

СЕКЦИЯ VII

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ

Доклады

Роль молекулярно-генетических факторов в формировании резистентности к терапии тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы

Н.Н. Бабышкина, М.В. Завьялова,
Т.А. Дронова, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева
НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский
государственный университет», Томск;
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Томск

Введение. Одними из возможных механизмов формирования резистентности к эндокринной терапии в настоящее время рассматриваются изменение активности эстрогеновых рецепторов (ER α) и двунаправленное взаимодействие между ER α и рецепторами факторов роста.

Задачи исследования. Изучение характера распределения ER α , уровня экспрессии рецепторов эпидермального (EGFR) и трансформирующего факторов роста (TGF- β R1), их полиморфных вариантов для поиска взаимосвязи с эффективностью терапии тамоксифеном у 113 больных люминальным раком молочной железы.

Материалы и методы. У 37 пациенток отмечено прогрессирование заболевания на фоне приема тамоксифена (тамоксифен-резистентная группа), у 76 больных признаки прогрессирования отсутствовали (тамоксифен-чувствительная группа). Характер распределения ER α , а также уровень экспрессии EGFR и TGF- β R1 оценивали иммуногистохимическим методом. Полиморфизм генов *ESR1* (rs2228480, rs2077647), *EGFR*

(rs1468727), *TGF- β R1* (rs334354) был изучен с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Гетерогенный характер распределения ER α в опухоли был выявлен в 81,1 % наблюдений у пациенток с прогрессированием заболевания по сравнению с 56,6 % больных с благоприятным исходом ($p = 0,019$). Кроме того, носительство мутантного генотипа и аллеля гена *ESR1* (rs2228480) ассоциировано с резистентностью к терапии тамоксифеном ($p = 0,022$ и $p = 0,018$ соответственно). Показано, что уровень экспрессии EGFR значимо выше в тамоксифен-резистентной группе больных по сравнению с тамоксифен-чувствительной ($p = 0,007$). Напротив, высокие показатели экспрессии TGF- β R1 наблюдались в тамоксифен-чувствительной группе по сравнению с тамоксифен-резистентной ($p = 0,043$).

Выводы. Характер распределения ER α , уровень экспрессии EGFR и TGF- β R1, а также полиморфные варианты *ESR1* могут являться потенциальными молекулярно-генетическими маркерами эффективности терапии тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МД-9084.2016.7.

Иматиниб ингибирует процессы гомологичной рекомбинации ДНК и вызывает сенситизацию клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа

С.В. Бойчук, А.Р. Галембикова, П.Д. Дунаев

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань

Введение. С учетом характера повреждений ДНК, вызываемых ингибиторами топоизомеразы II типа, вызывает интерес изучение возможности сенситизации клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) путем ингибирования процессов репарации повреждений ДНК.

Задачи исследования. Изучить способность иматиниба (ИМ) подавлять процессы гомологичной рекомбинации ДНК и вызывать сенситизацию клеток ГИСО к действию ингибиторов топоизомеразы II типа.

Материалы и методы. Исследования проводили на клеточных линиях ГИСО, чувствительных и резистентных к действию ИМ. В качестве отрицательного контроля использовали линию лейомиосаркомы SK-LMS-1. Клетки культивировали в присутствии ИМ, химиопрепаратов доксорубицина (Докс) или этопозида (Это). В отдельной серии экспериментов перед внесением в культуру клеток химиопрепаратов в течение 24 ч проводили преинкубацию клеток ГИСО с ИМ. Экспрессию белков, отражающих повреждение ДНК, активацию путей репарации и развитие апоптоза, оценивали методом иммуноблоттинга. Эффективность процессов гомологичной рекомбинации ДНК оценивали с помощью репортерной клеточной линии DR-U2-OS, содержащей интегрированную в геном копию гена *GFP*, приобретающего свою функциональность после индукции двунитевых разрывов ДНК. Пролиферативную способность клеток определяли фотокolorиметрическим методом, а также в режиме реального времени с помощью клеточного анализатора iCELLigence.

Результаты. Показана способность ИМ повышать чувствительность опухолевых клеток ГИСО к действию Докс и Это. Преинкубация клеток ГИСО с ИМ и последующее внесение в среду клеток Докс и Это приводили к дозозависимому снижению пролиферативной активности опухолевых клеток, превышающему эффект каждого из препаратов в отдельности. Этот факт был также обнаружен и на ИМ-резистентной линии ГИСО430. Инкубация клеток ГИСО с химиопрепаратами приводила к значительному повышению уровней экспрессии белков, регулирующих процессы гомологичной рекомбинации ДНК (например, рекомбиназы

Rad51). В то же время инкубация клеток ГИСО с ИМ приводила к значительному снижению уровня экспрессии Rad51. Уровень экспрессии Rad51 оставался по-прежнему низким в клетках ГИСО, культивированных с ингибиторами ДНК-топоизомеразы II на фоне воздействия ИМ. Индукция двунитевых разрывов ДНК в индикаторной клеточной линии DR-U2-OS приводила к увеличению количества GFP-позитивных клеток, в то время как ИМ индуцировал почти 3-кратное снижение данного показателя.

Выводы. ИМ способен вызывать сенситизацию клеток ГИСО к ингибиторам топоизомеразы II типа. Эффект может быть обусловлен ингибированием процессов гомологичной рекомбинации ДНК.

Внеклеточные микроРНК крови и мочи в диагностике рака предстательной железы

О.Е. Брызгунова^{1,2}, И.Д. Осипов¹, Е.А. Лехнов¹, Т.Е. Скворцова¹, Е.С. Морозкин^{1,2}, А.Е. Григорьева¹, М.М. Зарипов³, Е.И. Рябчикова¹, В.В. Власов¹, П.П. Лактионов^{1,2}

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

²ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск;

³ГБУЗ НО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер», Новосибирск

Введение. Несмотря на эффективную терапию рака предстательной железы (РПЖ) в развитых странах и хорошую 5-летнюю выживаемость, неинвазивная дифференциальная диагностика РПЖ, которая позволяла бы не только оценивать, но и прогнозировать эффективность терапии, до сих пор остается востребованной. Кроме того, новые маркеры РПЖ, которые могли бы заменить простатспецифический антиген (ПСА), также востребованы, поскольку USPSTF не рекомендует использовать ПСА в связи с низкой специфичностью анализа. Такими маркерами могли бы стать свободные микроРНК крови или мочи, поскольку данные последних лет демонстрируют, что микроРНК могут быть эффективно использованы для диагностики рака.

Задачи исследования. Оценка эффективности диагностики РПЖ при помощи внеклеточных микроРНК крови и мочи.

Материалы и методы. Разработаны эффективные протоколы выделения микроРНК из крови и мочи (Zaporozhchenko et al., Anal Biochem 2015; Lekchnov et al., Anal Biochem 2016), оценено распределение внеклеточных микроРНК мочи между свободными комплексами и микрочастицами (Bryzgunova et al., PLoS One 2016), оценены концентрации нескольких микроРНК в сравнении с микроРНК-нормализаторами (miR-16,

miR-101) в крови (miR-19b, miR-21, miR-126, miR-141, miR-205) и моче (miR-19b, miR-25, miR-125b, miR-205).

Результаты. На примере микроРНК крови 48 больных РПЖ и 47 здоровых доноров обнаружено, что уровень miR-141 позволяет различать группы больных РПЖ и здоровых доноров со 100 % специфичностью и 56,25 % чувствительностью, в то время как модель, основанная на логистической регрессии уровней экспрессии miR-141 и miR-205, обладает большей диагностической ценностью, однако не позволяет достигнуть абсолютной специфичности (73 и 83 % соответственно). Кроме того, уровень экспрессии miR-141 позволяет отличать пациентов с ранней стадией развития РПЖ (T2a–2b) от здоровых доноров с абсолютной чувствительностью и специфичностью.

Исследование распределения и уровня экспрессии микроРНК мочи показало, что источником диагностически значимых микроРНК мочи являются микрочастицы мочи. Обнаружено, что измерение концентрации микроРНК miR-19b в сравнении с miR-16 во фракциях суммарных микрочастиц и экзосом мочи (ROC-анализ, AUC 0,97/0,91) позволяет выявлять больных РПЖ с чувствительностью/специфичностью 93/100 % и 79/95 % соответственно.

