Среднее время до развития 1-го рецидива составило 12 мес (4–16 мес), до развития 2-го — 5 мес (1–8 мес). Протокол иммунотерапии включал комбинированное введение аутологичной вакцины на основе ДК (ДВ) и повторные интратекальные/внутрижелудочковые инъекции донорских аллогенных иммунокомпетентных клеток в течение не менее 2 лет.

Результаты. У 2 из 3 пациентов с анапластической астроцитомой интервал без прогрессирования составил 67 и 71 мес. Без какой-либо терапии 1 пациент с 3-м рецидивом МГ жив через 13,3 года после начала иммунотерапии. Среднее время наблюдения составило 67 мес, общая 2-летняя выживаемость составила 58 %. В течение 6 и 7 мес от начала иммунотерапии 2 пациента умерли от прогрессирования заболевания. За период лечения пациенты получали в среднем 20 (8–60) инъекций аллогенных иммунокомпетентных клеток и 18 (8–44) инъекций ДВ. Побочных эффектов не наблюдалось.

Закключение. Иммунотерапия может быть привлекательным вариантом для лечения пациентов со злокачественными глиомами высокой степени злокачественности, не поддающимися традиционной терапии, и заслуживает дальнейшего изучения.

ИММУНОТЕРАПИЯ АУТОЛОГИЧНЫМИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ В СТРУКТУРЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ

А.Ю. Рында, В.Е. Олюшин, Д.М. Ростовцев

РНХИ им. проф. А.Л. Поленова — филиал ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург
e-mail: artemii.rynda@mail.ru

Ключевые слова: злокачественные глиомы, иммунотерапия, нейроонкология

Введение. Результаты лечения пациентов с злокачественными глиальными опухолями остаются неудовлетворительными, несмотря на достижения последних десятилетий в лечении этой категории больных. Иммунотерапия — одна из немногих активно развивающихся и перспективных методик в онкологии в последнее время.

Цель исследования — анализ результатов использования противоопухолевой иммунотерапии аутологичными ДК у пациентов с злокачественными глиомами.

Материалы и методы. Проанализированы отдаленные результаты лечения 220 больных злокачественными глиомами супратенториальной локализации (анапластические астроцитомы, глиобластомы, гигантоклеточ-

ные глиобластомы, глиосаркомы). Из них 110 пациентам, помимо стандартных методов лечения (хирургия, ЛТ и ХТ), проведена специфическая противоопухолевая иммунотерапия аутологичными ДК. В структуре комплексного лечения у 110 пациентов использовали только стандартные методы. Оценивали безрецидивный период и медиану продолжительности жизни.

Результаты. Проведение специфической противоопухолевой иммунотерапии у пациентов со злокачественными глиомами было безопасным и не привело к увеличению количества осложнений по сравнению с контрольной группой. Выявлено, что применение иммунотерапии на основе аутологичных ДК, помимо стандартных методов лечения, увеличивает среднюю продолжительность жизни (у пациентов с анапластическими астроцитомами до 40,5 мес ($p = 0,001$), у пациентов с глиобластомами до 21,8 мес ($p = 0,002$)) и повышает величину безрецидивного периода (у пациентов с анапластическими астроцитомами до 17,4 мес ($p = 0,002$), у пациентов с глиобластомами до 14,3 мес ($p = 0,003$)) при условии проведения ≥ 3 курсов. Проведение 1 или 2 курсов иммунотерапии существенно не влияет на среднюю продолжительность жизни и медианную выживаемость пациентов.

Закключение. Разработка и использование в клинической практике специфической противоопухолевой иммунотерапии на основе аутологичных ДК представляется очень перспективным направлением для дальнейших исследований, проведение которых позволит улучшить отдаленные результаты лечения пациентов.

НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ АВС-ТРАНСПОРТЕР-ОПОСРЕДОВАННОЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

А.В. Сагайдак, Т.А. Григорьева

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург
e-mail: aleksandrasagaidak@yandex.ru

Ключевые слова: множественная лекарственная устойчивость, АВС-транспортёры, Р-гр, BCRP, ингибитор АВС-транспортёров, нуклеотидсвязывающий домен, миметики АТФ, таксол

Введение. Трансмембранные белки семейства АВС — Р-гр и белок устойчивости РМЖ (BCRP) — играют важную роль в жизненном цикле клеток. Они обеспечивают выброс различных метаболитов и ксенобиотиков из клеток, включая лекарственные препараты. С увеличением лекарственной нагрузки на клетки повышается экспрессия генов транспортёров, что приводит к развитию устойчивости опухолевых клеток к терапии.

Для преодоления химиорезистентности клеток активно ведутся поиски ингибиторов транспортёров,

однако на данный момент ни один из предложенных кандидатов не смог показать должного результата и не прошел клинические испытания.

Мы предлагаем взглянуть на ингибирование Р-гр и BCRP с другой стороны. Всем известные ингибиторы направлены на трансмембранные домены транспортеров, однако нуклеотидсвязывающий домен (НСД), обеспечивающий связывание и гидролиз АТФ, необходимые для выброса субстратов из клетки, представляется более перспективным. Имеющий универсальную структуру, характерную для белков данного семейства, НСД и модуляторы, взаимодействующие с таким участком, смогут подавлять сразу несколько переносчиков, что позволит применять такой препарат для широкого спектра опухолей с разными профилями экспрессии генов ABC-транспортеров.

Цель исследования — изучить влияние соединений, имеющих структурное сходство с АТФ, на транспортную активность опухолевых клеток. Выбор молекул определялся их способностью вытеснять АТФ из НСД, что должно приводить к снижению транспортной активности Р-гр и BCRP. Мы оценивали способности таких миметиков АТФ, как АМФ, SN202, AICAR, рибавирин и DKPP ингибировать активность ABC-транспортеров химиорезистентных клеток.

Материалы и методы. На клеточной линии аденокарциномы толстой кишки человека, устойчивой к таксолу, было показано, что предложенные соединения способны влиять на транспортную активность белков.

Результаты. Соединения не изменяли уровни экспрессии генов белков Р-гр и BCRP, однако способствовали накоплению в клетках красителя Hoechst 33342, который является субстратом транспортеров. МТТ-тесты подтвердили, что соединения восстанавливают чувствительность опухолевых клеток к таксолу. Механизм действия соединений подтвержден люминесцентным анализом АТФазной активности рекомбинантного Р-гр, а компьютерное моделирование подтвердило, что рассматриваемые соединения способны связываться с НСД белков Р-гр и BCRP, воспроизводя укладку АТФ.

Заключение. Полученные данные говорят о том, что НСД — перспективная мишень для создания ингибиторов ABC-транспортеров, способных увеличить биодоступность лекарственных препаратов и преодолеть МЛУ.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МИКРООКРУЖЕНИЯ СЕРОЗНЫХ КАРЦИНОМ ЯИЧНИКА

В.В. Саевец^{1,2}, А.Ю. Шаманова^{1,2}, О.В. Подобед²

¹ГАОУ «Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины», Челябинск;

²ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск
e-mail: lalili2013@mail.ru

Ключевые слова: микроокружение, макрофаги, серозная карцинома, рак яичника

Введение. Существуют различные гистологические варианты эпителиальной опухоли при РЯ (серозная карцинома, муцинозная, светлоклеточная и др.). Гистоварианты РЯ гетерогенны и различаются по этиологии, морфологии, молекулярной биологии и прогнозу заболевания. Наряду с этим, по данным ряда авторов, гетерогенность отмечается также внутри одного гистологического варианта опухоли (среди опухолей низкой и высокой степени злокачественности), что косвенно отражает различные ответы на терапию, а также проявление резистентности к лечению. Последние годы активно обсуждается понимание роли микроокружения РЯ, что является перспективным для поиска новых подходов к терапии.

Цель исследования — провести ИГХ-оценку сосудистого и макрофагального компонентов микроокружения серозных карцином яичника (СКЯ) в зависимости от степени злокачественности опухоли.

Материалы и методы. Ретроспективно исследованы случаи серозных карцином яичника за период 2018–2020 г., T2–3CN0M1. Сформированы 1-я ($n = 10$) и 2-я ($n = 10$) группы исследования: случаи СКЯ низкой и высокой степени злокачественности соответственно. Проведено ИГХ-исследование ткани опухоли с применением маркеров кровеносных сосудов CD 34, макрофагов CD 68. С применением цифровой патологии проведен расчет объемной плотности кровеносных сосудов в строме опухоли и количества макрофагов. Проведена статистическая обработка результатов.

Результаты. В ходе исследования обнаружены морфологические различия в исследуемых группах. В 1-й группе СКЯ характеризовались преимущественно тубуло-папиллярным ростом со слабо выраженной цитологической атипией, отсутствием некрозов, тогда как СКЯ 2-й группы различались выраженным полиморфизмом ядер, большим количеством митозов, полями некроза ткани. При ИГХ-исследовании в 1-й группе статистически значимо меньше медиана объемной плотности кровеносных сосудов — 4,2 (2,1; 5,4) vs 7,4 (6,3; 11,4) во 2-й группе ($p = 0,00023$). Также в 1-й группе исследования преобладало количество макрофагов: 65 (58; 85) vs 35 (13; 47), $p = 0,0014$.

Заключение. Микроокружение опухоли является не только микросредой для роста и развития РЯ, но и подвержено качественно-количественным изменениям. При этом компоненты микроокружения могут проявлять как противоопухолевое, так и проопухолевое воздействие. Изученные параметры микроокружения могут быть перспективными с точки зрения дальнейшего определения возможных дополнительных точек терапевтического воздействия на серозную карциному яичника.

ФОСФОРИЛЗАМЕЩЕННЫЕ ПИРИДАЗИНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ СТЕРОИДОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КЛАСС МОДУЛЯТОРОВ РЕЦЕПТОРА ЭСТРОГЕНОВ α

Д.И. Сальникова^{1,2}, М.А. Козлов², О.С. Федянина^{2,3},
Ф.Б. Богданов^{1,4}, А.В. Комков², И.В. Заварзин²,
А.М. Щербаков¹, Ю.А. Волкова²

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

²ФГБУН «Институт органической химии
им. Н.Д. Зелинского РАН», Москва;

³ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической
фармакологии РАН», Москва;

⁴факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО
«МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва
e-mail: dianasalnikova08@yandex.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, рецептор эстрогенов α , гормональная терапия, 3-фосфорилзамещенные пиридазины

Введение. Рост большинства новообразований молочной железы регулируется стероидными гормонами, маркеры гормональной зависимости определяются в 60–70 % первичного рака. Эстрогены, проникая в опухолевую клетку, связываются со своей основной мишенью – рецептором эстрогенов α (ER α , ESR1). Разработка новых высокоселективных модуляторов ER α – одна из приоритетных задач онкофармакологии.

