

СЕКЦИЯ V

БИОЛОГИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ

Доклады

Молекулярная характеристика инвазивных свойств дискретных опухолевых клеток при инвазивной карциноме неспецифического типа молочной железы

Н.В. Крахмаль^{1,2}, М.В. Завьялова¹⁻³, Е.В. Денисов^{2,3},
Л.А. Таширева¹, О.Е. Савельева¹, Е.В. Кайгородова¹,
В.М. Перельмутер¹

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

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

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

Введение. На основании совокупности морфологических и молекулярно-генетических параметров выделяют 2 варианта опухолевой инвазии: одиночными клетками (индивидуальную) и коллективную. При индивидуальной инвазии миграция злокачественных клеток может осуществляться посредством 2 механизмов: мезенхимального и амeboидного. Тип инвазии опухолевых клеток во многом определяется особенностями тканевого микроокружения и зависит от молекулярных изменений в самих опухолевых клетках. Определение механизма инвазии, который используют одиночно мигрирующие клетки, представляет сложную задачу.

Задачи исследования. Изучить молекулярные характеристики дискретных опухолевых клеток, связанные с инвазивными свойствами при неспецифической карциноме молочной железы, в целях определения типа индивидуальной опухолевой инвазии.

Материалы и методы. Выполняли морфологическое исследование операционного материала от 107 пациентов с раком молочной железы стадии T1–3N0–3M0 без неoadьювантной терапии. В исследование вклю-

чали только случаи с инвазивной карциномой неспецифического типа (Всемирная организация здравоохранения, 2012). В инфильтративном компоненте опухоли оценивали наличие дискретных опухолевых клеток. Для оценки инвазивных свойств одиночных опухолевых клеток использовали антитела к EGFR, FGFR1, интегринам $\beta 3$ и $\beta 1$, MMP2, MMP9, Rac1 (Abcam, Великобритания).

Результаты. В инфильтративном компоненте опухоли дискретные опухолевые клетки определялись в 91,6 % случаев. Оценка молекулярных характеристик одиночных клеток показала, что экспрессия маркера Rac1 в этих клетках отмечалась в 22 % случаев, положительная экспрессия интегринов $\beta 1$ и $\beta 3$ определялась в 14 и 65 % случаев соответственно. Экспрессия MMP2 была обнаружена в 76 % случаев, MMP9 – в 15 %. FGFR1 как маркер мезенхимального типа индивидуальной инвазии в дискретных опухолевых клетках экспрессировался в 50 %, при этом экспрессия EGFR – маркера, свойственного для клеток, перемещающихся посредством амeboидного типа движения, регистрировалась у 15 % больных.

Выводы. Исследование показало, что одиночные дискретные опухолевые клетки обладают выраженной функциональной гетерогенностью. Значительная часть из них характеризуется положительной экспрессией маркеров, связанных с мезенхимальным механизмом инвазии, а значит, имеет к нему потенции. Меньшая часть одиночных клеток опухоли не экспрессирует маркеры мезенхимального типа инвазии и, по-видимому, либо имеет потенции к индивидуальному амeboидному варианту движения, либо такие злокачественные клетки временно или постоянно лишены инвазивных свойств.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 16-15-10221).

Изучение участия лизин-метилтрансферазы белков Set 7/9 в процессах репарации ДНК в результате генотоксического стресса

Д. В. Кригер, Д. Г. Тентлер

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. В настоящее время все более очевидной становится роль посттрансляционных модификаций в регуляции активности белков. Такой путь позволяет клеткам скоординировать сигнальные пути во времени и пространстве. Нарушение функций метилтрансфераз приводит к серьезным изменениям в клетке, часто являющимися причиной опухолеобразования. В последнее время изучению лизин-метилтрансфераз уделяется большое внимание, особенно в контексте регуляции негистоновых белков. Первым примером регуляции функций белков с помощью метилирования стало обнаружение того, что в ответ на генотоксический стресс происходит метилирование транскрипционного фактора p53 с помощью Set 7/9. Важно отметить, что среди мишеней Set 7/9 обнаружены p53, E2F1 и NF-κB, которые играют первостепенную роль в процессах канцерогенеза, поскольку они вовлечены в регуляцию контроля клеточного цикла и репарации ДНК. Изменения, затрагивающие системы репарации ДНК, могут быть причиной, обеспечивающей резистентность многих опухолей к противораковой терапии.

Задачи исследования. С помощью флуоресцентной микроскопии определить чувствительность клеточных линий H1299 и U2OS к повреждению ДНК в результате генотоксического стресса. Оценить влияние подавления экспрессии Set 7/9 на чувствительность клеток к повреждению ДНК.

Материалы и методы. Выполняли культивирование клеток, SDS-электрофорез, вестерн-блотт-гибридизацию, иммуноокрашивание клеточных препаратов. Проводили анализ фокусов репарации и статистический анализ.

Результаты. Проанализированы линии немелкоклеточного рака легкого H1299 (p53-негативные) и остеосаркомы U2OS (p53-позитивные). Для подавления Set 7/9 эти линии экспрессировали siRNA-SET 7/9. В качестве группы контроля выступали клетки, экспрессирующие неспецифичную siRNA. Обе клеточные линии были обработаны доксорубицином в концентрации 0,5 мкМ в течение 12 и 24 ч. После этого проводили оценку степени повреждения ДНК с помощью окрашивания фокусов gamma-H2AX. Выявлено, что в клетках с подавлением Set 7/9 в первые 12 ч интенсивность фокусов была выше по сравнению с клетками контрольной группы. Кроме этого, количество выживших клеток со сниженной экспрессией Set 7/9

было в 3 раза меньше по сравнению с группой контроля. Как и в случае с клетками линии H1299, в клетках линии U2OS со сниженной экспрессией Set 7/9 фокусов оказалась выше.