Выводы. Полученные данные требуют верификации на выборках больных и здоровых большего объема. Поиск новых пар диагностически значимых микроРНК и их комбинаций позволит разработать новые варианты неинвазивной диагностики РПЖ.

Новые кандидатные маркеры для ранней диагностики и прогноза течения плоскоклеточного рака головы и шеи

Г.В. Какурина, И.В. Кондакова, О.В. Черемисина,
Д.А. Шишкин, Е.Л. Чойнзонов

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Дисплазия эпителия органов головы и шеи чаще всего переходит в высокоагрессивный плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ). Поэтому актуально выявить молекулярные маркеры ранней диагностики и прогноза течения ПРГШ.

Задачи исследования. Анализ протеома сыворотки крови в группах больных ПРГШ с метастазами, без метастазов и здоровых лиц. Выбор и валидация кандидатных маркеров.

Материалы и методы. Протеомный анализ сыворотки крови первичных больных ПРГШ с метастазами, без метастазов и здоровых лиц проводили на масс-спектрометре UltraFlexIII TOF/TOF (Bruker, США), идентификацию белков — с помощью алгоритма Mascot и специализированных программ. Валидацию резуль-

татов протеомного анализа осуществляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) в сыворотке крови 23 первичных больных ПРГШ (T1–4N0–3M0), 8 пациентов с хроническими заболеваниями гортани и гортаноглотки (дисплазия ДП–ДПП, хронический гиперпластический ларингит – ХГЛ) и 10 здоровых лиц. Анализ сыворотки крови проводили с помощью наборов CAP1 (Cusabio) и PPM1B ELISA Kit (MyBioSource) на ИФА-ридеере Anthos Reader 2020 (Biochrom). Статистическую обработку проводили с помощью программ Statistica 6.0.

Результаты. Протеомный анализ показал различия протеома сыворотки крови во всех исследуемых группах. Идентифицированы белки: аденилилциклаза-ассоциированный протеин 1 (CAP1), протеинфосфатаза 1B (PPM1B), альфа-2 макроглобулин и др. Анализ данных литературы позволил выделить несколько кандидатных маркеров для валидации полученных результатов, в том числе CAP1 и PPM1B. Методом иммуноферментного анализа выявлены достоверные различия в содержании сывороточных CAP1 и PPM1B во всех группах. У больных ПРГШ (T1N0M0) уровень сывороточного CAP1 был выше, чем у пациентов с ХГЛ и в группе здоровых лиц, почти в 2 раза. Уровень сывороточного PPM1B у больных ХГЛ и ПРГШ T1–2N0M0 также был выше контрольного и сохранял тенденцию к росту с увеличением стадии. Корреляционный анализ показал положительную зависимость уровня CAP1 в сыворотке крови от наличия метастазов и размера опухолевого узла, а уровня PPM1B от размера первичного опухолевого очага. Отмечена положительная связь между содержанием CAP1 и PPM1B, что говорит о необходимости дополнительных исследований.

Выводы. Сравнительный анализ протеома сыворотки крови больных ПРГШ позволил выделить несколько кандидатных маркеров. Валидация результатов показала зависимость уровня CAP1 и PPM1B в сыворотке крови от размера первичного опухолевого очага, уровня CAP1 от наличия регионарных метастазов. Таким образом определение CAP1 в сыворотке крови может быть полезным для прогноза ПРГШ и для своевременной диагностики этого заболевания в группе пациентов с ХГЛ.

Метод мониторинга минимальной остаточной болезни при острых лимфобластных лейкозах на основе технологий массивированного секвенирования

А.Ю. Комков, А.А. Минервина, Г.А. Нугманов,
А.М. Мирошниченко, А.В. Панферова, Ю.В. Ольшанская,
М.А. Масчан, И.З. Мамедов, Ю.Б. Лебедев

ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»,
Москва;

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской
гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия
Рогачева» Минздрава России, Москва

Введение. Минимальная остаточная болезнь (МОБ) является одним из основных диагностических показателей, которые определяют как эффективность терапии, так и выбор стратегии дальнейшего лечения при лейкозах. Процедура определения МОБ предполагает первоначальное выявление опухолеспецифических молекулярных маркеров (вариабельные участки локусов Т- и В-клеточных рецепторов, хромосомные транслокации и др.) в клетках костного мозга пациента до лечения и мониторинг количества клеток с такими маркерами в костном мозге после терапии. Один из самых перспективных подходов к выявлению МОБ — слежение за нуклеотидными последовательностями опухолеспецифических Т- и В-клеточных рецепторов с помощью массивированного секвенирования (NGS).

Задачи исследования. Разработка метода определения МОБ на основе NGS с построением калибровочной прямой, используемой для количественной оценки концентрации опухолевых клеток в костном мозге после терапии.

Материалы и методы. Предлагаемый метод основан на секвенировании ампликонов V(D)J перестроек локусов Т- и В-клеточных рецепторов и поиске среди них ранее идентифицированных опухолеспецифических перестроек. Концентрация опухолевого клона в целевом образце определяется методом экстраполяции или интерполяции на калибровочной прямой, построенной в системе координат, где по оси X откладывается концентрация искомой опухолеспецифической перестройки, а по оси Y в логарифмической шкале — число прочтений, приходящихся на эту перестройку. Калибровочная прямая строится по 3 точкам на основании данных секвенирования искомых перестроек в 3 аллельных вариантах ДНК из целевого образца с вложенными контролями ДНК инициального образца в концентрации 10, 100 и 1000 опухолевых клеток на 100 000 клеток.

Результаты. С помощью описанного метода был проведен анализ МОБ в образцах ДНК из костного мозга 3 пациентов на 36-й день после начала терапии. Были

использованы 7 ранее идентифицированных опухолеспецифических V(D)J перестроек. У 2 из 3 пациентов не обнаружено наличие лейкоэмических клеток в анализируемых образцах, у 3-го пациента концентрация лейкоэмического клона равнялась 1 клетке на 100 000 нормальных клеток.

Выводы. Предложенный подход применим для определения МОБ, обладает чувствительностью, ограниченной только количеством клеток, поступивших в анализ, при этом точность анализа обеспечивается непосредственным слежением за маркерами, каждый из которых имеет уникальную нуклеотидную последовательность.

*Работа поддержана Минобрнауки России
(грант № RFMEFI60414X0118).*

Клеточные биочипы и возможности их применения для диагностики онкогематологических заболеваний

С.А. Кузнецова, А.Н. Хвастунова, О.С. Федянина,
А.О. Закирова, А.Е. Задорожная, Ф.И. Атауллаханов

ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской
гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия
Рогачева» Минздрава России, Москва

Введение. Диагностика онкогематологических заболеваний базируется на комбинации данных морфологии, цитохимических исследований и иммунофенотипирования. В настоящее время проведение данных исследований на одних и тех же клетках невозможно.

Задачи исследования. Разработка метода параллельного определения поверхностных маркеров лейкоцитов и подробного морфологического и цитохимического исследования на основе клеточного биочипа — прозрачной подложки с иммобилизованными антителами к 42 дифференцировочным CD-антигенам лейкоцитов, включая положительный и отрицательный контроль.

Материалы и методы. При инкубации биочипа с суспензией лейкоцитов клетки, несущие определенный поверхностный антиген, связываются с иммобилизованными на биочипе антителами. После отмывки неспецифически связавшихся клеток на подложке остаются области, покрытые лейкоцитами, несущими тот или иной поверхностный антиген. Затем биочип высушивается и к связавшимся с ним клеткам применяются стандартные методы морфологической или цитохимической окраски. Таким образом, биочип сортирует лейкоциты по поверхностным антигенам для последующего морфологического или цитохимического исследования.