Интерес представляют гетероциклические производные стероидов, содержащие фосфорильный остаток. Введение в стероидный каркас фосфорилзамещенных гетероциклических остатков перспективно для получения противоопухолевых препаратов нового поколения, характеризующихся увеличенной цитотоксичностью и селективностью в отношении опухолевых клеток, улучшенной метаболической стабильностью и растворимостью в воде.

Цель исследования – изучение антипролиферативной и антигормональной активности новых фосфорилзамещенных пиридазиновых производных стероидов.

Материалы и методы. Впервые направленным синтезом были получены стероидные 3-фосфорилзамещенные пиридазины, аннелированные по кольцам А и D. Синтез 17 β -гидрокси-5 α -андроста-2-ен[3,2-d]пиридазинов был осуществлен с выходами 34–56 % в реакции тиогидразидов фосфорилтиомираваляновой кислоты с 3-хлор-2-формиландростаном. По аналогии синтез 3-ацетокси-андрост-5-ен[16,17-d]пиридазинов был реализован из 17-хлор-16-формилстероида с выходами 31–37 %. Оценка антипролиферативной активности выполнена методом МТТ, экспрессию белков оценивали с помощью иммуноблоттинга.

Результаты. Фосфорилзамещенные пиридазиновые производные стероидов ингибировали рост клеток молочной железы в микромолярных концентрациях. Значения IC₅₀ составили 5,9–24,3 мкМ для клеток гор-

монозависимого рака MCF7 и 7,4–22 мкМ для клеток трижды негативного рака MDA-MB-231. Лидерные соединения L-334 (6'-[дифенилфосфорил]-андрост-4-ен-3-он[16,17-d]пиридазин) и L-335 (6'-[дифенилфосфамид]-андрост-4-ен-3-он[16,17-d]пиридазин) проявили избирательную активность в отношении клеток MCF7 с индексом селективности 2,8 и 3,7 соответственно. Стероиды L-334 и L-335 не влияли на экспрессию рецептора андрогенов и андрогенрегулируемого гена PSA. Экспрессия ER α в клетках MCF7, обработанных выбранными соединениями, была значительно снижена. Стероид L-335 негативно регулировал экспрессию GREB1 и циклина D1, которые в гормонозависимых клетках РМЖ находятся под контролем эстрогенов.

Заключение. Получена новая серия фосфорилзамещенных пиридазиновых производных стероидов, показывающая антипролиферативную активность в отношении клеток РМЖ. Лидерные соединения оказывают модулирующие воздействия на сигнальные пути рецептора эстрогенов α в клетках MCF7.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 22-13-00161).

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ БИМЕДИЦИНЫ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ РАКА

И.М. Самохвалов¹, Ш. Захир², Е.С. Филоненко²,
А.В. Кубышкин¹

¹ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского», Симферополь;

²Институт биомедицины и здравоохранения Гуанчжоу, Китай
e-mail: igormikhail@aol.com

Ключевые слова: иммунотерапия рака, дендритные клетки, плюрипотентные стволовые клетки, дифференцировка

Введение. Дендритноклеточные вакцины являются одним из наиболее перспективных и безопасных методов иммунотерапии онкологических заболеваний. Однако применение дендритноклеточных вакцин на основе моноцитарных ДК, по доступным клиническим данным, приводило к заметным положительным изменениям только, примерно, в 15 % случаев. Альтернативный подход заключается в использовании ДК, полученных из аутологических индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (чиПСК). Это позволит создать практически неисчерпаемый источник пациентспецифичных ДК, обладающих более высокой функциональностью по сравнению с моноцитарными ДК. Современные методы дифференцировки чиПСК в ДК неэффективны и предполагают использование 3D-органоеидов, ксенобиотической фетальной сыворотки и стромальной культуры, которые плохо совместимы с клинической практикой и приводят к значительной вариабельности результатов.

Цель исследования — разработать эффективный и клинически совместимый метод генерации чиПСК-ДК.

Материалы и методы. Культивация чиПСК была проведена в среде mTeSR1 на Матригеле. Гемопозитическую дифференцировку чиПСК осуществляли в безсывороточной среде в присутствии VEGF без добавления гемопозитических цитокинов. Секвенирование РНК на клеточном уровне (single-cell RNA sequencing) и биоинформатический анализ произвела Novogene (Китай). Все МА были от BD Life Sciences (США). Проточную цитометрию проводили на BD LSRFortessa по стандартной методике.

Результаты. Разработан простой протокол получения ДК из различных линий чиПСК в клинически совместимых и химически детерминированных условиях культуры. Важнейшим элементом нашего подхода к дифференцировке чиПСК являлась наиболее близкая рекапитуляция процессов развития *in vivo*. Транскриптомный анализ на клеточном уровне показал, что дифференцировка чиПСК-производных CD34⁺CD45⁺ прогениторов приводит к появлению популяции клеток, специфично экспрессирующих такие маркеры, как DNASE1L3, CADM1, IRF8, XCR, CLEC9A и значительный ряд генов МНС-II комплекса, что характеризует эти клетки как ДК-предшественники. В течение 2 нед в присутствии цитокинов эти предшественники развивались в полноценные CD14⁺CD209⁺HLA-DR⁺-ДК с характерной морфологией.

Закключение. Наиболее эффективным подходом к инжинирингу чиПСК-ДК является близкое воспроизведение в клеточной культуре процессов, происходящих в эмбриогенезе и развитии врожденной иммунной системы.

РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ОЦЕНКЕ РАННЕГО ОТВЕТА ГЛИОБЛАСТОМЫ ПАЦИЕНТА НА ХИМИОТЕРАПИЮ С ПОМОЩЬЮ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО ИМИДЖИНГА

Д.А. Сачкова^{1,2}, Д.В. Южакова², И.Н. Дружкова²,
А.М. Можеров², М.В. Ширманова², К.С. Яшин²

¹ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского»

(Университет Лобачевского), Нижний Новгород;

²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород
e-mail: sachkova.collins@gmail.com

Ключевые слова: глиобластома, пациент-специфическая культура, химиотерапия, FLIM

Введение. Основной проблемой в области борьбы с глиобластомой является недостаточная эффективность существующих стандартных схем ХТ, не учитывающих индивидуальных особенностей опухоли пациента. Перспективным решением может являться разработка персонализированного подхода на основе использования пациентспецифических клеточных моделей и оценки раннего ответа на ХТ с помощью

инновационного метода FLIM метаболитических коферментов. В отличие от стандартных методов, FLIM не требует использования красителей, деструкции клеток и тканей, позволяет получать данные в режиме реального времени.

Цель исследования — разработать подход к оценке раннего ответа глиобластомы пациента на ХТ с помощью FLIM метаболитических коферментов.

Материалы и методы. Исследования проводили с использованием послеоперационного материала от пациентов с диагнозом глиобластомы (Grade IV). Краткосрочные культуры получали путем механической дезагрегации и культивирования мелких фрагментов опухоли. Лечение путем ХТ проводили препаратом Темодал (OrionPharma, Финляндия). Визуализацию автофлуоресценции кофермента НАД(Ф)Н осуществляли с помощью конфокального микроскопа LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM-приставкой TCSPC (Becker & Hickl, Германия) (возбуждение 375 нм, регистрация в диапазоне 435–485 нм).

Результаты. Создана библиотека краткосрочных культур глиобластом пациентов. Разработан оригинальный подход к оценке ранней чувствительности глиобластомы к ХТ, который включает оптимизированные условия экстракции и культивирования глиальных культур, схему химиотерапевтического воздействия с подбором индивидуальной полудозы дозы агента, оптимизированные параметры визуализации методом FLIM. Данный подход позволяет зарегистрировать изменения во времени жизни НАД(Ф)Н под воздействием терапии. Так, для культуры глиобластомы с полудозой Темодала 476 мкМ после 72 ч воздействия выявлено статистически значимое возрастание среднего времени жизни флуоресценции с $0,88 \pm 0,02$ до $1,01 \pm 0,01$ нс ($p = 0,001$), что может быть связано со сдвигом в сторону окислительного фосфорилирования. В свою очередь, данный сдвиг может указывать на снижение пролиферативной активности опухолевых клеток в результате терапии.

Закключение. Метаболический FLIM-имиджинг может служить эффективным инструментом для оценки ранней чувствительности опухолевых клеток и подбора персонализированной терапии глиобластомы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-75-00098).

ПРЕОДОЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К КИНАЗЕ АНАПЛАСТИЧЕСКОЙ ЛИМФОМЫ ПРИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

А.В. Селезнева

ГБУЗ г. Москвы «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова ДЗМ», Москва
e-mail: alinaselezneva15@yandex.ru

Ключевые слова: киназа анапластической лимфомы, транслокация ALK, немелкоклеточный рак

легкого, таргетная терапия, лекарственная устойчивость

Введение. После открытия киназы анапластической лимфомы (ALK) расширились возможности для таргетной терапии НМРЛ. Появление новых таргетных препаратов дало возможность селективно ингибировать молекулярные мишени у пациентов, никогда не куривших или имеющих незначительный стаж курения.

Цель исследования — найти оптимальную терапию для пациентов с ALK-позитивным статусом, изучить виды резистентности к таргетным препаратам.

Материалы и методы. Отобрано несколько рандомизированных клинических испытаний, в которых были включены пациенты с ALK НМРЛ.

Результаты. Работа заключалась в выявлении оптимальной терапии ингибиторами тирозинкиназ, селективных в отношении ALK-киназы, учитывая ALK-зависимый механизм резистентности.

Ингибиторы ALK представлены в 3 поколениях. Основным отличием 2-го и 3-го поколений от 1-го является способность преодолевать связанную с ALK устойчивость и лучшее проникновение в ЦНС. В III фазе открытого клинического исследования PROFILE 1014, куда вошли пациенты с распространенным ALK-положительным НМРЛ, которые ранее не получали системного лечения, выживаемость без прогрессирования заболевания была значительно выше при применении кризотиниба, чем при ХТ (медиана 10,9 мес vs 7,0 мес; ДИ 0,35–0,60; $p < 0,001$). Кризотиниб доказал свою эффективность в 1-й линии терапии по сравнению с ХТ пеметрекседом в комбинации с препаратами платины у пациентов с ранее не леченным НМРЛ. В исследовании III фазы J-ALEX пациентов рандомизировали 1:1 на группы приема алектиниба либо кризотиниба. Выживаемость без прогрессирования была выше в группе алектиниба. Препарат получил официальное одобрение FDA в 2017 г. и стал еще одним вариантом лечения 1-й линии при терапии ALK-позитивного НМРЛ.