Выводы. Лизин-метилтрансфераза Set 7/9 участвует в процессе инициации распознавания двуцепочечных разрывов ДНК, что подтверждает значение Set 7/9 в регуляции репарации ДНК. Регуляция ответа клетки на повреждение ДНК с помощью Set 7/9 не зависит от статуса p53 в клетке.

Регуляторные паттерны поляризации моноцитов периферической крови у здоровых лиц и у больных раком молочной железы

М. Н. Стахеева¹, А. А. Андреева¹, Н. В. Чердынцева^{1,2},
Е. М. Слонимская^{1,3}

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

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

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

Введение. Появление, развитие и диссеминация злокачественной опухоли во многом зависят от микроокружения органа первичной локализации и органа метастазирования. Важным элементом тканевого микроокружения являются воспалительные макрофаги, происходящие из моноцитов периферической крови (ПК). Свойства моноцитов ПК, прежде всего M1/M2-поляризованность, вероятно, могут влиять на формирование популяции макрофагов в опухоли. В свою очередь, популяционная структура моноцитов ПК определяется уровнем циркулирующих индукторов поляризации M1- и M2-интерферона γ (ИФН-γ) и интерлейкина 4 (ИЛ-4) соответственно, а также чувствительностью к их воздействию, связанной с наличием соответствующих рецепторов.

Задачи исследования. Сравнение M1- и M2-структур моноцитов ПК и паттернов их регуляции ИФН-γ и ИЛ-4 у больных раком молочной железы (РМЖ) и у здоровых лиц.

Материалы и методы. В исследование включены 10 пациенток с впервые диагностированным инвазивным РМЖ и 6 здоровых женщин. В периферической крови методом проточной цитофлуориметрии были определены M1-(CD68⁺), M2-(CD163⁺) моноциты, а также моноциты, экспрессирующие рецепторы к ИФН-γ (CD119⁺) и ИЛ-4 (CD124⁺). Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови был оценен уровень ИФН-γ и ИЛ-4.

Результаты. В проведенном исследовании содержание провоспалительных M1-(CD68⁺) моноцитов и моноцитов, экспрессирующих рецептор к ИФН-γ –

индуктору M1-поляризации — не имело статистически значимых различий у здоровых лиц и у больных РМЖ. Однако количество противовоспалительных M2-(CD163⁺) моноцитов и моноцитов, экспрессирующих рецептор к индуктору M2-поляризации ИЛ-4, в ПК у больных РМЖ было ниже в 22 и 8 раз по сравнению с соответствующими показателями у здоровых лиц ($p < 0,05$). При этом концентрация ИФН- γ у больных РМЖ была в 7 раз выше, чем у здоровых лиц ($p < 0,05$), в то время как содержание ИЛ-4 не имело различий. У больных РМЖ отсутствовали характерные для здоровых лиц обратные корреляционные связи между уровнем ИЛ-4 и M1-(CD68⁺) моноцитами, а также между ИФН- γ и M2-(CD163⁺) моноцитами, что предполагает наличие других регуляторных паттернов.

Выводы. В отличие от здоровых лиц у больных РМЖ в ПК снижен уровень M2-моноцитов и моноцитов, чувствительных к действию M2-индуктора ИЛ-4. Для больных РМЖ характерна утрата обратных регуляторных взаимосвязей между цитокинами-индукторами M1-/M2-поляризации и M1-/M2-популяциями.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-54-76015/16).

Ассоциация экспрессии IGFBP-6 с метаболическим синдромом, IGF-IR и рецепторами адипонектина у больных колоректальным раком

Н.В. Юнусова, Л.В. Спирина, И.В. Кондакова,
С.Г. Афанасьев, А.Е. Фролова

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Роль белков системы инсулиноподобных факторов роста (IGFs) значима в таких сложных процессах, как опухолевая инвазия и метастазирование. Белок, связывающий инсулиноподобные факторы роста 6 (IGFBP-6), позиционируется как уникальный белок среди других IGFBPs, имеющий в 20–100 раз более высокую аффинность к IGF-2, чем к IGF-1. Кроме этого, у этого белка выявлены IGFs-независимые эффекты.

Задачи исследования. Изучение экспрессии IGFBP-6 в ткани колоректального рака и анализ во взаимосвязи с основными клинико-морфологическими параметрами, уровнем рецептора инсулиноподобного фактора роста (IGF-IR) и рецепторами адипонектина (AdipoR1, AdipoR2) для понимания его вовлеченности в канцерогенез данных опухолей, а также для выявления возможных взаимосвязей с адипонектин-опосредованным сигналингом.

Материалы и методы. Уровень экспрессии матричной РНК (мРНК) IGFBP-6 и уровень белковой экспрессии были проанализированы методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и вестерн-блоттингом у 56 больных колоректальным раком. ELISA и проточную цитофлуориметрию использовали для оценки AdipoR1, AdipoR2 и IGF-IR в ткани опухоли.