Результаты. Плотность связывания лейкоцитов с иммобилизованными на биочипе антителами позволяет оценить долю клеток, положительных по соответствующим поверхностным антигенам. Морфология и цитохимическая активность нормальных и патологиче-

ских лейкоцитов крови и костного мозга на биочипе совпадают с соответствующими характеристиками аналогичных клеток в стандартных мазках. Биочип позволяет исследовать морфологически выделяемые субпопуляции как нормальных, так и опухолевых лейкоцитов, составляющие от 1 % от общего числа исследуемых клеток, и определить их иммунофенотип. Разделение клеток по поверхностным маркерам позволяет также выделить чистую популяцию опухолевых клеток и разделить 2 популяции опухолевых клеток в случае билинейных лейкозов.

Выводы. Биочип может быть использован в диагностике онкогематологических заболеваний в тех случаях, когда опухолевые клетки можно выделить морфологически, в том числе для определения их количества, иммунофенотипа и цитохимической активности. Эти данные в большинстве случаев позволяют поставить предварительный диагноз.

Работа частично поддержана грантами РФФИ № 16-34-01030 и 16-04-00282.

Цитотоксический эффект антител против PRAME-экспрессирующих клеток

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

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

Введение. Белок PRAME является перспективной мишенью для противоопухолевой иммунотерапии, так как не экспрессируется в здоровых тканях, но активен в опухолевых клетках многих гистологических типов. Существуют данные, указывающие на то, что белок PRAME локализован на внешней мембране опухолевой клетки. Известно, что некоторые мембранные рецепторы при ассоциации с антителами могут индуцировать апоптотическую гибель клетки. Возможность гибели PRAME-экспрессирующих клеток под действием антител против PRAME не изучалась.

Задачи исследования. Определение эффектов, оказываемых моноклональными антителами 5D3F2 и 6H8F12 на опухолевые линии клеток, экспрессирующие ген PRAME на различных уровнях.

Материалы и методы. В работе использованы опухолевые линии клеток с различным уровнем экспрессии гена PRAME: NOMO-1, TNP-1, K562, WI-38, WI-38-PRAME. Проводилось инкубирование данных линий клеток с моноклональными антителами 5D3F2 и 6H8F12. Конечная концентрация антител в культуральной среде составила от 6 до 120 мкг/мл. Проводили подсчет клеток после инкубирования с антителами через 24, 48 и 72 ч эксперимента. Количество мертвых клеток оценивали при проведении МТТ-теста после 24 ч инкубирования с моноклональным антителом 6H8F12.

Результаты. Скорость роста клеток замедлилась при инкубировании в присутствии моноклональных антител. Цитостатический эффект антител 5D3F2 и 6H8F12 увеличивался напрямую с ростом концентрации антитела в среде (коэффициент корреляции Пирсона составил 0,67; $p = 0,0219$). Рост линии K562 был значимо меньшим, чем линий TNP-1 ($p = 0,0061$), NOMO-1 ($p = 0,0005$) и WI-38 ($p = 0,0002$) в присутствии одинакового количества антитела 6H8F12. Скорость роста клеток линии K562 была ниже, чем линии WI-38-PRAME ($p = 0,0027$), несмотря на то что в данных линиях ген PRAME экспрессировался на сопоставимом уровне ($p = 0,65$). Влияние антител 5D3F2 и 6H8F12 на скорость роста клеток было сопоставимым ($p = 0,3946$). Согласно данным МТТ-теста в линиях K562 и WI-38-PRAME погибло сопоставимое количество клеток после 24 ч инкубирования с моноклональными антителами 5D3F2 и 6H8F12 ($p = 0,8405$). При тех же условиях погибло меньше клеток линии TNP-1, чем K562 ($p = 0,6335$). По сравнению с K562 в линиях NOMO-1 и WI-38 погибло существенно меньшее количество клеток ($p = 0,0026$ и $p = 0,0005$ соответственно).

Выводы. Показано, что моноклональные антитела 5D3F2 и 6H8F12 проявляют цитотоксический эффект против PRAME-экспрессирующих клеток. При более высоком уровне экспрессии гена PRAME в клетках-мишенях цитостатический эффект более сильный.

Поиск молекулярных маркеров для неинвазивной диагностики онкоурологических заболеваний

Д.С. Михайленков, Д.В. Перепечин, Г.Д. Ефремов,
М.В. Немцова

*ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России, Москва;*

*НИИ урологии и интервенционной радиологии
им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ НМИРЦ
Минздрава России, Москва*

Введение. Рак предстательной железы (РПЖ) и рак мочевого пузыря (РМП) относятся к наиболее частым онкоурологическим заболеваниям. Основной лабораторный метод диагностики РПЖ – определение уровня простатспецифического антигена в крови, однако его концентрация может быть повышена не только при РПЖ, но и при воспалении, доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ) или простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН). Чувствительность цитологического анализа мочи при РМП существенно ограничена на I стадии заболевания. В связи с этим актуален поиск новых молекулярных маркеров для диагностики РПЖ и РМП.

Задачи исследования. Комплексный анализ экспрессии гена *PCA3*, химерного онкогена *TMPRSS2:ERG* и мутаций гена *FGFR3* в осадках мочи как потенциаль-

ных маркеров для неинвазивной диагностики основных онкоурологических заболеваний.

Материалы и методы. На 1-м этапе исследовали 29 образцов РНК, выделенной из осадка мочи пациентов с РПЖ (10 образцов), группу контроля составили 19 образцов ДГПЖ/ПИН и простатита. Экспрессию генов *PCAZ* и *TMPRSS2:ERG* определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с TaqMan-зондами относительно эндогенного (*GAPDH*) и тканеспецифичного (*KLK3*) контролей. На 2-м этапе, используя полимеразную цепную реакцию с последующим секвенированием экзонов 7 и 10 *FGFR3*, исследовали 16 образцов осадков ДНК из осадков мочи больных РМП, группу контроля составили 24 пациента с циститом и мочекаменной болезнью.

Результаты. Гиперэкспрессия *PCAZ* была характерна для РПЖ: диагностическая точность при пороговом значении ΔCt (*PCAZ-KLK3*), равном 0,98, составила 84 % для осадков мочи. Экспрессия химерного онкогена *TMPRSS2:ERG* выявлена в 50 % случаев РПЖ и 17 % случаев ПИН, которая рассматривается как предраковое состояние. В 31 % случаев РМП обнаружены миссенс-мутации: с.746С→G (р.S249C), с.1124А→G (р.Y375C), с.1144G→C (р.G382R) и 2 случая с.1156Т→C (р.F386L), в контрольной группе мутации *FGFR3* не выявлены.

Выводы. Показано, что анализ экспрессии и мутаций генов *PCAZ*, *TMPRSS2:ERG* и *FGFR3* может быть использован как компонент неинвазивной диагностики РПЖ и РМП по осадку мочи.

Выделение и комплексный анализ биохимического состава экзосом плазмы – перспективный метод диагностики колоректального рака

Р.Б. Самсонов¹, Т.А. Шгам², В.С. Бурдаков², А.В. Малек¹

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

²ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», Ленинградская область, Гатчина

Введение. Рост заболеваемости колоректальным раком (КРР) за последние годы отмечается во всех экономически развитых странах, и в настоящее время это заболевание занимает одно из лидирующих мест в онкологической статистике. Разработка эффективных методов скрининга КРР является актуальной социальной и научной задачей. Экзосомы – мембранные нановезикулы (50–130 нм), секретируемые большинством клеток. Развитие опухоли сопровождается появлением в плазме экзосом опухолевого происхождения. Выделение и биохимический анализ таких экзосом представляется перспективным методом скрининга КРР.

Задачи исследования. Разработка технологии выделения и биохимического анализа циркулирующих

экзосом плазмы и оценка диагностической ценности метода.

Материалы и методы. В работу были включены образцы плазмы пациентов с заболеваниями толстой кишки ($n = 66$) и здоровых доноров ($n = 12$). Экзосомы из плазмы выделялись ультрацентрифугированием либо путем иммунопреципитации с использованием антител к маркеру CD63 и антител к белку MT9SF4, экспрессия которого характерна для клеток, утилизирующих глюкозу анаэробно. Белок MT9SF4 присутствует также и в составе экзосом, секретируемых такими клетками. Для оценки характеристик экзосом использовали методы динамического светорассеяния, атомно-силовой микроскопии, вестерн-блоттинг.