Одна из причин развития фармакологической устойчивости заключается в неправильном соблюдении режима лечения, различиях проникновений через гематоэнцефалический барьер. К ALK-зависимой резистентности к таргетной терапии относят возникновение вторичных мутаций, меняющих активность ALK-киназы, что приводит к миссенс-мутациям. Распространенными мутациями считаются L1196M, L115R и G1269A, которые придают резистентность к кризотинибу. Устойчивость к ингибиторам 1-го поколения можно преодолеть с помощью ингибиторов ALK 2-го поколения. Еще одним механизмом, относящимся к ALK-зависимым механизмам резистентности, является амплификация гена *ALK*. Такой тип резистентности встречается реже и регистрируется у пациентов при терапии кризотинибом, у которых наблюдалось прогрессирование заболевания без других идентифицируемых мутаций.

Заключение. На данный момент существует несколько вариантов терапии 1-й линии. Появление ингибиторов тирозинкиназ 2-го и 3-го поколений, селективных в отношении ALK, изменило представление о лечении НМРЛ. Каждое последующее поколение обладает более высокой аффинностью к гену *ALK*, способностью преодолевать связанную с ALK устойчивость и отличается лучшим проникновением в ЦНС.

ШАПЕРОН ФАКТ ЧЕЛОВЕКА РАЗВОРАЧИВАЕТ НУКЛЕОСОМУ В ЛИНЕЙНУЮ СТРУКТУРУ В ПРИСУТСТВИИ АНТИРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ КУРАКСИНОВ

А.Л. Сивкина¹, О.И. Волох¹, А.В. Моисеенко^{1,2},
О.С. Соколова^{1,3}, В.М. Студитский^{1,4}

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

²ФГБУ «ФИЦ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН», Москва;

³Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, КНР;

⁴Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США
e-mail: anastasiia.sivkina@gmail.com

Ключевые слова: ФАКТ, нуклеосома, CBL0137, кураксина, электронная микроскопия, spFRET-микроскопия

Введение. Белковый комплекс ФАКТ человека (hFACT) является мишенью для противораковых препаратов кураксинов, которые индуцируют связывание ФАКТ с хроматином (c-trapping) и сильно ингибируют активность hFACT *in vivo*. C-trapping hFACT сопровождается образованием Z-ДНК и кураксинзависимым разворачиванием нуклеосом.

Цель исследования — определить структуру комплекса hFACT:кураксинCBL0137:нуклеосома.

Материалы и методы. Разворачивание нуклеосом комплексом hFACT в присутствии кураксинов исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с негативным контрастированием. Нуклеосомы и hFACT инкубировали в присутствии избытка кураксина CBL0137. Процесс разворачивания контролировали непосредственно перед ПЭМ с помощью spFRET-микроскопии, а обратимость разворачивания показывали путем добавления конкурентной ДНК. После контрольных экспериментов часть пробы наносили на сетки, контрастировали уранилацетатом и изучали методом ПЭМ.

Результаты. Методом spFRET продемонстрировано, что hFACT и CBL0137 вместе (но не по отдельности) вызывают разворачивание нуклеосомной ДНК. При изучении методом ПЭМ в образце, содержащем hFACT, нуклеосомы и кураксины, обнаружены открытые и закрытые классы частиц. Были реконструированы 3D-структуры открытых и закрытых комплексов. Закрытые комплексы характеризуются 4 плотностями: с 3 плотностями, соответствующими плотностям hFACT

в открытой конформации, и дополнительным 4-м доменом. Электронные плотности были сопоставлены различным доменам hFACT и коровым гистонам.

Заключение. Связывание hFACT с нуклеосомой в присутствии кураксина CBL0137 приводило к разворачиванию нуклеосом и сопровождалось образованием комплекса, содержащего гистоны и обе субъединицы hFACT. Данные позволяют предположить детальный механизм разворачивания нуклеосом АТФ-независимым комплексом FACT в присутствии ДНК-интеркалятора кураксина CBL0137.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-74-20018).

Электронная микроскопия выполнена на УНУ «3D-ЭМС» ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова».

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ КЛЕТОК ГЛИОМЫ, ПОДВЕРГШИХСЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕТРА(АРИЛ)ТЕТРАЦИАНОПОРФИРАЗИНОВ, СПОСОБСТВУЕТ АКТИВАЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА *IN VIVO*

Е.Е. Слепцова¹, Т.С. Редькин¹, М.О. Савюк¹,
Т.А. Мищенко¹, М.В. Ведунова¹, В.Д. Турубанова¹,
Д.В. Крысько²

¹ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского»
(Университет Лобачевского), Нижний Новгород;

²лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT),
Гентский университет, Гент, Бельгия
e-mail: ees222@list.ru

Ключевые слова: глиома, иммунотерапия, вакцинация, нейроонкология

Введение. На сегодняшний день ФДТ успешно используются в качестве противоопухолевой терапии. В ранних исследованиях уже было показано, что клетки глиомы GL261, подвергшиеся ФДТ на основе порфиразинов, обладают иммуногенным потенциалом (Turubanova et al. JTC 2019; Turubanova et al. Sci Rep 2021). В настоящем исследовании мы показываем эффективный иммунный противоопухолевый ответ при профилактической вакцинации умирающими клетками глиомы.

Цель исследования — анализ эффективности иммунизации вакциной на основе мертвых/умирающих клеток глиомы, подвергшихся ФДТ с использованием тетра(арил)тетрацианопорфиразинов.

Материалы и методы. Клетки глиомы GL261 культивировали по стандартному протоколу. Гибель клеток индуцировали ФДТ, в качестве фотосенсибилизаторов использовали тетра(арил)тетрацианопорфиразины с разными арильными заместителями. Клетки, подвергшиеся ФДТ, использовали для дальнейшей вакцинации. Клетки инокулировали подкожно дважды с разницей в 7 дней (-14-й день и -7-й день). На 0-й день проводили интракраниальную инокуляцию живых клеток

глиомы. Для оценки эффективности вакцинации ежедневно определяли неврологический статус, на 18-й день проводили оценку наличия опухолевого очага с помощью магнитно-резонансной томографии и ИГХ-методом.

Результаты. Оценка общей выживаемости, отсутствие неврологического дефицита, отсутствие опухолевого очага или его маленькие размеры показывают эффективность используемой профилактической вакцинации. Наличие инфильтрации CD4⁺-, CD8⁺-Т-клеток говорит о развитии эффективного иммунного ответа в отношении инокулированных клеток глиомы.

Заключение. Тетра(арил)тетрацианопорфиразины в комбинации с ФДТ-воздействием являются действенными индукторами иммуногенной клеточной гибели и могут стать основой для создания эффективной противоопухолевой вакцины.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-25-00716).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ПО СХЕМЕ FLOT ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Л.В. Спирина^{1,2}, А.В. Августинович¹, С.Г. Афанасьев¹

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

²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск
e-mail: spirinalvl@mail.ru

Ключевые слова: рак желудка, LC3B, mTOR, AMPK, неоадъювантная химиотерапия

Введение. Аутофагия играет двойную роль в процессах онкогенеза. Она повышает устойчивость клеток к онкогенным факторам, с другой стороны, аутофагия участвует в процессах метастазирования и прогрессирования опухолевого процесса.

Цель исследования — изучение взаимосвязи между эффективностью схемы FLOT при резектабельном РЖ и ключевыми белками, связанными с аутофагией.

Материалы и методы. В исследование были включены 34 пациента с морфологически верифицированным РЖ. Всем пациентам проводили НХТ по схеме FLOT (фторурацил, лейковорин, оксалиплатин и доцетаксел) с последующей резекцией желудка. Исследуемым тканевым материалом служили нетрансформированные и опухолевые ткани, полученные во время диагностической видеогастроскопии у пациентов до начала комбинированного лечения и после хирургического лечения. Экспрессию LC3B, mTOR и AMPK определяли методом ПЦР в реальном времени. Содержание белка LC3B определяли с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты. Уровень мРНК и содержание белка LC3B были связаны со стадией опухоли и наличием перстневидных клеток. Уровень мРНК AMPK был повышен у пациентов со стадией T4N0–2M0 в 37,7 и 7,33 раза, что,

следовательно, сравнивалось с пациентами со стадиями T2N0M0 и T3N0–1M0. Были отмечены противоположные изменения в mTOR и AMPK в GCs до начала противораковой терапии. Размер опухоли и поражения регионарных лимфатических узлов были связаны со снижением уровня мРНК mTOR. Снижение экспрессии mTOR сопровождалось увеличением экспрессии AMPK в GCs. Экспрессия mTOR была снижена у пациентов с распространяющимся раком; напротив, экспрессия AMPK возрастала вместе с размером опухоли. Наблюдалось увеличение экспрессии LC3B, что, вероятно, может определять ответ на терапию. Было зарегистрировано увеличение мРНК LC3B до начала лечения и содержания белка в раковых опухолях после НАСТ при снижении эффективности терапии. Было отмечено увеличение уровня белка у пациентов с частичной регрессией и стабилизацией в 3,65 и 5,78 раза соответственно по сравнению с пациентами, у которых была отмечена полная регрессия опухоли.

Заключение. Противоопухолевая эффективность зависит от экспрессии LC3B, mTOR и AMPK. Было обнаружено, что они являются перспективными молекулярными мишенями, влияющими на прогрессирование рака и метастазирование, а также на эффективность НАХТ.

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИЙ К ОТВЕТУ НА ТЕРАПИЮ ИНГИБИТОРАМИ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК У БОЛЬНЫХ ТРОЙНЫМ НЕГАТИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Л.А. Таширева, А.Ю. Калинчук, О.И. Ковалев,
В.В. Алифанов, Н.В. Крахмаль, Н.О. Попова,
В.М. Перельмутер

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: lkleftsova@mail.ru

Ключевые слова: рак молочной железы, ингибиторы контрольных точек, иммунные клетки

Введение. Проблема поиска более точных стратификационных критериев для определения когорты пациентов, которые получают максимальную пользу от терапии ингибиторами ИКТ, является актуальной. В данном исследовании мы изучили транскрипционные профили опухоли и микроокружения у больных РМЖ с различным статусом PD-L1 для того, чтобы найти возможные критерии прогноза ответа на иммунотерапию.

Цель исследования — сравнить экспрессии генов, сопряженных с ответом на терапию ингибиторами ИКТ, в зависимости от экспрессии белка PD-L1.