Результаты. Выявлено, что уровень мРНК IGFBP-6 и белковая экспрессия были выше у больных колоректальным раком на фоне метаболического синдрома по сравнению с больными без метаболических нарушений. Обнаружена зависимость экспрессии IGFBP-6 от степени поражения лимфатических узлов. Были выявлены положительные корреляции между экспрессией IGFBP-6 и AdipoR1, а также между экспрессией IGFBP-6 и AdipoR2 и экспрессией IGF-IR и AdipoR1. Данные корреляционного анализа подтверждены данными нелинейного регрессионного анализа.

Выводы. Уровень мРНК IGFBP-6 и уровень белковой экспрессии IGFBP-6 в колоректальных карциномах ассоциировались с наличием метаболического синдрома, а уровень белка, кроме того, — с лимфогенным метастазированием. Выявленные связи свидетельствуют о перекресте IGF-IR-опосредованного и адипонектин-опосредованного сигнальных путей в колоректальных карциномах. IGFBP-6 у больных колоректальным раком можно рассматривать в качестве маркера, ассоциированного с метаболическим синдромом. Необходимы дополнительные исследования для выяснения механизмов вовлеченности IGFBP-6 в патогенез колоректального рака, включая выяснение ассоциаций форм IGF-IR (фосфорилированной, нефосфорилированной и ассоциированной с рецептором адипонектина) с лимфогенным метастазированием при колоректальных карциномах для поиска перспективных молекулярных мишеней для антиметастатической терапии карцином данного типа.

Постеры

Кластерный анализ экспрессионных профилей микроРНК при раке молочной железы

К.А. Гришина¹, Н.И. Поспехова², Т.А. Музаффарова¹,
В.А. Хайленко³, А.В. Карпунин¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва;

²ФГБУ «Государственный научный центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих» Минздрава России, Москва;

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

Введение. МикроРНК относятся к классу коротких (18–25 нуклеотидов) не кодирующих белок РНК и принимают участие в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов путем деградации мишеней матричной РНК или нарушения трансляции. Исследование микроРНК имеет значение для понимания регуляции действия генов при злокачественных опухолях и может служить источником новых прогностических и предиктивных маркеров.

Задачи исследования. Исследование характеристик экспрессии микроРНК в опухолях при раке молочной железы (РМЖ) и анализ возможностей их использования в качестве маркеров.

Материалы и методы. Исследованы 56 образцов опухолевых и гистологически нормальных тканей при РМЖ. Суммарную РНК выделяли из образцов с помощью набора RNeasy Mini Kit, Qiagen. Обратную транскрипцию проводили, используя набор ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, США). Уровень экспрессии 16 микроРНК измеряли с помощью прибора StepOnePlus (Applied Biosystems, США). Учитывали более чем двукратное изменение уровня экспрессии.

Результаты. В экспериментальной работе проанализирована экспрессия набора микроРНК у больных РМЖ. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени определена экспрессия следующих микроРНК: miR-29a, -31, -34a, -155, -192, -335, -141, -195, -125b, -145, -182, -146a, -10b, -21, -221, -222. При кластерном анализе результатов найдены образования 3 кластеров коэкспрессии микроРНК. В 1-м кластере отмечается обогащение больными с инфильтративной протоковой формой РМЖ с метастазами. Анализ показал, что накопление больных с метастазами в этом кластере по отношению к другим кластерам близко к статистически значимому ($p = 0,07$; отношение шансов 5; 95 % доверительный интервал 0,9–32,0). Изучены различия в экспрессии микроРНК в разных кластерах. В отличие от 2-го и 3-го, 1-й кластер, обогащенный больными с метастатическим РМЖ, показывает дифференциальную гиперэкспрессию микроРНК

miR-29a, -192, -335, -141. Проанализирована ассоциация этих микроРНК со случаями метастазов. Во 2-м кластере выявлен высокий уровень экспрессии miR-125b, -145, -182, а в 3-ем — низкая экспрессия miR-221 и -222.

Выводы. Показана ассоциация некоторых микроРНК в 1-м кластере с метастазированием РМЖ.

Экспрессия эктонуклеотидазы CD39 CD4⁺-Т-клетками больных колоректальным раком

Г.А. Жулай¹, А.В. Чуров¹, Е.К. Олейник¹, А.А. Романов²,
П.Н. Кравченко¹, В.М. Олейник¹

¹ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра РАН», Петрозаводск;

²ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», Петрозаводск

Введение. Современные исследования признают важность качественного и количественного популяционного состава лимфоцитов у онкологических больных, особенно у больных колоректальным раком (КРР). В последнее время подчеркивается значимость при канцерогенезе эктонуклеозидтрифосфат дифосфогидролазы-1 (CD39). CD39 участвует в генерации внеклеточного аденозина, оказывающего иммуносупрессорное действие через A2A-рецепторы и способствующего развитию опухоли.

Задачи исследования. Оценка уровня экспрессии CD39 CD4⁺ Т-клетками больных КРР.

Материалы и методы. Обследованы 42 больных КРР и 30 здоровых доноров. Проведен анализ фенотипов клеток периферической крови, а также опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), выделенных из клинических образцов опухолевой ткани. Анализ проводили до начала терапии. Экспрессию CD3, CD4, CD25, CD127, FOXP3, CD39 оценивали методом точной цитометрии. Достоверность различий между группами рассчитывали с помощью критерия Манна — Уитни при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. Накопление периферических CD4⁺CD39⁺-Т-клеток наблюдалось на поздних (III–IV) стадиях КРР. Среди ОИЛ количество этих клеток было в 4 раза выше ($p < 0,05$), чем в крови тех же больных. Увеличение числа CD39⁺-клеток среди ОИЛ отмечалось и в популяции CD3⁺CD4⁺ Т-клеток. При этом доля CD4⁺CD39⁺-клеток была выше в опухолевой ткани.