Результаты. Проведен анализ 84 молекул опухолеассоциированных микроРНК, выделенных из экзосом плазмы пациентов с КРР до и после операции. Сравнение 2 групп пациентов, перенесших разные операции (радикальное хирургическое лечение в сравнении с циторедукцией), позволило идентифицировать 11 молекул, повышенная концентрация которых в циркулирующих экзосомах была ассоциирована с наличием опухоли. Проведена валидация полученных данных на независимой когорте пациентов с КРР (до и после операции), доброкачественными новообразованиями толстой кишки и группе здоровых доноров. Показано, что анализ 4 микроРНК (miR-181a, miR-29b, miR-106b и miR-223) в популяции MT9SF4-позитивных экзосом позволяет идентифицировать пациентов с КРР с чувствительностью 96 % и специфичностью 82 %.

Выводы. Анализ микроРНК в популяции MT9SF4-позитивных экзосом является перспективным методом скрининга КРР. Диагностическая ценность метода может быть повышена при использовании дополнительных опухолеспецифических поверхностных маркеров и оптимизации алгоритма интерпретации результатов анализа микроРНК.

Омиксные технологии в персонализированной медицине: пилотное клиническое исследование пациентов с метастатическим раком молочной железы с тройным негативным фенотипом

Т.С. Серебрянская¹, Н.В. Кузькина¹, Н.А. Кирюхина¹, М.Н. Федянин², М.А. Фролова², А.В. Петровский², С.А. Тюлядин²

¹ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва;

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

Введение. Рак молочной железы с тройным негативным фенотипом (ТНРМЖ) характеризуется высо-

кой молекулярной гетерогенностью. До настоящего времени нет таргетной терапии и прогностических биомаркеров для ТНРМЖ, за исключением мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Развитие омиксных технологий открывает новые возможности для персонализированного подхода к назначению лекарственной терапии больным с ТНРМЖ.

Задачи исследования. Определение опухолевой гетерогенности и индивидуальных механизмов устойчивости пациентов с ТНРМЖ к применяемым лекарственным препаратам.

Материалы и методы. Для исследования были использованы биоптаты опухолей из регионарных лимфатических узлов 10 пациентов, страдающих метастатическим ТНРМЖ. Были проведены полноэкзомный сиквенс образцов ДНК и анализ полного транскриптома с использованием микрочипов.

Результаты. В образцах опухолей были найдены наследственные факторы риска: у 4 пациенток мутации в гене *TP53* (синдром Ли–Фраумени) и у 1 пациентки в гене *MSH6* (синдром Линча), а также патогенные соматические мутации в хорошо известных драйверных генах (*SMO*, *CTNNT1*, *CDKN1B*). Определено соответствие образцов опухолей подтипам классификации Лехмана. По результатам анализа были построены индивидуальные модели процессов, происходящих в опухоли, которые объясняют устойчивость к применяемой терапии.

Выводы. На основании геномного анализа и соответствия подтипам классификации Лехмана были предложены препараты для терапии. Разработанный подход нуждается в дальнейшей клинической валидации.

Новая высокочувствительная система иммуноферментного анализа для определения концентрации растворимого эндоглина в плазме крови и моче

И.В. Смирнов, И.В. Грязева, М.П. Самойлович,
Л.А. Терехина, А.А. Пиневиц, И.Ю. Крутецкая,
О.А. Шашкова, В.Б. Климович

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

Введение. Эндоглин (CD105) — трансмембранный гликопротеин, экспрессированный преимущественно на поверхности клеток сосудистого эндотелия. Существенное увеличение плотности этого антигена на мембране клеток связано с активацией процессов ангиогенеза. Эндоглин также обнаруживают на поверхности клеток рака молочной и предстательной желез. Показано, что уровень экспрессии антигена и метастатическая активность опухолевых клеток взаимосвязаны.

Растворимая форма эндоглина образуется в результате протеолитического отщепления экстраклеточного домена молекулы и может быть обнаружена в плазме крови и моче. Оценку ее концентрации используют для прогнозирования течения ряда онкологических заболеваний, в том числе рака прямой и ободочной кишки, молочной и предстательной желез. Недостатком существующих тест-систем, выявляющих растворимую форму антигена, является низкая чувствительность. Наибольшие трудности вызывает определение концентрации эндоглина в моче. Предварительное концентрирование образцов увеличивает время и снижает точность анализа.

Задачи исследования. Разработка новой двухцентровой системы иммуноферментного анализа (ИФА) для определения концентрации растворимого эндоглина в плазме крови и моче.

Материалы и методы. В лаборатории гибридной технологии РНЦРХТ создана новая панель моноклональных антител (МКАТ) к эндоглину человека. Входящие в нее реагенты были использованы в качестве компонентов при разработке двухцентровых иммуноферментных систем.

Результаты. Различные варианты двухцентровых систем ИФА определяли разное содержание антигена в одних и тех же образцах. Пара МКАТ 4Е4–4С9 позволяла выявлять наибольшие уровни растворимого эндоглина. Определяемые с ее помощью величины концентрации антигена были в среднем на 2 порядка выше значений, полученных с использованием коммерческого аналога (R&D Systems). Столь существенные различия в оценках концентраций антигена являются следствием гетерогенности молекул мишени. Антигенная специфичность всех систем ИФА подтверждена с помощью референс-реагентов.

Возможности выявления растворимой формы эндоглина с помощью системы 4Е4–4С9 продемонстрированы с использованием образцов плазмы крови и мочи, полученных от здоровых волонтеров и больных раком предстательной железы.

Выводы. Созданная система двухцентрового ИФА позволяет проводить быстрое и точное определение концентраций растворимого эндоглина в образцах плазмы крови и мочи. Высокая чувствительность системы к антигену избавляет от необходимости предварительного концентрирования образцов мочи.

Протеомный анализ циркулирующих экзосом крови в норме и при злокачественных новообразованиях молочной железы

С.Н. Тамкович, Ю.С. Бакакина, А.К. Сомов, О.С. Тутанов,
Н.А. Кирюшина, К.В. Карпухина, Л.В. Дубовская,
В.Е. Войццкий, И.Д. Волоотовский, П.П. Лактионов

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

*Институт биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси, Минск;*

*ГБУЗ НО «Новосибирский областной клинический
онкологический диспансер», Новосибирск*

Введение. Поскольку экзосомы рассматриваются в качестве источника диагностически значимых биомаркеров, эффективное выделение экзосом из крови является актуальной задачей. Мы показали, что значительная часть экзосом может быть связана с поверхностью форменных элементов крови, однако белковый спектр экзосом, связанных с форменными элементами крови, ранее не исследовался.

Задачи исследования. Выделение, характеристика и сравнительный анализ протеома экзосом крови здоровых женщин и больных раком молочной железы.

Материалы и методы. Микровезикулы из плазмы крови и суммарные микровезикулы крови, включаю-

щие микровезикулы, связанные с поверхностью клеток крови, и микровезикулы плазмы крови, здоровых женщин и больных раком молочной железы были выделены методом фильтрации и ультрацентрифугирования. Размер и количество экзосом определяли при помощи анализатора частиц NanoSight NS300 (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). Для получения протеомных карт экзосом использовали метод 2D-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Результаты. При помощи проточной цитофлуориметрии и анти-CD9-, анти-CD24-, анти-CD63- и анти-CD81-антител обнаружено, что основную часть в полученных препаратах микровезикул составляют экзосомы. Показано, что содержание экзосом в пулированных образцах крови здоровых женщин и больных раком молочной железы не отличается и составляет $(3,71 \pm 1,15) \times 10^7$ и $(3,99 \pm 1,03) \times 10^7$ частиц/мл плазмы крови и $(7,66 \pm 0,7) \times 10^7$ и $(9,4 \pm 1,24) \times 10^7$ частиц/мл суммарной крови соответственно. Сравнительный анализ протеомных карт экзосомальных белков здоровых женщин и больных раком молочной железы, полученных с помощью двумерного электрофореза, позволил установить значимые различия в уровне экспрессии и наборе белков в норме и патологии.