Материалы и методы. В исследование были включены 6 больных тройным негативным РМЖ (T1–2N0–2M0). Тестирование PD-L1 выполняли с помощью ИГХ-исследования (клон SP142, Ventana, США). Пространственный транскриптомный анализ выполняли с помощью технологии Visium 10× Genomics. Библио-

теки были подготовлены в соответствии с наборами реагентов Visium Spatial Gene Expression Reagent Kits for FFPE. Анализировали экспрессию генов в спотах, содержащих опухолевые клетки отдельно от спотов, представленных опухолевым микроокружением.

Результаты. Высокая экспрессия МНС-I/II и вариативность HLA коррелируют с ответом на ингибиторы ИКТ. Низкая концентрация TGFβ в микроокружении также связана с ответом на ингибиторы ИКТ. Поэтому мы оценили процент спотов с экспрессией HLA-DP, HLA-DM, HLA-DO, HLA-DQ и HLA-DR, а также TGFB1 и TGFB2, CD8A и CD4 в опухолях. Ген *HLA-DRA* (МНС-II) продемонстрировал сильную экспрессию во всех PD-L1-позитивных образцах, как и *HLA-DPA1*. Экспрессия TGFB1 была обнаружена более чем в 40 % спотов PD-L1-позитивных образцов. Кроме того, PD-L1-позитивные опухоли имели в 2–10 раз больше CD8A-экспрессирующих спотов, в 1,5–10 раз меньше TGFB2-экспрессирующих спотов и в 1,5–2 раза больше CD4-экспрессирующих спотов, чем PD-L1-отрицательные опухоли.

Заключение. Экспрессия PD-L1 не приводит к изменению профиля экспрессии генов *HLA*, но связана с разной выраженностью инфильтрации Т-клетками и экспрессии TGFβ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 20-75-10033).

ФУРАНСОДЕРЖАЩИЕ АНАЛОГИ ПРЕПАРАТА МИТОКСАНТРОН: ХИМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМЫ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

А.С. Тихомиров¹, Ю.Л. Володина², Л.Г. Деженкова¹,
Д.Н. Калюжный³, А.Е. Щекотихин¹

¹ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

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

³ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва
e-mail: tikhomirov.chem@gmail.com

Ключевые слова: митоксантрон, аналоги, механизм действия

Введение. Поиск аналогов противоопухолевых производных антрахинона (доксорубин, митоксантрон) нацелен на выявление усовершенствованных химиотерапевтических агентов. Перспективны гетероциклические производные антрахинона, высокоактивные в отношении ряда опухолевых клеток, включая резистентные линии. Среди внутриклеточных мишеней фураноантрахинонов — G-квадруплексы, топоизомеразы (топо) I и II, серин-треониновые протеинкиназы, деацетилаза Sirt 1, оксидаза tNOX.

Цель исследования — выявить механизмы гибели опухолевых клеток при действии соединений-лидеров ЛХТА-2402 и ЛХТА-2404 в ряду фураноантрахинонов.

Материалы и методы. Для получения новых фураноантрахинонов разработана оригинальная схема синтеза. Анализ антипролиферативной активности (МТТ-тест) проводили на клетках колоректальной аденокарциномы НСТ116, лейкоза K562 и сублинии K562/4 с Р-gp-опосредованной МЛУ. Связывание с дуплексом ДНК, а также влияние на активность топо I и II изучали *in vitro*. Внутриклеточное накопление, индукцию АФК, клеточный цикл и апоптоз исследовали методом проточной цитометрии.

Результаты. Вещества ЛХТА-2402 и ЛХТА-2404 подавляли рост тестируемых опухолевых клеток, включая резистентные, в близких концентрациях ($IC_{50} = 0,5-1,5$ мкМ). При сходстве структуры были обнаружены некоторые различия в действии: ЛХТА-2404 вызывало апоптоз 90 % популяции клеток K562 уже через 24 ч, а ЛХТА-2402 достигал аналогичных значений через 48 ч. Напротив, соединение ЛХТА-2402 на порядок лучше связывалось с дуплексом ДНК ($EC = 50$ нМ) и блокировало работу топоизомераз I и II, проявляя действие, аналогичное митоксантрону. Оба соединения не индуцировали образование АФК и хорошо накапливались в клетках.

Закключение. Соединения ЛХТА-2402 и ЛХТА-2404 обладают перспективным цитотоксическим действием, что указывает на целесообразность изучения противоопухолевой эффективности на моделях лабораторных животных, включая опухоли с МЛУ. Слабое действие ЛХТА-2404 на ДНК и топоизомеразы при высокой антипролиферативной активности указывает на альтернативные внутриклеточные мишени, поиск которых будет продолжен.

УСИЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИСПЛАТИНА И АКТИНОМИЦИНА D В ПРИСУТСТВИИ ПИРИДИНОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ГИДРОКСИЛАМИДА ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ

Б.А. Третьяков¹, Н.В. Филотова¹, В.А. Мумятова¹,
С.Я. Гадомский¹, А.А. Терентьев¹⁻³

¹ФГБУН «ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН», Черноголовка;

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

³Медико-биологический институт НОЦ ГОУ ВО МО
«Московский государственный областной университет»,
Черноголовка
e-mail: tretjakovba1@gmail.com

Ключевые слова: ингибитор гистондеацетилаз, цисплатин, актиномицин D, цитотоксичность, гидроксамовые кислоты

Введение. Традиционная ХТ ЗНО имеет ряд недостатков, связанных с токсическим действием на организм. Такие препараты, как цисплатин и актиномицин D, хорошо зарекомендовали себя в качестве агентов для противоопухолевой ХТ. Однако возникающие побоч-

ные эффекты при их использовании значительно ухудшают качество жизни пациентов. В связи с этим необходимы новые подходы для снижения токсической нагрузки на неопухолевые ткани. Это может быть достигнуто путем совместного использования химиотерапевтических препаратов с ингибиторами гистондеацетилаз (HDAC), которые выступают в качестве хемосенсибилизаторов цитостатических препаратов. Нами было получено новое соединение, имеющее в своем составе гидроксамовую группу, которая связывается с активным сайтом HDAC, в то время как остальная часть молекулы связывается с каналом фермента. Такое структурное соответствие должно приводить к снижению ферментативной активности HDAC.

Цель исследования — изучение влияния пиридинового производного гидроксиламида янтарной кислоты на цитотоксическое действие цисплатина и актиномицина D.

Материалы и методы. Пиридиновое производное гидроксиламида янтарной кислоты представляет собой N1-гидрокси-N4-(пиридин-4-ил)сукцинамид (1). Исследование ингибирующей активности соединения 1 проводили с помощью набора HDAC Activity Assay Kit (BioVision, США) и наборов Fluorogenic HDAC (1, 3, 6, 8) assay kit (BPS Bioscience, США). Исследование цитотоксичности соединения 1 на клетки HeLa (аденокарцинома шейки матки человека), HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека), A-172 (глиобластома человека), MCF7 (аденокарцинома молочной железы человека), Vero (эпителиальные клетки почки африканской зеленой мартышки) и цитотоксичности комбинаций цисплатина или актиномицина D с соединением 1 на опухолевые клетки HeLa и неопухолевые клетки Vero проводили с помощью МТТ-теста.

Результаты. Соединение 1 проявляет HDAC-ингибирующую активность в ядерных экстрактах клеток HeLa. В концентрации 10 мкМ ингибирующая активность составляет около 50 %. Соединение 1 преимущественно ингибирует HDAC3 и HDAC6. Соединение 1 в концентрации до 5 мМ слабо влияет на жизнеспособность клеток. При использовании комбинации цисплатина или актиномицина с соединением 1 наблюдается усиление цитотоксического действия противоопухолевых препаратов на клетки HeLa, в то время как в неопухолевых клетках Vero происходит его ослабление.

Закключение. Соединение 1 подавляет активность HDAC, усиливает цитотоксическое действие цисплатина и актиномицина D на опухолевые клетки HeLa и ослабляет цитотоксичность противоопухолевых препаратов для неопухолевых клеток Vero.

ДЕНДРИТНОКЛЕТОЧНАЯ ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИВОДИТ К ВЫРАЖЕННОМУ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОМУ ЭФФЕКТУ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛИОМЕ *IN VIVO*

В.Д. Турубанова¹, М.О. Савюк¹, Ю.В. Ефимова²,
Т.А. Мищенко¹, О.А. Крысько², М.В. Ведунова¹,
Д.В. Крысько²

¹ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского» (Университет
Лобачевского), Нижний Новгород;
²лаборатория исследования и терапии гибели клеток (CDIT),
Гентский университет, Гент, Бельгия
e-mail: vikaturu@mail.ru

Ключевые слова: иммуногенная клеточная смерть, DAMPs, дендритноклеточная вакцина, фотодинамическая терапия, иммунотерапия

Введение. Индукция иммуногенной клеточной смерти опухолевых клеток является перспективной основой иммунотерапии солидных опухолей, в том числе глиобластом. Глиобластомы являются наиболее распространенными опухолями головного мозга, характеризующимися высокой гетерогенностью, быстрым инвазивным ростом, высокой скоростью пролиферации, метастазирования, ангиогенеза (Louis et al. Neuro Oncol 2021, Sledzinska et al. Int J Mol Sci 2021). Индукция регулируемой иммуногенной гибели опухолевых клеток приводит к испусканию молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждениями (DAMPs). Они играют ключевую роль в созревании профессиональных антигенпрезентирующих клеток и активации противоопухолевого CD8⁺-Т-клеточного ответа (Mitsuya et al. Anticancer Res 2020; Rudnick et al. J Clin Neurosci 2020).

Одним из методов, вызывающих иммуногенную клеточную смерть в раковых клетках, является ФДТ. Умирающие/мертвые опухолевые клетки после ФДТ-индукции вызывают созревание компонентов иммунной системы *in vitro* и активируют противоопухолевый адаптивный иммунный ответ в моделях профилактической вакцинации *in vivo* (Garg et al. Sci Transl Med 2016; Turubanova et al. JTC 2019; Turubanova et al. Sci Rep 2021).

Ранее нами было продемонстрировано, что дендритноклеточные вакцины, загруженные фотоиндуцированными клетками, профилактически активируют стойкий адаптивный иммунный ответ в ортотопической модели глиомы.

Цель исследования — разработка терапевтического протокола дендритноклеточной вакцинации на основе фотоактивированных опухолевых клеток для ортотопической модели глиомы.

Материалы и методы. В работе использовали клеточную линию глиомы мыши GL261, фотосенсибилизатор фотосенс (Ниопик, Россия); эксперименты *in vivo*

проводили с использованием мышей линии C57BL/6, из них же изолируются ДК костного мозга.