Важную роль при канцерогенезе играет субпопуляция регуляторных CD4⁺-Т-клеток (Treg). В крови больных КРР при анализе CD4⁺CD25⁺CD127lo/- Tregs наблюдали усиление уровня экспрессии молекулы CD39.

Экспрессия CD39 у Treg-клеток увеличивается уже на начальных (I–II) этапах развития опухоли ($55,24 \pm 4,20$ %) по сравнению с группой контроля ($41,16 \pm 3,10$ %; $p < 0,05$) и достигает максимальных значений у больных с более поздними стадиями КРР ($67,95 \pm 3,10$ %; с контролем $p < 0,001$, с I–II стадиями $p < 0,05$), тогда как клетки с фенотипом, не характерным для Treg, CD4⁺CD25⁻ и CD4⁺CD25⁺-T-клетки, не отличались такой закономерностью. Кроме того, у больных КРР обнаружена положительная корреляция экспрессии CD39 с транскрипционным фактором FOXP3 на CD4⁺-T-клетках ($r = 0,47$; $p < 0,006$). Среди ОИЛ CD4⁺CD25hi Treg-клетки также отличались от периферических более высокой экспрессией эктонуклеотидазы CD39. Повышенная экспрессия этой молекулы наблюдалась и у нерегуляторных клеток с фенотипами CD4⁺CD25⁻ и CD4⁺CD25⁺.

Выводы. Таким образом, развитие опухоли у больных КРР сопровождается усилением экспрессии CD39 CD4⁺-T-клетками, что может быть связано с увеличением числа Treg-клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-34-00970, бюджетная тема № 0221-2014-0011).

Взаимосвязь плотности сосудов опухолевой ткани рака молочной железы с уровнем различных популяций циркулирующих опухолевых клеток в крови больных до биопсии

Е.В. Кайгородова¹⁻³, В.М. Перельмутер¹,
Н.А. Тарабановская¹, Е.В. Денисов¹, О.Е. Савельева^{1,2},
Л.А. Таширева^{1,2}

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

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

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

Введение. Оценка и характеристика циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) стали одним из основных направлений трансляционных исследований рака.

Задачи исследования. Оценка взаимосвязи плотности сосудов опухолевой ткани рака молочной железы (РМЖ) с уровнем различных популяций ЦОК в крови больных до биопсии.

Материалы и методы. Материалом для исследования служила венозная гепаринизированная кровь, взятая до биопсии, и парафиновые блоки опухолевой ткани РМЖ. В проспективное исследование включены 22 больных с впервые диагностированным инвазивным РМЖ в возрасте 18–50 лет, с объемом опухоли от 2,0 см,

стадией T2–4N0–3M0, поступившие на лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ. На основе молекулярной панели маркеров к EpCam, CD45, CD44, CD24 и N-cadherin определяли ЦОК с признаком стволовости и EMT (epithelial-mesenchymal transition). Уровень ЦОК (клеток/мл) оценивали методом проточной лазерной цитометрии на аппарате BD FACSCanto (США) с помощью программного обеспечения BD FACSDiva и меченных моноклональных антител к CD45 клон F10-89-4 (PE/Cy7) (Abcam, Великобритания), CD44 клон [IM7] (FITC) (Abcam, Великобритания), CD24 клон [SN3] (Phycoerythrin) (Abcam, Великобритания), EpCAM клон [VU-1D9] (PerCP/Cy5.5) (Abcam, Великобритания) и CD325 (N-Cadherin) (клон 8C11, APC) (Biolegend, США). Плотность сосудов оценивали микроскопически на 1 мм² опухолевой ткани с помощью светового микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты. В результате проспективного исследования больных РМЖ была выявлена прямая положительная корреляционная связь количества ЦОК с признаками EMT без признаков стволовости (EpCam⁺CD45⁻CD44⁻CD24⁻N-cadherin⁺) в крови до биопсии и плотностью сосудов опухолевой ткани (коэффициент Спирмена 0,962; p (2-сторон.) = 0,038; $n = 7$). Уровень ЦОК с признаком стволовости и EMT с фенотипом EpCam⁻CD45⁻CD44⁺CD24⁻N-cadherin⁻ также имел положительную корреляционную связь с количеством сосудов в опухолевой ткани (коэффициент Спирмена 0,786; p (2-сторон.) = 0,036; $n = 7$).

Выводы. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень разных субпопуляций ЦОК в крови больных до биопсии связан с количеством сосудов в опухолевой ткани. Полученные результаты интересны с точки зрения изучения механизмов рекрутирования опухолевых клеток из первичной опухоли, их интравазации и появления ЦОК при РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-34-20864).