Выводы. Полученные данные могут быть использованы для идентификации экзосомальных протеомных маркеров рака молочной железы, выделения опухолеспецифичных экзосом и диагностики данного онкологического заболевания.

Постеры

Возможности исследования галектина-3, Ki-67, убиквитина, HMGA-2 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в диагностике узловой патологии щитовидной железы

И.С. Березкина

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

Введение. Проблемой диагностики узловой патологии щитовидной железы (ЩЖ) является невозможность различить при традиционном цитологическом исследовании фолликулярную аденому, фолликулярный вариант папиллярного рака и фолликулярный рак ЩЖ (РЩЖ). Для этой цели апробировано несколько молекулярных маркеров, однако до сих пор не существует такого, который позволил бы проводить точную дооперационную верификацию РЩЖ.

Задачи исследования. Количественное измерение методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) мРНК маркеров-кандидатов высококодифференцированного РЩЖ (галектина-3, Ki-67, убиквитина, HMGA-2) в пунктируемом материале из узлов ЩЖ. Определение значимости метода ПЦР-РВ для диагностики злокачественных новообразований в ЩЖ на этапе проведения тонкоигольной аспирационной биопсии под контролем ультразвукового исследования (ТАБ-УЗИ).

Материалы и методы. В исследование включено 55 пациентов с клиническим диагнозом узлового/многоузлового зоба. Всем пациентам по показаниям была выполнена ТАБ-УЗИ. На пункционном материале дополнительно проводился количественный анализ мРНК галектина-3, Ki-67, убиквитина, HMGA-2 при помощи обратной транскрипции и ПЦР-РВ. Результаты представлены в виде Me (Q1–Q3). «Золотым стандартом» диагностики считалось гистологическое исследование (все пациенты были прооперированы).

Результаты. Исследовано 47 женщин и 8 мужчин. Средний возраст пациентов составил 52,1 года (от 23 до 82 лет). Распределение пациентов по окончательному гистологическому диагнозу: узловой зоб (коллоидный/пролиферирующий/паренхиматозный) — 17 случаев, аутоиммунный тиреоидит как самостоятельный процесс — 3 случая, фолликулярная аденома — 15, папиллярный рак — 20 случаев. Фолликулярный рак в нашей выборке не встретился. Найдены значимые различия в экспрес-

сии мРНК гена убиквитина между злокачественными и доброкачественными узловыми образованиями ЩЖ: 9,6 (5,1–26,4) и 7,0 (4,5–9,3) соответственно ($p = 0,013$); содержание же мРНК остальных генов значимо не различалось ($p > 0,05$). Значение мРНК убиквитина 8,24 обладало чувствительностью 68,4 % и специфичностью 68,6 % в диагностике высококодифференцированного рака на этапе проведения ТАБ-УЗИ. Выявлялся значимо низкий уровень мРНК галектина-3 и убиквитина при фолликулярной аденоме по сравнению с папиллярным раком.

Выводы. Количественный анализ мРНК гена убиквитина методом ПЦР-РВ в пункционном материале ТАБ-УЗИ позволяет выявить высококодифференцированный РЩЖ с чувствительностью 68,4 % и специфичностью 68,6 % ($p = 0,013$).

Исследование мРНК генов Ki-67, галектина-3, HMGA методом ПЦР-РВ не показало себя надежным методом для дифференциальной диагностики узловой патологии ЩЖ на предоперационном этапе.

Микрочастицы мочи как источник микроРНК для диагностики рака предстательной железы

О.Е. Брызгунова, Е.А. Лехнов, Т.Э. Скворцова, Е.С. Морозкин, А.Е. Григорьева, М.М. Зарипов, Е.И. Рябчикова, Ю.Б. Юрченко, П.П. Лактионов, В.В. Власов

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

ГБУЗ НО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер», Новосибирск;

Центр новых медицинских технологий ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск

Введение. Рак предстательной железы (РПЖ) является наиболее распространенной формой рака среди мужчин.

Поскольку USPSTF (United States Preventive Services Task Force) не рекомендует использовать простат-специфический антиген для диагностики РПЖ, разработка принципиально новых, высокоэффективных маркеров РПЖ является актуальной задачей.

Задачи исследования. Сравнительное исследование микровезикул бесклеточной фракции мочи и концентрации 4 микроРНК в этих микровезикулах и в осветленной моче здоровых доноров и больных РПЖ.

Материалы и методы. Микровезикулы мочи получали и исследовали, как описано ранее (Bryzgunova

et al., PLoS One 2016). РНК выделяли при помощи разработанных протоколов (Zaporozhchenko et al., Anal Biochem 2015; Lekchnov et al., Anal Biochem 2016).

Результаты. Диаметр микровезикул мочи варьирует от 20 до 230 нм. Доля частиц размером 100 нм и менее (экзосом) в моче здоровых доноров и больных РПЖ составляет 95 и 90 % соответственно. Концентрация белка в среднем составляет $12 \pm 0,7$ мг/мл мочи для суммарных микровезикул и $9 \pm 0,4$ мг/мл мочи для экзосом. Таким образом, 75 % белка микровезикул содержится во фракции экзосом. Концентрация ДНК в препаратах суммарных микровезикул и экзосом мочи не зависит от состояния пациента и составляет в среднем 18 ± 4 и $2,6 \pm 0,5$ пкг/мл мочи соответственно. Концентрация внеклеточной РНК в препаратах микровезикул мочи составляет не более 290 пг/мл и варьирует в зависимости от донора и протокола выделения. Обнаружено, что измерение концентрации микроРНК miR-19b во фракциях экзосом и суммарных микровезикул мочи (ROC-анализ, AUC 0,91/0,97) позволяет выявлять больных РПЖ с чувствительностью/специфичностью 95/75 и 93/100 % соответственно, в то время как при анализе концентрации этой микроРНК в супернатанте мочи после 400 и 17 000 г чувствительность/специфичность выявления больных РПЖ составляет 50/87 и 50/60 % соответственно.

Выводы. Микровезикулы мочи больных РПЖ являются ценным источником диагностически значимых микроРНК. Масштабный поиск и включение в диагностическую панель дополнительных микроРНК позволит увеличить чувствительность/специфичность анализа и устойчивость диагностической системы.

Спектр мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у пациенток с диагнозом рака молочной железы

Д.И. Водолажский, О.А. Богомолова, Ю.С. Шатова, М.И. Верескунова, Р.Г. Луганская, Л.П. Кучкина

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Генетическая предрасположенность является одним из факторов развития рака молочной железы (РМЖ). В настоящее время с наследственными формами РМЖ ассоциирован ряд генов, однако наибольшей пенетрантностью отличаются мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, частота и спектр полиморфизмов которых широки и имеют значительные особенности в этнических группах различных географических регионов.

Задачи исследования. Изучение спектра мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* среди пациенток с диагнозом РМЖ.

Материалы и методы. В исследование было включено 60 пациенток с установленным диагнозом РМЖ

и клиническими признаками наследственного РМЖ, проходивших лечение в стационаре РНИОИ. Методом пиросеквенирования (PyroMark Q 24) был проведен анализ 6 мутаций в локусах генов *BRCA1/2*: 185delAG, 300T>G (С61G), 2080delA, 4154delA, 5382insC, 6174delT, входящих в коммерческую панель («BRCA-скрин», ИнтерЛабСервис, Россия). ДНК для исследования получена из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции.

Результаты. Из всего проанализированного спектра мутаций было выявлено 2 типа: 5382 insC в экзоне 20 гена *BRCA1* (82 %) и 2 образца несли мутацию 300T>G в гене *BRCA1* (18 %). Генетических aberrаций в других локусах генов *BRCA1* и *BRCA2* в рамках нашего исследования не выявлено. Результаты проведенных нами исследований, а также других работ, выполненных в различных регионах России, свидетельствуют о том, что мутация 5382 insC является наиболее частой в генах риска наследственного РМЖ. Так, согласно данным исследований больных с наследственным РМЖ, проведенных в Москве и Центральном регионе России, частота мутаций составляет 27 %, в Кыргызстане – 18 %, в Западной Сибири – 16 %. В ряде стран Центральной Европы и Японии уровень мутаций в генах *BRCA1/2* в случаях наследственного РМЖ также не превышает 20 %.