Результаты. Показано, что иммунизация животных дендритноклеточной вакциной на основе фотоактивированных фотосенсом опухолевых клеток оказывает терапевтический эффект: значительно увеличивает выживаемость животных, приводит к замедленному развитию опухолевого очага, улучшает неврологическое состояние животных в эксперименте и повышает количество активированных компонентов адаптивного иммунитета в периферических лимфатических узлах.

Заключение. Лечение мышей дендритноклеточной вакциной на основе ФДТ-индуцированных клеток приводит к выраженному терапевтическому эффекту.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-15-00279).

ИНГИБИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА СЕНСИБИЛИЗИРУЕТ DOX-РЕЗИСТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ САРКОМЫ ЮИНГА К ОНКОЛИТИЧЕСКОМУ АДЕНОВИРУСУ

И.В. Уласов¹, С.В. Цибульников¹, С.И. Якушов¹,
Е.С. Денисов², Е.Д. Файзуллина¹, Е.Д. Беляева¹,
М.Ю. Стемпень¹, О.М. Романцова³, К.И. Киргизов³,
С.А. Калинин⁴, А.А. Недорубов¹, П.С. Тимашев¹

¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России (Сеченовский Университет), Москва;

²ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

³НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НИИ
онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

⁴химический факультет ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет», Санкт-Петербург
e-mail: ulasov75@yahoo.com

Ключевые слова: саркома Юинга, терапия, карбоангидразы клетки

Введение. Выживаемость пациентов с саркомой Юинга (СЮ), крайне агрессивной злокачественной опухолью, при локализованной форме составляет 60–70 %, а при метастатической — 20–45 %, долгосрочная же выживаемость после рецидива составляет 20–30 %.

Цель исследования — поиск факторов, регулирующих резистентность опухоли, а также разработка терапевтической стратегии для ее преодоления.

Материалы и методы. Биоинформатический анализ тканевых образцов СЮ, единичных клеток, протеомный анализ DOX-резистентных клеток, Gene Ontology, данных литературы позволили предположить связь между экспрессией MGST1, COL6A2 с высоким уровнем экспрессии карбоангидраз в DOX-резистентных первичных клетках. Тестирование панели химических ингибиторов карбоангидраз человека в качестве монотерапии так же, как и в комбинации с онколитическим аденовирусом, проводили методом с аламаровым синим и LDH *in vitro*.

Результаты. Мы обнаружили, что в сравнении с эмбриональными фибробластами первичные культуры клеток СЮ были чувствительны к 4 из 10 ингибиторов карбоангидраз, включая те, которые демонстрировали резистентность к DOX. Чувствительность к данным ингибиторам коррелировала с уровнем экспрессии гена карбоангидраз типа 1. Терапия опухолевых клеток селективными ингибиторами карбоангидраз *in vitro* в присутствии онколитического аденовируса показала значительное снижение выживаемости клеток и усиливала антипролиферативный эффект ингибиторов карбоангидраз в комбинации. На молекулярном уровне мы обнаружили, что при ингибировании CA1 уровни экспрессии антиапоптотических белков, таких как BCL2 и MCL1, уменьшены пропорционально.

Заключение. Совместное применение ингибиторов карбоангидраз и онколитического аденовируса может составить новую терапевтическую комбинацию. В целом, эти данные подтверждают терапевтическую ценность ингибирования карбоангидраз в качестве новых мишеней для таргетной монотерапии или в комбинации с онколитическим аденовирусом для лечения DOX-резистентных форм СЮ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-15-00213).

СЕКРЕЦИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА 10 ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ СТИМУЛЯЦИИ СОЗРЕВАНИЯ

Ф.А. Фадеев, А.Д. Никанорова

ГИАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
Екатеринбург
e-mail: fdf79@mail.ru

Ключевые слова: дендритные клетки, интерлейкин 10, дендритноклеточная терапия

Введение. Дендритноклеточные вакцины являются перспективным средством персонифицированной клеточной терапии онкологических заболеваний. Выращенные *in vitro* ДК сенсibilизируются опухолеассоциированными антигенами. После введения пациенту ДК презентируют эпитопы антигенов Т-лимфоцитам, активируя противоопухолевый иммунный ответ.

Одной из проблем применения дендритноклеточных вакцин является возможность приобретения ДК толерогенных свойств, что выражается, в частности, в секреции ими противовоспалительных цитокинов, подавляющих активацию Т-звена иммунитета, к числу которых относится ИЛ-10.

Цель исследования — оценить уровень секреции ИЛ-10 выращенными *in vitro* ДК при различных способах стимуляции созревания.

Материалы и методы. Моноциты крови подвергали дифференцировке в ДК в среде с GM-CSF и ИЛ-4. Стимуляцию созревания полученных незрелых ДК

осуществляли с использованием различных смесей: 1) ФНО- α ; 2) polyIC; 3) липополисахарид (ЛПС); «коктейль» ФНО- α + ИЛ-1 + ИЛ-6 + PGE2; 4) лизат опухолевых клеток. Иммунофенотип ДК определяли методом проточной цитофлуориметрии. Концентрацию ИЛ-10 оценивали с помощью ИФА.

Результаты. При всех способах стимуляции ДК приобретали «зрелый» иммунофенотип. В контроле (без стимуляции созревания), а также при использовании ЛПС и лизата уровень секреции ИЛ-10 был минимальным. При стимуляции ФНО- α уровень секреции данного цитокина был значительно выше ($8,08 \pm 0,93$ пг/мл). Возможно, в этом случае активация транскрипции гена, кодирующего ИЛ-10, происходит через фактор транскрипции AP-1. Максимальный уровень секреции ИЛ-10 ($17,78 \pm 3,08$ пг/мл) отмечен при использовании polyIC, который является лигандом TLR3. По данным литературы, связывание TLR3 с лигандом приводит к усилению секреции данного цитокина. При использовании «коктейля» уровень секреции ИЛ-10 был невысоким ($3,49 \pm 1,33$ пг/мл).

Заключение. Использование ЛПС и содержащихся в лизате DAMPs для стимуляции созревания ДК обеспечивает минимальный уровень секреции ими иммунорегуляторного цитокина ИЛ-10. В то же время разработка технологии получения ДК для противоопухолевой терапии требует комплексного подхода с учетом также секреции цитокинов, участвующих в активации Т-звена иммунитета, и уровня экспрессии рецепторов, обеспечивающих миграцию ДК в лимфатические узлы и взаимодействие с Т-лимфоцитами. По нашим данным (неопубликованным данным), оптимальное соотношение между экспрессией ДК факторов активации иммунного ответа и иммунорегуляторных факторов достигается при использовании «коктейля».

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСОВ ПЛАТИНЫ (IV), СОДЕРЖАЩИХ АМИНОКСИЛЬНЫЕ И ДИХЛОРАЦЕТАТНЫЕ ЛИГАНДЫ

Н.В. Филатова¹, С.А. Джоусе-Иванина²,
А.А. Терентьев¹⁻³, В.Д. Сень¹

¹ФГБУН «ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН», Черноголовка;

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

³Медико-биологический институт
НОЦ ГОУ ВО МО «Московский государственный областной университет», Черноголовка
e-mail: komlevanataly@gmail.com

Ключевые слова: комплексы Pt(IV), аминоксильные радикалы, дихлорацетат, цитотоксичность

Введение. Комплексы Pt(II) широко применяются в противоопухолевой терапии, однако они вызывают серьезные побочные эффекты. Комплексы Pt(IV) более

инертны и менее токсичны для животных. Координация биологически активных лигандов в комплексе Pt(IV) рассматривается как перспективный подход к улучшению химиотерапевтических свойств. Нами синтезированы комплексы Pt(IV) с аминоксильным радикалом, обладающим антиоксидантными свойствами, и дихлорацетатными аксиальными лигандами, способными ингибировать процесс гликолиза.

Цель исследования — изучение цитотоксических свойств новых полифункциональных комплексов Pt(IV).

Материалы и методы. Новые комплексы имеют общую структуру Pt(IV)(NH₃)(R • NH₂)Cl₂X₂, где R • NH₂ — аминоксильный радикал (пирролидиновый (a) и пиперидиновый (b)), X — аксиальные лиганды (ацетатные (1a, 1b) и дихлорацетатные (2a, 2b)). Исследование проводили на опухолевых клетках HeLa, HerG2, MCF7 и неопухолевых клетках Vero с помощью МТТ-теста.

Результаты. Цитотоксичность комплексов 1a, b оказалась существенно ниже по сравнению с цисплатином и комплексом Pt(IV) JM216. При замене ацетатных лигандов на дихлорацетатные наблюдается повышение цитотоксичности 2a, b относительно 1a, b. Комплексы с пирролидиновым радикалом 1a и 2a менее токсичны для клеток. При этом повышение цитотоксичности более выражено для опухолевых клеток, а соединение 2b наименее токсично для неопухолевых клеток, в то время как все исследованные линии опухолевых клеток более чувствительны к действию данного комплекса.

Закключение. Внесение аминоксильных радикалов и дихлорацетатных лигандов в структуру комплекса Pt существенно изменяет профиль цитотоксичности. Аминоксильные комплексы, содержащие дихлорацетатные лиганды, обладают повышенной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам и менее токсичны для неопухолевых клеток, что может быть связано с нарушением редокс-баланса и ингибированием процесса гликолиза дихлорацетатом в опухолевых клетках.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (№ АААА-А19-119092390041-5, АААА-А19-119071890015-6).

АБЕРРАНТНЫЕ СОСТОЯНИЯ В ГЕНАХ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

А.А. Фролова^{1,2}, М.К. Ибрагимова¹⁻³, М.М. Цыганов^{2,3}

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

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

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

e-mail: frolova_aa@onco.tnims.ru

Ключевые слова: гомологичная рекомбинация, химиочувствительность, рак молочной железы, цисплатин

Введение. Механизмы развития химиочувствительности опухоли к препаратам являются одним из основных направлений исследований в современной онкологии. Активация процесса гомологичной рекомбинации (ГР) в опухоли обуславливает высокую репаративную активность ДНК и, как следствие, низкую чувствительность опухоли к препаратам. Наличие же дефицита данного процесса за счет накопления нарушений в генах ГР приводит к нарушению активации пути и, наоборот, высокой чувствительности опухолевых клеток к цитотоксическим препаратам, в частности, к цисплатину.

Цель исследования — оценить влияние наличия aberrантных состояний генов ГР на химиочувствительность опухолевых клеток к цисплатину.

Материалы и методы. Анализ CNA-генетического ландшафта опухолевых клеток РМЖ — MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T-47, SKBR-3 и PL — A549 проводили с использованием микрочипов CytoScan HD Array. Транскриптомный анализ осуществляли на платформе Clariom S Assay. Пролиферацию опухолевых клеток оценивали в режиме реального времени в течение 48 ч после добавления цисплатина в концентрациях 10, 20 и 30 мкг/мл.