Участие белка YB-1 и системы факторов VEGF–VEGFR в формировании множественной лекарственной устойчивости

Т.С. Ковшова¹, Н.И. Моисеева²

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

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

Введение. Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) является одним из основных препятствий на пути успешного лечения больных со злокачественными новообразованиями. Один из возможных регуляторов МЛУ – многофункциональный белок YB-1. Недавно было показано, что после воздействия VEGF-A

может активироваться МЛУ через транслокацию белка YB-1, действующего как фактор транскрипции для MDR1. Однако исследования взаимосвязи системы ABC-транспортеров, отвечающей за МЛУ белка YB-1 и VEGF-зависимых сигнальных систем ведутся недавно и только 2–3 коллективами авторов.

Задачи исследования. Исследовать изменение уровня экспрессии матричной РНК (мРНК) гена *YB-1*, локализацию белка YB-1, генов семейства ABC-транспортеров и системы VEGF – VEGFR в парах чувствительных и устойчивых опухолевых клеток. Оценить влияние подавления экспрессии гена *YB-1* на экспрессию генов ABC-транспортеров и генов системы VEGF – VEGFR.

Материалы и методы. Были исследованы культуры клеток MCF-7 и HBL-100 (рак молочной железы), KB3-1 (рак полости рта), а также их устойчивые варианты MCF-7/DOX5, HBL-100/DOX85, HBL-100/DOX400 и KB8-5. Выполняли МТТ-тест, полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени, иммуноцитохимическое и цитофлуоретрическое исследования.

Результаты. Все полученные субклинии клеток демонстрировали МЛУ, т. е. были резистентны не только к доксорубину, но и к паклитакселу, винбластину и цисплатину (к последнему только MCF-7/DOX5). Уровень экспрессии мРНК MDR1 значительно увеличивался во всех резистентных субклинах ($p < 0,01$), тогда как экспрессия других ABC-транспортеров не внесла существенный вклад в возникновение МЛУ. Уровень экспрессии мРНК гена *YB-1* практически не отличается от родительских вариантов. Ядерная локализация YB-1 обнаруживается в 100 % клеток KB8-5, в 15 % клеток MCF-7/DOX, тогда как в HBL-100/DOX белок YB-1 локализован в цитоплазме клеток. Для всех устойчивых вариантов клеток характерно достоверное увеличение экспрессии VEGF-C ($p < 0,05$), при этом экспрессия VEGFR3 снижается в линиях РМЖ и увеличивается в линии KB3-1. Подавление экспрессии мРНК *YB-1* в линии HBL-100/DOX85 привело к снижению экспрессии MDR1 в 1,3 раза, VEGF-C – в 1,7 раза, а VEGFR3 – в 2 раза.

Выводы. Изначальная гипотеза об активации экспрессии мРНК *YB-1* в устойчивых опухолевых клетках не подтвердилась, хотя его локализация изменилась в 2 из 3 исследованных пар. Экспрессия мРНК VEGF-C значимо изменилась во всех устойчивых культурах по сравнению с родительскими линиями. Подавление экспрессии мРНК *YB-1* приводит к небольшому снижению экспрессии VEGF-C и VEGFR3, и связь этих систем также требует дальнейшего изучения.

Особенности патогенеза и развития локрегионарных рецидивов базально-клеточной карциномы в шейно-лицевом отделе

Е. В. Моисеенко-Голубович, А. Б. Иванова,
В. В. Грома, Р. Э. Карл

Рижский университет им. П. Страдина, Рига

Введение. Базально-клеточная карцинома (БКК) кожи является одной из самых актуальных проблем современной онкологии. Ее диагностируют в 80 % случаев из всех немеланоцитарных опухолей кожного покрова с преимущественной локализацией в шейно-лицевом отделе 1. В последние годы частота данного заболевания во многих странах постоянно увеличивается, и, несмотря на разнообразность методов лечения, БКК рецидивирует в 20–40 % случаев.

Задачи исследования. Изучение особенностей патогенеза и рецидивирования БКК в шейно-лицевом отделе, анализируя дерматоскопически и морфологически опухолевые и пограничные ткани.

Результаты. Было установлено, что инфильтративный тип БКК характеризуется наибольшей плотностью арборизированных сосудов по сравнению с поверхностным мультицентрическим и нодулярным типами. Кроме этого, при изучении степени инвазии БКК гистологически в случаях агрессивной опухоли наблюдалось значительно снижение экспрессии ламинина и коллагена IV типа в базальной мембране. Снижение уровня коллагена IV типа в комбинации с повышенной экспрессией металлопротеиназ (ММР2, ММР9), возможно, характеризует метастатический потенциал БКК.

Выводы. Выявление взаимосвязи между склонными к рецидивированию типами опухоли и их гистологическими особенностями позволит наиболее эффективно применять возможности терапии и снизить риск развития рецидивов в будущем.

Возможность использования двойной иммуофлуоресценции для оценки экспрессии маркеров эпителиально- мезенхимального перехода, опухолевых стволовых клеток и подтипов рецепторов эстрогенов

М. В. Пучинская

*УО «Белорусский государственный медицинский
университет», Минск*

Введение. Флуоресцентная микроскопия является перспективным современным методом морфологиче-

ских исследований, одним из преимуществ которого считается возможность одновременного выявления в тканях нескольких маркеров при использовании антител, меченых различными флуорохромами (двойная иммунофлуоресценция, 2ИФ). Это оказывается необходимым для оценки эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) (выявление коэкспрессии клеткой эпителиальных и мезенхимальных маркеров), опухолевых стволовых клеток (ОСК) (коэкспрессия нескольких маркеров позволяет с большей вероятностью говорить о наличии у клетки свойств ОСК), а также коэкспрессии различных подтипов рецепторов, например, рецепторов эстрогенов (РЭ) α и β (обладают различными эффектами на клетки).