Выводы. Полученные данные о частоте мутаций в генах *BRCA1/2* сопоставимы с результатами, полученными в различных регионах страны, и подтверждают роль founder-эффекта в Российской Федерации.

Влияние альтернативных форм MUC1 на уровень экспрессии фактора некроза опухоли и интерлейкина 32 в опухолевых очагах больных раком толстой кишки

Н.Н. Гурина, С.Г. Фомина, Д.В. Новиков, Т.С. Егорова, В.В. Новиков

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород

Введение. Муцин MUC1 – высокомолекулярный трансмембранный гликопротеид, преимущественно продуцируется эпителиальными клетками и относится к группе опухолеассоциированных антигенов. В норме MUC1 локализуется в апикальной мембране дифференцированных клеток цилиндрического эпителия, участвуя в защите поверхности клеток от внешних повреждающих воздействий. Известно, что увеличение продукции MUC1 и его аномальное распределение могут опосредовать продукцию провоспалительных медиаторов раковыми клетками.

Задачи исследования. Определение частот обнаружения альтернативных форм мРНК MUC1 и оценка их влияния на уровень экспрессии фактора некроза опухоли (ФНО) и интерлейкина 32 (ИЛ-32) в карциномах толстой кишки.

Материалы и методы. Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) исследовали частоту обнаружения альтернативных форм мРНК в опухолевых очагах больных раком толстой кишки ($n = 58$). Уровень экспрессии генов *MUC1*, *ИЛ-32*, *ФНО* определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Нормировку уровней экспрессии проводили относительно мРНК генов домашнего хозяйства: β -2-микроглобулина, тирозин-3-монооксигеназы, убиквитина С, гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы.

Результаты. Матричная РНК *MUC1* была обнаружена в 76 % (44/58) образцов опухолевых очагов больных раком толстой кишки. Частота обнаружения мРНК *ФНО* и *ИЛ-32* в опухолевых очагах больных раком толстой кишки составила 83 % (48/58) и 79 % (46/58) соответственно. В *MUC1*-позитивных образцах исследовали частоту обнаружения 9 вариантов сплайсинга мРНК *MUC1*. При раке толстой кишки мРНК изоформ группы MUC1/A-D наблюдалась в 34 % образцов (15/44), мРНК группы MUC1/X-Z выявлена в 9 % образцов (4/44), экспрессия мРНК MUC1-Rer регистрировалась в 39 % образцов (17/44), а мРНК MUC1-Seq детектировалась в 77 % исследованных образцов (34/44).

Выводы. При сравнении уровней мРНК *ИЛ-32* и *ФНО* в опухолевых очагах рака толстой кишки, содержащих разные альтернативные формы мРНК *MUC1*, показано, что присутствие изоформ мРНК *MUC1*, кодирующих белки с дополнительными аминокислотами в области tandemных повторов (MUC1/A-D), или изоформ мРНК с выпадением области, кодирующей tandemные повторы (MUC1/X-Z), ассоциировалось с более высоким уровнем мРНК *ИЛ-32* и низким уровнем мРНК *ФНО*. Представленные данные указывают на влияние изоформ мРНК, относящихся к группам MUC1/A-D и MUC1/X-Z, на экспрессию генов *ИЛ-32* и *ФНО* в опухолевых очагах больных раком толстой кишки.

Development SYBR green PCR for the copy number quantification of *HER2*-gene in breast and gastric tumors

D.A. Dalimova, Sh.U. Turdikulova

The Center for High Technology of Academy of Sciences of Uzbekistan, Tashkent

The human epidermal growth factor receptor 2 oncogene (ERBB2, HER2, or neu) encodes the type I receptor tyrosine kinase HER2. The *HER2* gene is amplified in approximately 15–20 % of breast and gastric cancers and gene amplification is closely linked to overexpression of the HER2

protein. A monoclonal antibody, Herceptin, has been developed against HER2/neu. Because of the clinical implication of HER2/neu amplification, many methods exist for quantification of HER2/neu. Traditional methods for detection include immunohistochemical staining, fluorescent in situ hybridization (FISH), and more recently, molecular methods.

The main objectives of this study was development the new, fast and effective polymerase chain reaction (PCR) quantification method for HER2 gene

Quantitative PCR methods for *HER2/neu* gene quantification were developed. Assay was developed using designed sequence-specific hybridization probes to detect a target (HER2/neu) and a reference gene (β -globin) simultaneously. The method was evaluated using 65 breast tumor and 56 gastric tumor samples. IHC and PCR results agreed for 106 of the subsequent 121 samples analyzed (88 % concordance). Fifteen discrepant samples were microdissected. After microdissection all fifteen were positive by PCR, thus resolving the discrepancy.

Real-time quantification and microdissection is useful clinically for HER2/neu quantification. Its ease of use and broad dynamic range allows screening for amplification of HER2/neu.

Оценка прогностической значимости экспрессии генов монорезистентности в опухоли больных немелкоклеточным раком легкого после неoadъювантной химиотерапии

И.В. Дерюшева, М.М. Цыганов, Е.О. Родионов, М.К. Ибрагимова, Н.В. Литвяков, С.В. Миллер

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. В настоящее время системная и, в частности, неoadъювантная химиотерапия (НХТ) все чаще применяется для лечения больных раком легкого. Существенную роль в формировании резистентности/чувствительности опухолевых клеток к отдельным химиопрепаратам играют гены монорезистентности, такие как *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3*, *TYMS*, *ABCC5*. Данные биомаркеры важны для использования в персонализации терапии при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ).

Задачи исследования. Оценка прогностической значимости уровня экспрессии генов монорезистентности у больных НМРЛ после НХТ.

Материалы и методы. Проанализированы результаты лечения 52 больных (IIA–IIIB), которые получали 2 курса НХТ по схеме винорелбин–карбоплатин. После НХТ пациентам проводилась операция в объеме пневмонэктомии или лобэктомии. Далее – 3 курса

адьювантной химиотерапии (АХТ) по схеме винорелбин – карбоплатин. Оценку экспрессии генов проводили в 52 парных образцах нормальной и опухолевой ткани, полученных при оперативном вмешательстве после НХТ (qPCR). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0.

Результаты. Показано, что при полном отсутствии в опухоли легкого после НХТ экспрессии гена *ERCC1* безрецидивная выживаемость составила 95 % против 42 % у пациентов при наличии любого уровня экспрессии данного гена больше 0. Низкий уровень экспрессии гена *RRM1* ($< 0,5$) сопряжен с высокими показателями выживаемости, тогда как высокий уровень является маркером плохого прогноза. Кроме этого, с показателями безрецидивной выживаемости был сопряжен паттерн экспрессии 3 генов: *RRM1*, *ABCC5* и *TYMS*. Установлено, что при сочетании повышенной экспрессии ($> 0,5$) любых 2 или всех генов показатели безрецидивной выживаемости составили 22 %.

Выводы. Получены данные о прогностической значимости экспрессии генов монорезистентности *ERCC1*, *TUBB3*, *RRM1*, *ABCC5* и *TYMS*, которые показывают перспективность исследования молекулярных маркеров в опухоли после химиотерапии в качестве прогностических факторов.

Исследование мРНК маммаглобина А в периферической крови больных раком молочной железы методом высокочувствительной цифровой капельной полимеразной цепной реакции

А.О. Довгаль, Г.Н. Александрович, Я.Ю. Киселева,
Т.М. Кулинич, Е.Л. Джикия

ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

Введение. На сегодняшний день существует неоднозначная оценка диагностической и прогностической значимости обнаружения тканеспецифичного маркера рака молочной железы (РМЖ) маммаглобина А в периферической крови. Использование максимально чувствительного современного метода ddPCR, способного выявлять единичные молекулы нуклеиновых кислот в образце, позволит на новом уровне оценить определение мРНК маммаглобина А как потенциального онкомаркера.