Результаты. В ходе анализа CNA-генетического ландшафта опухоли молочной железы и легкого было обнаружено наличие делеций в таких генах ГР, как *BRCA1*, *ATM*, *CDK12*, *CHEK1*, *BRCA2*, *BARD1*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD54L*. Данная картина была характерна для клеточных линий MCF7, MDA-MB-231, T-47, SKBR-3, A-549, у которых наблюдалось снижение пролиферации на 50–60 % через 24 ч в ответ на добавление препарата в минимальной концентрации с последующей гибелью клеток. Однако отсутствие делеций генов ГР в клеточной линии MDA-MB-468 существенно повлияло на их реакцию. Несмотря на добавление препарата в разной концентрации, клетки продолжали пролиферировать, что свидетельствует о наличии механизмов сопротивления и развития химиорезистентности данной клеточной линии.

Закключение. Анализ генетического ландшафта опухолевых клеток выявил наличие делеций в генах ГР, влияющих на их способность развивать устойчивость к препаратам платинового ряда. Отсутствие генетических мутаций в генах ГР позволяет клеткам приобретать резистентность к химиопрепаратам. Полученные результаты позволяют исследовать эти гены в дальнейшем как новые мишени для терапии РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-15-00169).

КУРКУМИН И КВЕРЦЕТИН ПРЕОДОЛЕВАЮТ УСТОЙЧИВОСТЬ К ЦИСПЛАТИНУ ЧЕРЕЗ МОДУЛЯЦИЮ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ PI3K/Akt И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В КЛЕТКАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА

А.А. Хасан¹, Е.В. Калинина¹, Д.Д. Жданов¹,
Ю.Л. Володина², А.А. Штиль², В.В. Татарский³

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
Москва;

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

³ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва
e-mail: ali.aseel.hasan@gmail.com

Ключевые слова: куркумин, кверцетин, апоптоз

Введение. Развитие резистентности к химиотерапевтическим препаратам остается серьезным препятствием для успешного лечения опухолей. Возникновение такой устойчивости связано с различными механизмами, включая гиперэкспрессию ферментов антиоксидантных систем, дефекты регуляции апоптоза и активации сигналов выживания клеток.

Цель исследования — оценить противоопухолевую роль кверцетина и куркумина в преодолении лекарственной устойчивости к цисплатину в клетках аденокарциномы яичника SKOV-3 и ее устойчивой сублинии SKOV-3/CDDP.

Материалы и методы. Исследование проводили на линии клеток SKOV-3 и сублинии SKOV-3/CDDP, отобранных на устойчивость к цисплатину. Для анализа цитотоксичности куркумина и кверцетина и их комбинаций с цисплатином применяли МТТ-тест. Для исследования клеточного цикла и определения доли апоптотических клеток использовали метод проточной цитометрии. Экспрессию генов и уровень белков оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга соответственно.

Результаты. Предварительная инкубация обеих клеточных линий с куркумином или кверцетином увеличивала цитотоксический эффект цисплатина как для чувствительных, так и для резистентных сублиний. Куркумин и кверцетин через 24 ч инкубации вызывали остановку клеточного цикла в фазах G2/M и S соответственно, последующее добавление цисплатина индуцировало митохондриальный апоптоз (накопление клеток в фазе суб-G1, расщепление каспаз 9, 3, 7 и PARP). Предварительная обработка куркумином или кверцетином приводила к эффективному обращению устойчивости SKOV-3/CDDP к цисплатину посредством снижения уровня экспрессии генов и белков антиоксидантной системы — тиоредоксина (Trx-1, Trx-2, TrxR-1 и TrxR-2), пероксиредоксинов (Prx-1, Prx-2, Prx-4, Prx-5 и Prx-6), ферментов-антиоксидантов (SOD-1, SOD-2, Gpx-1, Cat и HO-1), фактора транскрипции Nrf-2, а также генов и белков сигнального пути PI3K/Akt/mTOR.

Заключение. Результаты исследования позволяют предположить, что куркумин и кверцетин усиливают противоопухолевую активность цисплатина за счет подавления антиоксидантной системы и сигнального пути PI3K/Akt/mTOR. Таким образом, их применение в комбинации с цисплатином можно рассматривать как потенциальную стратегию терапии РЯ.

АНАЛИЗ КОРРЕЛЯЦИЙ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ HFE (RS1800562, RS1799945) И ТРАНСФЕРРИНА (RS1049296) С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ДЕФИЦИТОМ ЖЕЛЕЗА У БОЛЬНЫХ С ДИАГНОЗОМ РАКА ЯИЧНИКА

В.А. Хорохорина, Н.И. Сыченкова, Л.И. Крикунова,
М.В. Полужетова, Т.И. Иванова

МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России, Обнинск
e-mail: khorokhorina@rambler.ru

Ключевые слова: функциональный железodefицит, рак яичника, полиморфизм генов

Введение. На момент постановки диагноза злокачественного заболевания часто наблюдается функциональный дефицит железа, когда его общее количество в норме или повышено вследствие нарушения рециркуляции железа, и, как следствие, — накопление в ферритине. Транспорт железа и депонирование осуществляется посредством комплексов железо—трансферрин и железо—ферритин соответственно. С прогрессированием ЗНО функциональный дефицит железа развивается в анемию (АЗН). В 68 % случаев РЯ сопровождается АЗН. Своевременное выявление функционального железodefицита и АЗН крайне важная задача, поскольку во время терапии цитостатиками на их фоне развиваются серьезные побочные эффекты, в большой степени снижающие эффективность лечения. Молекулярные механизмы патогенеза не изучены.

Цель исследования — анализ корреляций 3 распространенных полиморфизмов генов статуса железа (HFE G845A rs1800562 и C187G rs1799945; трансферрин, TF C570T rs1049296) с функциональным дефицитом железа у больных с диагнозом РЯ.

Материалы и методы. Группу исследования составили пациентки (n = 121) в возрасте 17–75 лет (медиана — 54 года), у большинства из которых диагностирована серозная аденокарцинома III и IV стадий заболевания по классификации FIGO. Функциональный железodefицит выявлен у 69 (57 %) человек. Показатели статуса железа определялись на анализаторе Beckman Coulter серии AU. Оценивали частоту генотипов и аллелей исследуемых генов. Материалом являлась ДНК клеток периферической крови. Для генотипирования использовали методику ПЦР с последующей обработкой специфической рестриктазой и определением длины фрагментов рестрикции (ПЦР/ПДРФ)

в полиакриламидном геле. При проведении статистического анализа использовали пакеты программ Med Calc 14.8.1, Excel. Для оценки связи между показателями и статусом здоровья использовали корреляционный анализ по методу Спирмена.

Результаты. Выявлены 24 пациентки — носительницы аллеля C2 (*TF*, rs1049296), 43 пациентки — носительницы аллеля G (*HFE* rs1799945) и 2 женщины с полиморфизмом *HFE* G845A rs1800562. Корреляционный анализ выявил значимую ($p < 0,05$) слабую положительную связь аллеля C2 гена *TF* с функциональным железodefицитом. Связей между полиморфизмами *HFE* и функциональным железodefицитом не обнаружено.

Заключение. Генный полиморфизм трансферрина представляет интерес для более грубого анализа закономерностей патогенеза функционального железodefицита у больных злокачественными заболеваниями яичников.

ФОРМИРОВАНИЕ ДЕФИЦИТА ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, А.А. Фролова,
Е.Ю. Гарбуков, О.Д. Брагина, Н.О. Попова, Н.В. Литвяков
НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск
e-mail: TsyganovMM@yandex.ru

Ключевые слова: *BRCA1*, дефицит гомологичной рекомбинации, абберации числа копий ДНК, экспрессия, противоопухолевая терапия

Введение. В настоящее время показано, что наличие дефицита гомологичной рекомбинации (ДГР) в опухоли молочной железы может иметь важное значение для лечения, в частности для назначения препаратов платины и таксанов. Но важно отметить, что формирование ДГР у больных РМЖ в зависимости от стадии заболевания может отличаться и иметь важное предиктивное и прогностическое значение у конкретных пациентов.

Цель исследования — сравнительный анализ спектра нарушений гена *BRCA1* на всех стадиях опухоли молочной железы и проведение оценки эволюционных изменений.

Материалы и методы. В исследование включены 216 больных РМЖ IA–IV стадии. В соответствии со стадией заболевания пациентам назначалось лечение, которое включало проведение НХТ, операции и адъювантной ХТ. Для анализа аббераций числа копий (CNA) и наличия участков потери гетерозиготности (ЛОН) проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах. Уровень экспрессии генов оценивали с помощью ОТ-ПЦР.

Результаты. Установлено, что частота хромосомных аббераций (делеций и амплификаций) для I стадии

составляет всего 6,6 % от общего числа аббераций, при ПА и ПВ стадии наблюдается резкий рост частоты нарушений до 38,5 и 27,5 % соответственно. При IIIA, IIIB и IIIC частота делеций и амплификаций значительно ниже — 11; 2,2 и 7,7 %. У пациентов с диссеминированным РМЖ частота нарушений аналогична пациентам с I стадией и равна 6,6 %. Стоит обратить внимание, что у пациентов с IV стадией наблюдается заметный рост частоты амплификаций и снижение частоты ЛОН. Обратная зависимость показана для экспрессии, средние значения уровня экспрессии *BRCA1* обратно пропорциональны частоте аббераций. Наибольший уровень экспрессии наблюдается у пациентов с диссеминированной формой РМЖ (>2). Частота наличия участков потери гетерозиготности выше у пациентов с ПА и ПВ стадиями: 36,1 и 26,1 % соответственно, низкие значения характерны для I и IV стадий: 8,4 и 9,2 % соответственно. Показано, что наличие абберантного состояния *BRCA1* сопряжено с низкой частотой гематогенного метастазирования, вне зависимости от стадии, и высокой частотой объективных ответов на предоперационную ХТ.