Задачи исследования. Оценка возможности использования 2ИФ для одновременного выявления 2 маркеров ЭМП, ОСК или подтипов РЭ в раке.

Материалы и методы. Исследование проведено на формалин-фиксированной ткани рака предстательной железы (РПЖ) и рака эндометрия, полученных при радикальных операциях, с использованием первичных антител к E- и N-кадгеринам, маркерам ОСК CD44 и CD133, РЭ α и РЭ β и вторичных козых антикродичных и антимышиных антител, меченых флуорохромами AlexaFluor 488 и 594. Окрашивание оценивали на микроскопе Zeiss AxioImager A2 с использованием соответствующих светофильтров.

Результаты. При исследовании маркеров ЭМП отмечена коэкспрессия E- и N-кадгеринов на мембранах отдельных клеток РПЖ, что является признаком ЭМП в них. Также в клетках РПЖ наблюдали мембранную экспрессию CD44, преимущественно на базолатеральных мембранах. Экспрессия CD133 в изученных на данный момент образцах РПЖ не отмечена, что, вероятно, свидетельствует о редкости его экспрессии в РПЖ, так как в положительном контроле (рак эндометрия) при отработке методики выявлялось специфичное окрашивание апикальных мембран опухолевых клеток. Экспрессия РЭ оценена в раке эндометрия, где РЭ α обнаруживали преимущественно в строме, а РЭ β — в ядрах опухолевых клеток. Их коэкспрессия в одной клетке, поиск которой был целью 2ИФ, в изученных на данный момент образцах не выявлена, впоследствии ее поиск будет продолжен в РПЖ.

Выводы. В данной пилотной работе показана принципиальная возможность применения 2ИФ для одновременной визуализации в опухоли 2 маркеров биологических процессов, что позволит выявлять их с большей достоверностью, чем при оценке каждого маркера на отдельном стекле, и сравнивать биологические особенности опухолей с их клинико-морфологическими характеристиками, прогнозом и ответом на терапию.

Первый опыт применения двойной иммунофлуоресценции для оценки эпителиально-мезенхимального перехода в раке предстательной железы

М.В. Пучинская

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск

Введение. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) в настоящее время считается одним из механизмов приобретения опухолевой клеткой прометастатического потенциала. Основным его признаком является одновременная экспрессия клетками эпителиальных и мезенхимальных маркеров, например, E- и N-кадгерина (так называемое «переключение кадгеринов»). Для выявления этого феномена возможно использование метода двойной иммунофлуоресценции (2ИФ), позволяющего визуализировать одновременно 2 маркера с использованием различных флуорохромов.

Задачи исследования. Описать первый опыт применения 2ИФ для выявления ЭМП в клетках рака предстательной железы (РПЖ) на основе коэкспрессии E- и N-кадгеринов.

Материалы и методы. Оценена экспрессия E-кадгерина (первичные моноклональные мышинные антитела, BioGenex) и N-кадгерина (поликлональные кроличьи антитела, ThermoScientific) в образцах РПЖ, полученных при радикальной простатэктомии, с использованием вторичных козых антител, меченых флуорохромами AlexaFluor 488 и 594 (Molecular Probes). Оценка окрашивания произведена на микроскопе Zeiss AxioImager A2.

Результаты. Экспрессию обоих типов кадгеринов отмечали преимущественно на мембранах эпителиальных клеток в виде гомогенного мембранного окрашивания. При этом экспрессия E-кадгерина в раке была снижена в различной степени по сравнению с неопухолевым эпителием. Экспрессию N-кадгерина отмечали преимущественно в раковых клетках, однако в некоторых клетках доброкачественных желез также отмечалось окрашивание. В ряде клеток наблюдали также цитоплазматическую экспрессию маркера. Отмечали наличие большого числа раковых клеток, коэкспрессирующих оба типа кадгеринов, что выражалось в желтом свечении мембран в результате сочетания красной и зеленой флуоресценции отдельных меток. Степень повышения экспрессии E-кадгерина и снижения экспрессии N-кадгерина в разных клетках была различной, однако на данном этапе работы их количественную оценку не проводили. В дальнейшем планируется разработка алгоритма компьютерного анализа микропрепаратов для объективизации оценки степени изменения экспрессии отдельных кадгеринов.

Также на большем объеме материала планируется оценить связь коэкспрессии кадгеринов и наличия феномена ЭМП со стандартными клинико-морфологическими характеристиками опухоли.

Выводы. В отдельных клетках РПЖ отмечается коэкспрессия эпителиального маркера E-кадгерина и мезенхимального маркера N-кадгерина, что можно считать признаком нахождения этих клеток в состоянии ЭМП. 2ИФ является подходящим методом выявления подобных изменений в клетках.

Повышенная лекарственная устойчивость раковых стволовых клеток в условиях гипоксии

Е.Н. Толкунова¹, М.А. Иванова², С.А. Кошкин¹

¹ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;
²биологический факультет ФУБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Введение. Рак толстой кишки занимает 4-е место в статистике онкологической заболеваемости, по данным Всемирной организации здравоохранения. Согласно концепции раковых стволовых клеток (РСК) в опухоли существует минорная популяция клеток, характеризующихся повышенной резистентностью к воздействию цитостатических агентов и способных формировать опухоли в отдаленных органах. Известно, что значимым фактором поддержания уникальных свойств РСК является гипоксия.