Задачи исследования. Оценка диагностической значимости экспрессии мРНК маммаглобина А (*MGB1*) методом цифровой капельной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ddPCR) в плазме крови пациенток с диагнозом РМЖ.

Материалы и методы. Исследование проведено на образцах плазмы крови 17 больных РМЖ, прошедших обследование в РНЦРР в мае – июле 2016 г. Нуклеиновая кислота выделялась наборами для выделения циркулирующей мРНК из плазмы на магнитных частицах Sileks MagNA по стандартному протоколу фирмы Sileks (Россия). Выделенная мРНК амплифицировалась в реакции обратной транскрипции с использованием реактивов фирмы «ДНК-Технология» (Россия). Количественную оценку мРНК маммаглобина А проводили на приборах фирмы Bio-Rad (США) QX100 DropletReader и QX100 DropletGenerator.

Результаты. Методом ddPCR в периферической крови пациенток с диагнозом РМЖ у 62 % обнаружена свободно циркулирующая мРНК маммаглобина А, что сопоставимо с данными, полученными нами ранее методом Nested PCR. Использование цифровой капельной ПЦР позволило выявить пациенток с единичными молекулами *MGB1* в плазме крови (минимальная выявленная концентрация 0,03 копии/мкл).

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о высокой чувствительности метода и потенциальной возможности использования его в клинической практике.

Экспериментальная модель энтерита при действии высоких доз 5-фторурацила

О.В. Калинина¹, А.А. Козлова¹, А.И. Павловская²,
В.Г. Згода³, Г.В. Порядин¹, А.А. Штиль²

¹ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

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

³ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии
им. В.Н. Ореховича», Москва

Введение. На протяжении десятилетий 5-фторурацил (5-ФУ) остается одним из ведущих препаратов для химиотерапии опухолей. Однако при длительном применении 5-ФУ и использовании высоких доз нередко возникает энтерит, что обуславливает отмену курса лечения, нарушает режим введения 5-ФУ и требует фармакологической коррекции.

Задачи исследования. Создание экспериментальной модели энтерита, вызванного 5-ФУ, для изучения патогенеза этого синдрома.

Материалы и методы. Исследования выполнены на мышцах-самцах C57BL6 (18–22 г): группа I – интактные; группа II – 5-ФУ внутривентриально (в/б) ежедневно в дозе 100 мг/кг в течение 5 дней с последующей отменой; группа III – 5-ФУ в/б ежедневно в дозе 500 мг/кг, 5 дней. По 6 животных групп II и III выводили из эксперимента на 2-е и 6-е сутки после введения 5-ФУ. Исследования тонкой и толстой кишки проводили с помощью световой микроскопии, протеомного

анализа и изучали экспрессию генов методом полимеразной цепной реакции.

Результаты. При применении 500 мг/кг отмечена 100 % летальность животных к 8–9-му дню после начала введения 5-ФУ. В дозе 100 мг/кг 5-ФУ вызывал уменьшение массы тела на 15–20 %, снижение мышечного тонуса, диарею; летальность 50 %. При аутопсии через 6 сут после начала введения препарата выявлено истончение слизистой оболочки тонкой и толстой кишки; при гистологическом исследовании – атрофия слизистой оболочки, нарушения структуры бокаловидных клеток и муцинового слоя, явления дисрегенерации эпителия, кистообразные расширения в толстой кишке. Уменьшение длины и толщины ворсин и глубины крипт, разрастание соединительной ткани. Среди клеток крипт отсутствуют фигуры митозов, наблюдается дискариоз, ядра светлые (преобладает эухроматин) с 1–2 ядрышками, что свидетельствует об их повышенной функциональной активности. Начальные проявления указанных нарушений обнаруживали уже через 2 сут после начала введения 5-ФУ. Протеомный анализ выявил резкие изменения количества многих белков в тонком и толстом отделах кишечника. Среди белков, количество которых увеличилось или уменьшилось в несколько раз, – структурные белки, транскрипционные факторы, регуляторы сигнальных каскадов, транспортеры ионов и глюкозы, что свидетельствует о глубокой перестройке эпителия кишечника, выраженности нарушений водно-электролитного баланса и кислотно-щелочного равновесия.

Выводы. Разработана модель энтерита при действии высоких доз 5-ФУ. Сходство проявлений экспериментального энтерита с клиническими симптомами позволяет считать модель адекватной. Модель дает возможность изучать молекулярные механизмы нарушений в кишечнике при применении 5-ФУ и исследовать возможности ограничения этого неблагоприятного синдрома.

Проявление SNP-мутаций в гене *EGFR* у пациентов различных гендерных и возрастных групп при аденокарциноме легкого

О.И. Кит, Д.И. Водолажский, Я.С. Енин, И.А. Лейман,
Ю.Н. Лазутин, Л.Ю. Владимирова

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России,
Ростов-на-Дону

Введение. Мутации в гене *EGFR* служат маркером эффективности проведения таргетной терапии рака легкого.

Задачи исследования. Изучение частоты соматических мутаций в гене *EGFR* при аденокарциноме легкого у пациентов различных гендерных и возрастных групп,

проживающих на территории Южного федерального округа.

Материалы и методы. В данное исследование включены 512 жителей Юга России (326 мужчин, 186 женщин), больных аденокарциномой легкого, получавших лечение в РНИОИ. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени детектировали 29 мутаций гена *EGFR*: T790M, делеции экзона 19, L858R, L861Q, G719X, S768I и инсерции в экзоне 20. ДНК для исследования получена из FFPE-блоков методом фенол-хлороформной экстракции. Исследование проведено с соблюдением принципов ICH GCP.

Результаты. Частота мутаций гена *EGFR* в объединенной выборке составила 26,1 %. При анализе данных пациентов обоих полов не обнаружено значимых ассоциаций между частотой мутантного типа гена *EGFR* и возрастом пациентов. Например, у пациентов моложе 60 лет мутации регистрировали с частотой 23,4 %, а у пациентов старше 60 лет – с частотой 29,1 % ($\chi^2 = 2,19$; $p = 0,14$). Без учета статуса курения частота встречаемости мутаций в гене *EGFR* среди пациентов женского пола составила 45,1 %, что в 3 раза выше по сравнению с мужчинами – 15,3 % ($\chi^2 = 7,39$; $p = 0,01$). При учете статуса курения данный показатель в группе некурящих женщин был равен 47,8 %, что в 2 раза больше, чем в группе курящих женщин – 23,8 % ($\chi^2 = 12,14$; $p = 0,0005$). В то же время у никогда не куривших мужчин мутации регистрировали в 19,0 % случаев, у куривших – в 12,8 %; различия в данном сравнении статистически незначимые ($\chi^2 = 2,22$; $p = 0,13$). Кроме того, в группе некурящих мужчин частота встречаемости мутантного типа гена *EGFR* была в 2 раза меньше, чем в группе курящих женщин ($p < 0,0000$).

Выводы. Частота соматических мутаций в гене *EGFR* существенно зависит от гендерных различий и статуса курения пациентов.

Применение российского анализатора размеров наночастиц Photocor в онкологических исследованиях и исследованиях биологических объектов

В.Н. Курьяков, А.Н. Баранов, И.К. Юдин, В.С. Ашихмин,
В.А. Дешабо, В.И. Косов, Д.И. Юдин

ООО «Фотокор», Москва;
физический факультет ФГБОУ ВО «МГУ
им. М.В. Ломоносова», Москва;

ФГБУН «Институт проблем нефти и газа РАН», Москва

Введение. В России, как и в большинстве развитых стран мира, отмечается тенденция к неуклонному росту заболеваемости злокачественными новообразованиями и смертности от них. Высокие показатели смертности в первую очередь обусловлены тем, что зна-

чительная часть больных обращаются за медицинской помощью с наличием запущенных (III–IV) стадий заболевания, когда возможности радикального лечения весьма ограничены.

Задачи исследования. Изучение результатов применения метода динамического рассеяния света (ДРС) в исследовании биологических жидкостей человека для диагностики онкологических заболеваний на ранних стадиях, анализ распределений частиц по размерам в плазме крови, поиск корреляций между измеряемыми величинами и наличием онкозаболеваний на различных стадиях.