Заключение. Проведенный сравнительный анализ нарушений в гене *BRCA1* показал, что формирование ДГР уменьшается со стадией заболевания. Причем при диссеминированной форме РМЖ наблюдается увеличение частоты амплификаций и нормального состояния гена, что может указывать на эволюционное изменение нарушений в пользу формирования нормальной функциональной активности *BRCA1* и процесса гомологичной рекомбинации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 22-15-00169).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ КОМБИНАЦИИ МЕДЬОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ И N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА МОДЕЛИ ПОЛОСТНЫХ МЕТАСТАЗОВ IN VIVO

С.А. Цымбал¹, Ю.Г. Змитриченко², А.А. Штиль³

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО», Санкт-Петербург;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва

e-mail: zimbals@scamt-itmo.ru

Ключевые слова: лекарственная устойчивость, активные формы кислорода, медьорганические комплексы, восстановители, клеточная гибель

Введение. Одним из самых серьезных факторов, ограничивающих эффективность ХТ опухолей, является формирование лекарственной устойчивости. Борьба с пулом резистентных клеток становится отдельной

задачей лечения. Препараты меди являются перспективными противоопухолевыми агентами, эффективность которых сравнима с цисплатином. В данной работе было выявлено значительное усиление цитотоксического эффекта данных соединений, вызванное добавлением N-ацетилцистеина, который может помочь в элиминации опухолевых клеток с фенотипом приобретенной лекарственной устойчивости.

Цель исследования — изучить свойства комбинации медьсодержащих соединений и N-ацетилцистеина в контексте их применения для борьбы с лекарственной устойчивостью опухолевых клеток.

Материалы и методы. В работе использовали следующие медьсодержащие соединения: наночастицы оксида меди, медьорганические комплексы и ацетат меди (соль). Цитотоксичность оценивали в МТТ-тестах для различных культур опухолевых клеток. Проточную цитофлуориметрию использовали для определения механизма и динамики клеточной гибели, измерения митохондриального потенциала, выявления распределения фаз клеточного цикла. Обнаружение апоптотических маркеров осуществляли методом вестерн-блоттинга.

Результаты. Медьорганические комплексы были предоставлены коллегами с кафедры электрохимии МГУ им. Ломоносова. N-ацетилцистеин приводил к значительному увеличению цитотоксического потенциала всех медьсодержащих соединений, причем клеточная гибель развивалась в первые 6–8 ч. Цитотоксическое действие было неспецифичным и проявлялось в том числе для сублиний с лекарственной устойчивостью, например K562/4. Данные вестерн-блоттинга, проточной цитофлуориметрии и микроскопии позволяют сделать вывод о быстрой некротизации, вызванной окислительным стрессом и нарушением целостности плазматической мембраны. Предварительные эксперименты на животных показывают, что введение комбинации в брюшную полость мышей с привитой опухолью Эрлиха способно предотвращать дальнейшее развитие опухоли вплоть до ее полного исчезновения. Однако результаты не достигли статистически достоверных значений из-за малого размера выборки.

Закключение. Добавление N-ацетилцистеина способно значительно усиливать цитотоксичность медьсодержащих соединений, приводя к быстрой гибели популяции опухолевых клеток. Хотя противоопухолевая активность комбинации и не была достоверно подтверждена в экспериментах *in vivo*, однако данные позволяют сделать оптимистичные заключения. В будущих экспериментах планируется провести испытания с вовлечением большего количества животных и новых типов опухолей.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ СТАВУДИНА В КОМБИНАЦИИ С ГМА НА ЭКСПРЕССИЮ LINE1 И УРОВЕНЬ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

И.А. Чернова, Х.М. Магомедова, О.А. Власова, В.А. Нуртдинова, А.А. Борунова, Т.Н. Заботина, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва
e-mail: irincher96@yandex.ru

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, ставудин, децитабин, 5-азацитидин, повреждение ДНК

Введение. Противоопухолевое действие ГМА в отношении ОМЛ связывают с активацией транскрипции эпигенетически подавленных генов-супрессоров опухолевого роста. Однако при действии данных соединений наблюдается также снятие эпигенетической репрессии эндогенных ретровирусов и повторяющихся последовательностей, включая ретротранспозоны LINEs. Активная ретротранспозиция LINE1, в свою очередь, приводит к нежелательному инсерционному мутагенезу, способствуя развитию генетической нестабильности. Для предотвращения нежелательного эффекта мы предлагаем исследовать механизмы действия ГМА в комбинации с ингибиторами обратной транскриптазы вирусов, применяемыми в схемах антиретровирусной терапии.

Цель исследования — изучение влияния ингибитора обратной транскриптазы ставудина на индуцируемые ГМА активацию экспрессии LINE1 и уровень повреждений ДНК.

Материалы и методы. Уровень специфической транскрипции LINE1 оценивали методом иммунофлуоресцентного окрашивания клеток (антителами к белкам ORF1 LINE1) с последующим анализом распределений популяций обработанных и контрольных клеток на проточном цитометре (BD FACS Calibur). Клетки ТНР-1 были обработаны соединениями интереса в нетоксичных концентрациях с временной экспозицией 72 ч.

Уровень повреждений ДНК оценивали методом ДНК-комет с использованием клеток линии ТНР1 в соответствии с рекомендациями OECD.

Результаты. Методом ДНК-комет для клеток ТНР1, обработанных деметилирующими агентами 5-азацитидин и децитабин в концентрациях 10 и 20 μM , было показано статистически значимое увеличение величины «момента хвоста комет» относительно необработанных клеток. Однако в комбинациях данных препаратов со ставудином в концентрации 100 μM количество показанных повреждений уменьшалось в среднем в 1,6 раза для децитабина и в 1,8 раза для 5-азацитидина. Методом иммунофлуоресцентного окрашивания клеток с последующим анализом на проточном цитометре было показано уменьшение в 1,7 и 2,1 раза количества белка

ORF1 LINE1 в клетках популяции для 2 исследуемых комбинаций соответственно, в отличие от популяции клеток, обработанных только децитабином и 5-азациитидином.

Заключение. Использование ставудина в комбинации с деметилирующими препаратами 5-азациитидин и децитабин приводит к статистически значимому уменьшению повреждений ДНК в клетках ТНР1 за счет снижения экспрессии LINE1.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-75-10163).

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ БОРА В КАЧЕСТВЕ СЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ПРОТОННОЙ ТЕРАПИИ: НАСТОЯЩЕЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Т.А. Штам, А.В. Гарина, В.С. Бурдаков, Л.А. Гараева,
А.В. Волницкий, Н.А. Верлов, Д.А. Амерканов, Ф.А. Пак,
Д.В. Лебедев, А.Л. Коневега

ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»,
Гатчина
e-mail: Shtam_TA@pnpi.nrcki.ru

Ключевые слова: протонная терапия, бор-протон-захватная терапия

Введение. Протонная терапия — самая современная форма радиотерапии, которая с высокой точностью воздействует на опухоль, в то же время практически не задевая окружающие здоровые ткани. Протоны быстро теряют энергию в течение последних нескольких миллиметров проникновения в ткани, что приводит к резко локализованному пику поглощенной дозы, называемому пиком Брэгга. Данное свойство протонного пучка используется для облучения труднодоступных для хирургического вмешательства опухолей. Значительно увеличить эффективность ЛТ может применение бинарных технологий, при которых поражающий эффект протонного излучения дополнительно усиливается предварительным накоплением радиосенсибилизатора в ткани-мишени. Некоторые препараты, содержащие ^{10}B , используются в бор-нейтронзахватной терапии. Было предложено использовать аналогичные препараты в протонной терапии за счет реакции захвата протонов на изотопе ^{11}B с образованием 3 α -частиц для увеличения поглощенной дозы в опухолевой мишени. Содержание изотопа бора-11 в природной изотопной смеси составляет примерно 80 %, что позволяет использовать препараты, содержащие природный бор, избегая этапа изотопного обогащения.

Цель исследования — выявление сенсибилизирующего потенциала соединений ^{11}B ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$; $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) при облучении протонами на пике Брэгга культивируемых злокачественных клеток.

Материалы и методы. Опухолевые клетки предварительно инкубировали с соединением ^{11}B и облучали

градуированными дозами 2–6 Гр протонами на пике Брэгга на синхротронном циклотроне СЦ-1000 (энергия 200 МэВ) НИЦ КИ ПИЯФ. Для экспериментальной проверки вклада ядерной реакции в увеличение чувствительности злокачественных клеток к облучению протонами клеточные культуры также облучались гамма-лучами дозами 2–6 Гр с использованием ^{60}Co источника γ -лучей «Исследователь». Чувствительность к излучению определяли с помощью MTS-теста и анализа колоний.

Результаты. Для тетрабората натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) показана радиосенсибилизирующая активность, однако коррелирующая с биологическими эффектом, оказываемым препаратом, и, по всей вероятности, связанным с наблюдаемым влиянием тетрабората натрия на распределение клеток по фазам клеточного цикла. Для боркаптата натрия ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) наблюдалось отсутствие радиосенсибилизирующего эффекта при облучении протонами на пике Брэгга.

Заключение. Полученные данные находятся в согласии с расчетами, показывающими недостаточную эффективность захвата протонов ядрами ^{11}B по механизму ядерной реакции для объяснения возможных радиосенсибилизирующих эффектов ^{11}B при облучении злокачественных клеток человека протонами на пике Брэгга. Таким образом, перспективы использования бор-протонзахватной терапии в клинической практике требуют дальнейших исследований для установления применимости метода.

Работа выполнена в рамках госзадания (№ 121060200127-6).

СВОЙСТВА 20-ГИДРОКСИЭКДИЗОНА (ЭКДИСТЕРОНА) В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗИСА

О.Ю. Шувалов, Ю.Н. Кирдеева, Е.А. Фефилова,
Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург
e-mail: oleg8988@mail.ru

Ключевые слова: 20-гидроксиэкдизон, аденокарцинома легкого, энергетический метаболизм, активные формы кислорода

Введение. У человека гормон насекомых 20-гидроксиэкдизон (экдистерон) проявляет ряд полезных фармакологических свойств, среди которых антиоксидантные, гипогликемические, гепато-, кардио- и нейропротективные. Среди спортсменов экдистерон хорошо известен благодаря своей анаболической активности, вследствие которой он широко используется для повышения физической формы. Кроме того, в ряде недавних исследований показана его противоопухолевая активность. При этом на сегодняшний день нет четкого понимания ни механизмов, ни молекулярных эффектов от его воздействия на различные типы клеток, в том числе на злокачественные.

Цель исследования — оценить влияние эктистерона на пролиферацию, продукцию АФК, интенсивность энергетического метаболизма и аутофагию в клетках человека и мыши различного генезиса (миобласты, фибробласты, клетки карциномы легкого).

Материалы и методы. Мы провели сравнение индуцированных эктистероном дозозависимых биологических эффектов в миобластах мыши (C2C12) и крысы (L8), эмбриональных фибробластах мыши (MEF), дермальных фибробластах человека (DF2) и клеточных линиях немелкоклеточной аденокарциномы легкого (H460, H1299 и A549). Нами изучено влияние эктистерона на их пролиферацию, клеточный цикл, уровень АФК, энергетический метаболизм (интенсивность гликолиза и дыхания), интенсивность биосинтеза белка, а также аутофагию.