Задачи исследования. Изучение чувствительности РСК аденокарциномы толстой кишки человека к цитостатическому агенту 5-фторурацилу (5-ФУ) в условиях нормо- и гипоксии.

Материалы и методы. Для получения клеточных культур использовали опухолевый материал, получен-

ный в ходе хирургического лечения. Культивирование опухолевых клеток проводили в среде DMEM/F12 с 10 % FBS. Далее трансдуцировали клетки лентивирусной репортерной конструкцией SOREX6x и отбирали устойчивые клоны на среде, содержащей пуромицин. Анализировали экспрессию стволовых маркеров (Oct4, Sox2, Nanog) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Имитировали условия гипоксии добавлением в культуральную среду хлорида кобальта. После культивирования в течение 2 сут в среде, содержащей 5-ФУ в условиях нормо- и гипоксии, измеряли жизнеспособность клеток методом МТТ.

Результаты. Используя материал, полученный при резекции аденокарциномы толстой кишки человека, мы получили 2 первичные клеточные культуры. После введения репортерной конструкции мы отобрали клоны клеток, экспрессирующих эндогенные стволовые факторы. Была проанализирована лекарственная устойчивость к цитостатику 5-ФУ у отобранных клонов при нормальном культивировании и в условиях гипоксии. Оказалось, что все клоны линии БСК6 характеризовались повышенным уровнем резистентности к 5-ФУ, причем в условиях гипоксии резистентность возрастает. Лекарственная устойчивость клонов линии БСК1, обогащенных по экспрессии эндогенных стволовых факторов, однако, не отличалась от исходной.

Выводы. Использованная для обогащения стволового компонента клеточной популяции лентивирусная конструкция позволила провести селекцию клеток, характеризующихся повышенной лекарственной устойчивостью. Они проявляли большую резистентность в условиях гипоксии. Наблюдаемая закономерность отмечалась только для одной из полученных линий, что, вероятно, связано с различиями в свойствах исходных опухолей.

Тезисы

Связь лимфогенного метастазирования при раке прямой кишки с параметрами опухолевого неоангиогенеза

С.Р. Алтыбаев¹, И.В. Степанов^{1,2}, К.В. Рачковский²,
С.Г. Афанасьев², С.В. Вторушин^{1,2}, М.В. Завьялова^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск;

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Рак прямой кишки является 3-м в мире по распространенности злокачественным новообразованием. Известно, что темпы роста первичного опухолевого узла, размером в несколько миллиметров, зависят от выраженности сосудистого компонента опухоли. Процесс формирования новых микрососудов под воздействием ростовых факторов, синтезируемых опухолевыми клетками, в литературе называется неоангиогенезом. Оценка опухолевого неоангиогенеза заключается в определении плотности микрососудов и «сосудистых почек», представленных кластером пролиферирующих эндотелиоцитов. Необходимость изучения неоангиогенеза обусловлена развитием лимфогенных метастазов уже на ранних стадиях злокачественного процесса при раке прямой кишки.

Задачи исследования. Исследование плотности микрососудов и «сосудистых почек» у больных раком прямой кишки на различной глубине инвазии опухоли, оценка взаимосвязи процессов опухолевого неоангиогенеза с параметрами лимфогенного метастазирования.

Материалы и методы. Исследовали операционный материал от 149 больных (95 (64 %) мужчин и 54 (36 %) женщин) аденокарциномой прямой кишки стадии T1–4N0–2M0, проходивших химиолучевую терапию в неoadьювантном и адьювантном режимах в торакоабдоминальном отделении Томского НИИ онкологии в период с 2000 по 2015 г. Средний возраст больных составил $57,6 \pm 9,3$ года. Плотность микрососудов и «сосудистых почек» в опухолевой ткани оценивали с помощью иммуногистохимического исследования экспрессии CD34 (Dako) на различной глубине инвазии.

Результаты. При изучении плотности микрососудов и «сосудистых почек» в опухолевой ткани на различной глубине инвазии оказалось, что в слизистой оболочке прямой кишки плотность микрососудов выше при наличии лимфогенных метастазов по сравнению с группой без лимфогенного метастазирования ($11,9 \pm 5,2$ и $8,4 \pm 3,5$ соответственно; $f=4,6$; $p=0,04$). Плотность

микрососудов в подслизистом слое, мышечной, серозной или адвентициальной оболочках прямой кишки не различались в группах с наличием или отсутствием лимфогенных метастазов. Плотность «сосудистых почек» во всех слоях стенки прямой кишки не была связана с лимфогенным метастазированием.

Выводы. Проведенное исследование показывает необходимость подробного изучения опухолевого неоангиогенеза у пациентов с раком прямой кишки с учетом локализации микрососудов в различных слоях стенки органа. Данные, полученные в ходе исследования, позволяют рассматривать иммуногистохимическую идентификацию опухолевых сосудов как метод раннего прогнозирования риска возникновения лимфогенного метастазирования при раке прямой кишки по биоптатам.