Результаты. Эктистерон несколько снижал пролиферацию всех типов клеток. Он значительно ингибировал гликолиз и дыхание и индуцировал аутофагию. На молекулярном уровне эктистерон сильно подавлял экспрессию онкогена *c-Myc* и некоторых гликолитических ферментов, которые являются его транскрипционными мишенями. Эктистерон также снижал интенсивность биосинтеза белка. Помимо этого, эктистерон заметно увеличивал продукцию АФК в опухолевых клеточных моделях, но при этом снижал ее в нормальных клетках.

Заключение. Эктистерон подавляет энергетический метаболизм и индуцирует продукцию АФК в клеточных моделях аденокарциномы легкого. Благодаря низкой токсичности и множеству ценных фармакологических свойств эктистерон может рассматриваться исследователями в качестве потенциального адьюванта, который может помочь онкологическим больным преодолеть последствия ХТ, а также сделать ее более эффективной.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-75-10138).

ИЗУЧЕНИЕ НАТИВНОЙ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ИММУННЫХ КЛЕТОК В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МАРКЕРА РЕАКТИВНОСТИ ПРОТИВ ОПУХОЛИ МЕТОДОМ ВРЕМЯРАЗРЕШЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Д.В. Южакова¹, А.В. Изосимова^{1,2}, А.М. Можеров¹,
Е.В. Загайнова¹

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

²ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского»

(Университет Лобачевского), Нижний Новгород
e-mail: yuzhakova-diana@mail.ru

Ключевые слова: противоопухолевый иммунитет, флуоресцентный времяразрешенный имиджинг, метаболизм

Введение. Оценка реактивности Т-лимфоцитов против опухоли крайне важна для диагностики заболевания и мониторинга эффективности проводимой терапии. Для полноценной характеристики Т-клеток необходимы новые методы, не требующие деструкции тканей и экзогенного мечения. Инновационной платформой для оценки функционального статуса клетки является флуоресцентный времяразрешенный имиджинг (FLIM) метаболических коферментов. Метод основан на том, что время жизни флуоресценции высокочувствительно к локальным характеристикам микроокружения флуорофоров, указывает на их конформацию и внутриклеточную локализацию. Метаболический имиджинг иммунных клеток — совсем недавнее направление, и работы по визуализации нативной автофлуоресценции свежееизвлеченных иммунных клеток пока отсутствуют.

Цель исследования — изучить нативную автофлуоресценцию иммунных клеток в качестве потенциального маркера реактивности против опухоли методом FLIM.

Материалы и методы. Исследования проводили на мышах линии C57Bl/6 FoxP3-EGFP с подкожно привитой меланомой B16F0 вблизи пахового лимфатического узла. Визуализацию свежих срезов лимфатического узла осуществляли на конфокальном микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM-приставкой TCSPC (Becker & Hickl, Германия) в канале кофермента НАД(Ф)Н (ex. 375 нм, em. 435–485 нм). Верификацию активированного состояния Т-клеток проводили методом проточной цитометрии с помощью сортера FACSAria III.

Результаты. Впервые разработана методика визуализации иммунных клеток, позволяющая регистрировать нативную автофлуоресценцию метаболического кофермента НАД(Ф)Н в срезах свежееизвлеченных лимфатических узлов.

Методом FLIM в канале НАД(Ф)Н продемонстрировано увеличение процентного вклада короткой (свободной) компоненты НАД(Ф)Н (a1) при развитии опухоли (76,6 % vs 69,4 % у здоровых мышей), что может быть ассоциировано со сдвигом в сторону гликолитического метаболизма для обеспечения повышенных потребностей антиген-активированных Т-клеток.

Кроме того, отмечено значимое удлинение времен жизни свободной (t1) (0,56 нс vs 0,45 нс) и связанной (t2) (3,24 vs 2,35) компонент под влиянием опухоли. Это может быть обусловлено рядом причин, включая связывание НАДН с лактатдегидрогеназой и усиление пентозофосфатного пути для обеспечения высокой пролиферативной активности.

Данные FLIM коррелируют с результатами проточной цитометрии, подтверждающей повышение уровня экспрессии маркера активации CD25⁺ и пролиферации Ki-67.

Заключение. Нативная автофлуоресценция иммунных клеток в канале НАД(Ф)Н отражает активацию

Т-клеток и может служить надежным маркером иммунного ответа на опухоль. В перспективе исследования будут направлены на оценку автофлуоресценции в качестве показателя эффективности иммунотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 21-74-00101).

НОВАЯ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ 3D-МОДЕЛЬ ГЛИОМЫ С ИММУННЫМ МИКРООКРУЖЕНИЕМ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ИММУНОТЕРАПИИ

Д.В. Южакова¹, Д.А. Сачкова^{1,2}, А.В. Изосимова^{1,2},
К.С. Яшин¹, Е.В. Загайнова²

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

²ФГАОУ ВО «ННГУ им. Н.И. Лобачевского»

(Университет Лобачевского), Нижний Новгород

e-mail: yuzhakova-diana@mail.ru

Ключевые слова: глиома, 3D-модель, иммунотерапия

Введение. Основной проблемой в области иммунотерапии злокачественных астроцитов являются недостаточные знания о индивидуальных особенностях иммунных механизмов для каждого конкретного случая. Для успешного применения иммунотерапевтических подходов, таких как чек-пойнт ингибиторы, в отношении глиальных опухолей требуется внедрение персонализированного подхода.

Цель исследования — разработка новой пациент-специфической 3D-модели глиомы с иммунным микроокружением для исследования механизмов иммунотерапии.

Материалы и методы. Исследования проводили с использованием материала от пациентов с диагнозом глиомы Grade II–IV. Первичные глиальные культуры получали из послеоперационных фрагментов опухоли путем механической и/или ферментативной дезагрегации. Лимфоцитарную фракцию выделяли из образцов крови пациентов в градиенте плотности фиколла. Для микроскопической визуализации использовали инвертированный микроскоп Leica DM IL LED (Leica, Германия). Для анализа субпопуляционного состава и активационного профиля лимфоцитов использовали клеточный сортер BD FACSAria III.

Результаты. Создана библиотека первичных глиальных и лимфоцитарных культур пациентов. Впервые разработан оригинальный подход к созданию 3D-модели глиомы пациента с иммунным окружением. Данный подход включает оптимизированные методики экстракции опухолевых и иммунных клеток, технологию культивирования трехмерной опухолевой структуры (на основе сфероидов либо культивируемого фрагмента ткани), условия поддержания и наращивания иммунных клеток и схему сокультивирования их с опухолевой моделью. Для моделирования микроокружения, близкого к реальному, анализировали дополнительно

субпопуляционный состав опухолеинфильтрирующих лимфоцитов.

Получены предварительные данные о действии анти-CTLA-4-иммунотерапии на данной модели, демонстрирующие значительное увеличение уровня экспрессии CD25 в пуле CD4⁺-Т-клеток, а также небольшой рост процента CD25⁺CD8⁺-Т-клеток по сравнению с контролем без лечения.

Заключение. Разработана новая пациент-специфическая 3D-модель глиомы с лимфоцитарным микроокружением и показаны ее потенциальные возможности для исследования чек-пойнт иммунотерапии. В будущем планируется изучение влияния анти-CTLA4-и/или анти-PD1-иммунотерапии на иммунное микроокружение, в частности, на экспрессию активационных и супрессорных маркеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (№ МК-2092.2022.3).

ИНГИБИРОВАНИЕ CDK8/19 ПРЕДОТВРАЩАЕТ РАЗВИТИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИНГИБИТОРАМ CDK4/6 В ОПУХОЛЯХ РАЗЛИЧНОГО ГИСТОГЕНЕЗА

М.А. Ястребова¹, А.И. Хамидулина¹, З. Мак²,
И. Ронинсон², Е. Броуде², А.А. Штиль³, В.В. Татарский¹

¹ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

²Университет штата Южная Каролина, Колумбия, США;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва

e-mail: ritayastrebowa@genebiology.ru

Ключевые слова: CDK8/19, CDK4/6, палбоциклиб, резистентность

Введение. Ингибиторы протеинкиназ CDK4/6 используются для терапии эстрогенположительных (ЭР+) опухолей молочной железы. Однако устойчивость к таким препаратам ограничивает их долговременный эффект и дает лишь небольшой прирост к общей выживаемости. Протеинкиназы CDK8/19 регулируют транскрипцию, активируемую рядом транскрипционных факторов, и участвуют в образовании транскрипционной устойчивости к таргетным препаратам. Ранее было показано, что ингибиторы CDK8/19 могут предотвращать возникновение клеток, устойчивых, в частности, к тирозинкиназным ингибиторам.

Цель исследования — изучить совместное действие ингибиторов CDK4/6 (палбоциклиба, рибоциклиба) с ингибиторами CDK8/19 (SNX631, сенексин В).

Материалы и методы. Исследование проводили на клетках культур ЭР+ карциномы молочной железы MCF7, T47D, ZR-75-1, тройного негативного РМЖ MDA-MB-231, карцином предстательной железы PC3, яичника A2780 и толстой кишки SW620. В работе применяли оценки цитотоксичности, методы проточной цитофлуориметрии (анализ клеточного

цикла, CFSE), флуоресцентной микроскопии и иммуноблоттинга.

Результаты. Было показано усиление действия ингибиторов CDK4/6 с помощью ингибирования CDK8/19 для всех исследованных культур, кроме MDA-MB-231 и A2780. Эффект усиления действия ингибиторов CDK4/6 развивался со временем и приводил к полной элиминации опухолевых клеток при одновременном действии обоих ингибиторов при длительной обработке. Совместное ингибирование CDK4/6 и CDK8/19 приводило к снижению уровня циклинзависимых киназ, связанных с устойчивостью к палбоциклибу: CDK6 и CDK2, а также их белков-мишеней — E2F1 и Rb. Продолжительное культивирование с ингибиторами

CDK4/6 и CDK8/19 приводило к увеличению маркеров ДНК-повреждения, таких как γ H2AX и p53, и активации апоптоза.

Заключение. Ингибиторы CDK8/19 предотвращают устойчивость к ингибиторам CDK4/6 (палбоциклибу и рибоциклибу) в опухолях различного гистогенеза. Совместное ингибирование CDK4/6 и CDK8/19 снижает уровень белков, критических для устойчивости к палбоциклибу и другим ингибиторам CDK4/6. Предполагаемый механизм элиминации устойчивых клеток — индукция апоптоза в результате активации ответа на ДНК-повреждение.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 22-24-00990).