Изучение маркеров эпителиально-мезенхимального перехода при раке молочной железы

С.В. Вторушин^{1,2}, М.В. Завьялова¹⁻³, Н.В. Крахмаль^{1,2},
К.Ю. Христенко^{1,2}

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

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

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

Введение. При развитии и прогрессировании злокачественной опухоли ее клетки приобретают повышенный потенциал к миграции и инвазии, что является необходимым для реализации процесса метастазирования. Обсуждается вопрос о том, что в основе инвазивного роста и прогрессирования опухоли лежит механизм эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), при котором опухолевые клетки становятся подвижными, могут отделяться от эпителиального пласта, приобретая «локомоторный фенотип». Запуск ЭМП в злокачественных опухолях происходит при активации различных транскрипционных факторов, в частности фактора транскрипции Snail и др.

Задачи исследования. Изучение особенности экспрессии транскрипционного фактора Snail в различных структурах инфильтративного компонента инвазивной карциномы неспецифического типа молочной железы.

Материалы и методы. Выполнено морфологическое исследование операционного материала от 107 пациентов, больных раком молочной железы стадии

T1–3N0–3M0 без неoadьювантной терапии. В исследовании включали только случаи с инвазивной карциномой неспецифического типа молочной железы (Женева, 2012). В инфильтративном компоненте опухоли определяли наличие альвеолярных, трабекулярных, тубулярных и солидных структур как проявлений коллективной инвазии. Оценивали наличие дискретных групп опухолевых клеток как проявлений индивидуальной инвазии. Для иммуногистохимического исследования использовали антитела к Snail (Abcam, Великобритания).

Результаты. Исследование показало, что экспрессия Snail реже обнаруживалась в дискретных группах опухолевых клеток (77 %) по сравнению с альвеолярными (90 %; $p = 0,02$), тубулярными (100 %; $p = 0,005$), трабекулярными (96 %; $p = 0,002$) и солидными (95 %; $p = 0,0005$) структурами. При этом процент клеток с положительной экспрессией был ниже в солидных структурах ($69,7 \pm 16,7$), чем в альвеолярных ($78,2 \pm 13,8$; $p = 0,001$), тубулярных ($77,1 \pm 15,1$; $p = 0,03$), трабекулярных ($84,0 \pm 28,0$; $p = 0,0002$) и группах клеток ($84,6 \pm 28,2$; $p = 0,0001$).

Выводы. Экспрессия Snail регистрировалась в большинстве случаев во всех многоклеточных структурах опухоли, являющихся, по сути, морфологическим проявлением коллективной инвазии, реже экспрессия отмечалась в дискретных клетках. Это говорит о том, что экспрессия фактора Snail может быть проявлением начальной стадии ЭМП, и возможно поэтому его экспрессия была обнаружена в большинстве случаев и преимущественно в многоклеточных структурах инфильтративного компонента опухоли. Эти данные были выявлены впервые, в связи с чем заслуживают внимания и требуют дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента РФ (№ 14. W01.16.9084-МД от 14.03.2016 г.).

Взаимосвязь между титром антител вируса Эпштейна–Барр, присутствием вирусного генома и экспрессией LMP-1 у больных с опухолями слюнных желез, раком ротовой полости и карциномой носоглотки

Е. В. Моисеенко-Голубовича¹, А. Б. Иванова¹,
В. В. Грома¹, М. Ф. Муровская^{1, 2}

¹Рижский университет им. П. Страдиня, Рига;

²Институт микробиологии и вирусологии
им. А. Кирхенштейна, Рига

Введение. Рак ротовой полости, по оценкам Всемирной организации здравоохранения, является 8-й

наиболее распространенной формой рака во всем мире. Высокий риск развития опухолей ротовой полости связывают с инфицированием организма вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) в юности и его последующей реактивацией в зрелом возрасте. Исследования в области вирусологии и онкологии подтверждают, что при поддержке вируса ВЭБ происходят злокачественные трансформации инфицированных клеток организма.

Задачи исследования. Оценка титров антител ВЭБ в сыворотке крови, определение связи с LMP-1 (онкобелком вируса ВЭБ) и наличия ДНК ВЭБ в опухолевых тканях. Сравнение данных показателей в случаях доброкачественных и злокачественных опухолей слюнных желез, плоскоклеточного рака полости рта с раком носоглотки.

Материалы и методы. В целях идентификации LMP-1 и ДНК ВЭБ для исследования были отобраны образцы тканей (диаметр около 5 мм) опухоли слюнных желез, плоскоклеточного рака ротовой полости и рака носоглотки во время операции.

Результаты. Иммуногистохимически в базальном и парабазальном слоях плоскоклеточного рака ротовой полости был выявлен значительный уровень LMP-1. Все образцы плоскоклеточного рака также показали экспрессию LMP-1 в инфильтрированных лимфоцитах. В оральных образцах опухолевых тканей обнаружена ДНК уровня ВЭБ у 4 пациентов с плоскоклеточным раком ротовой полости. ДНК ВЭБ была определена во всех образцах плоскоклеточного рака полости рта классов 2, 3 при клинической стадии III, IV. У пациентов с карциномой полости рта повышенные титры анти-ВЭБ антитела соответствуют наличию ДНК ВЭБ в опухолевых тканях.

Выводы. Мы пришли к выводу, что вирус ВЭБ может инфицировать в скрытой форме слизистую оболочку полости рта за пределами области носоглотки. Присутствие LMP-1 — главного онкобелка вируса, во многих ВЭБ-положительных образцах плоскоклеточного рака ротовой полости различной локализации указывает на то, что эта скрытая инфекция может влиять на онкогенную трансформацию инфицированного эпителия полости рта.