Материалы и методы. В основе метода ДРС (или фотонной корреляционной спектроскопии, Dynamic Light Scatterin, DLS) лежит анализ спектра рассеянного лазерного излучения на броуновских частицах. Данный метод позволяет измерять размеры частиц в жидких средах в диапазоне от 0,5 нм до нескольких мкм. Помимо непосредственного измерения размера наночастиц, данный метод позволяет изучать такие физико-химические явления, как: фазовые переходы и критические явления в жидкостях, образование микроэмульсий и мицелл, процессы агрегации и устойчивость коллоидных систем, синтез наночастиц, микрореология субмикронных и наноразмерных структур в жидкостях.

Результаты. В работе представлены результаты применения метода ДРС для анализа распределения частиц по размерам в плазме крови. Приведены результаты измерений температуры денатурации белков, измерения размеров порфиринов, размеров наночастиц.

Выводы. Разработан и создан специальный быстродействующий коммерческий прибор, который позволяет измерять размеры наночастиц в биологических жидкостях. С использованием данного прибора проведены исследования возможности диагностики онкозаболеваний из анализа измерений плазмы крови человека методом ДРС.

Метод ДРС позволяет получить информацию о размерах частиц в жидких средах, в том числе в биологических жидкостях. Перспективным направлением исследований является применение данного метода для диагностики онкологических заболеваний и в исследованиях, связанных с онкологией. При помощи данного прибора можно измерять размеры наночастиц (магнитных, золотых и др.), которые используются для диагностики и лечения различных онкозаболеваний.

Изменение экспрессии мембранассоциированных белков и цитоплазматических изоформ актина при прогрессии опухолей толстой кишки человека

М.В. Новикова, В.А. Рыбко, Н.В. Хромова,
В.Б. Дугина, П.Б. Копнин

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;
НИИ физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «МГУ
им. М.В. Ломоносова», Москва

Введение. Для опухолевых клеток характерно нарушение экспрессии и локализации белков межклеточной адгезии E-кадгерина и β -катенина вследствие произошедшего в них эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Повышенная подвижность таких клеток связана с реорганизацией актинового цитоскелета, который в немых клетках представлен в основном двумя функционально различными цитоплазматическими изоформами — β и γ . Ранее нами показано, что смещение соотношения актинов за счет уменьшения доли β -актина может приводить к запуску ЭМП и усилению злокачественных характеристик трансформированных клеток.

Задачи исследования. Выявление корреляций между клиническими характеристиками, уровнем риска прогрессии и рецидивирования аденокарцином толстой кишки (АТК) человека и опухолевыми маркерами, ассоциированными с ЭМП.

Материалы и методы. В исследование было включено 36 образцов АТК и 5 отдаленных метастазов. Данные образцы использованы в виде формалинфиксированного парафинового материала. Срезы инкубировали с антителами к основным маркерам ЭМП и изоформам актина, вторичными антителами, мечеными различными флуорохромами, затем проводили математический анализ интенсивности флуоресценции полученных при микроскопии изображений.

Результаты. В опухолевых клетках по сравнению с нормальной тканью толстой кишки человека наблюдалось слабое диффузное окрашивание E-кадгерина в зонах межклеточных контактов. Выраженность таких отклонений увеличивалась с течением опухолевой прогрессии и достигала 62,5 % в низкодифференцированных опухолях G₃. Снижение мембранной окраски и ядерная локализация β -катенина детектировались в умеренно-дифференцированных опухолях G₂ и низкодифференцированных опухолях G₃. Увеличение количества γ -актина наблюдалось в 31 % образцов опухолей, которые в основном относились к IV стадии заболевания. Снижение количества β -актина (в среднем на 40 %) отмечалось в 88 % исследованных опухолей.

Меньшее количество изменений в экспрессии и локализации изучаемых маркеров было выявлено в отдаленных метастазах, что может свидетельствовать о ЭМП, часто наблюдаемом при метастазировании.

Выводы. Полная или частичная утрата экспрессии E-кадгерина и реорганизация β -катенина характеризуют поздние стадии опухолевой прогрессии АТК. Гиперэкспрессия γ -актина и снижение экспрессии β -актина ассоциированы с распространением и низким дифференцировочным статусом опухоли, при этом β -актин может рассматриваться в качестве нового диагностического маркера при анализе опухолевой прогрессии АТК человека.

Влияние статуса гена *BRAF* на выбор тактики хирургического лечения высококодифференцированного рака щитовидной железы

А.П. Поляков, Н.Н. Волченко, Е.Н. Славнова,
А.В. Кудрявцева, М.В. Рагушный, М.М. Филошин,
И.В. Ребрикова, П.А. Никифорович

ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» – филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, Москва

Введение. Папиллярный рак щитовидной железы (ПРЩЖ) составляет 80 % высококодифференцированного рака щитовидной железы (ВДРЩЖ). Мутация гена *BRAF(V600E)* является одним из самых распространенных прогностических факторов ПРЩЖ. Различные исследования описывают различную степень корреляции между *BRAF(V600E)* и другими прогностическими факторами ВДРЩЖ.

Задачи исследования. Выявить наличие взаимосвязи между ПРЩЖ, включая прогностические факторы, и мутацией *BRAF(V600E)* для определения дальнейшего объема хирургического лечения пациентов с ПРЩЖ.

Материалы и методы. В проспективное исследование было включено 60 пациентов с ПРЩЖ, лечившихся в МНИОИ им. П.А. Герцена в период 2014–2016 гг. Пациенты отбирались по данным пункционной тонкоигльной аспирационной биопсии и результатам полимеразной цепной реакции. Было выделено 2 группы: 1-я – с наличием мутации *BRAF(V600E)* – 45 пациентов, 2-я – с отсутствием мутации *BRAF(V600E)* – 15 пациентов. В послеоперационном периоде проводилась оценка следующих прогностических факторов: гистологический подтип ПРЩЖ, инвазия/прорастание опухоли в капсулу щитовидной железы, мультицентричность, наличие метастазирования в регионарные лимфатические узлы и наличие отдаленных метастазов, стадия и TNM. Статистическую обработку проводили с помощью программы Graphpad Prism.

Результаты. Папиллярный подтип – 40 %, фолликулярный подтип – 60 % в обеих когортах. Инвазия опухоли в капсулу щитовидной железы: в 1-й группе – 88 %, во 2-й – 40 %; прорастание капсулы щитовидной железы: в 1-й группе – 26 %, во 2-й – 10 %; мультицентричность: в 1-й группе – 20 %, во 2-й – 10 %. Микрокарциномы (0,3–1 см): в 1-й группе – 57 %, во 2-й – 60 %, метастазирование в регионарные лимфатические узлы: в 1-й группе – 40 %, во 2-й – 30 %. В 1-й группе – 51 % случаев с pT1 с инвазией в капсулу без выхода за ее пределы. У 23 % пациентов после оперативного лечения по результатам планового гистологического исследования отмечено изменение стадии сT1–2 до pT3. Отдаленные метастазы в 1-й группе выявлены в 5 %, во 2-й – в 10 % наблюдений. Выявлена связь мутации с инвазией в капсулу щитовидной железы ($p < 0,05$), тогда как мультицентричность и наличие метастазов в регионарные лимфатические узлы данной корреляции не продемонстрировали ($p > 0,05$).

Выводы. Положительная мутация гена *BRAF* коррелирует с инвазией в капсулу щитовидной железы, в этом случае тактика лечения должна быть изменена на более агрессивное хирургическое лечение пациентов с папиллярной формой рака щитовидной железы. Требуется дальнейшие исследования для уточнения данных.

Ингибиторы аутофагии позволяют преодолевать резистентность к вемурафенибу у B-RAF-мутированных клеточных линий меланомы *in vitro*

О.О. Рябая, А.Н. Иншаков, А.А. Малышева, Д.А. Хоченков
ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Создание таргетных препаратов, направленных на блокаду мутантного белка B-RAF, позволило увеличить выживаемость пациентов с B-RAF-мутированной меланомой кожи (МК). Однако у многих пациентов развивается резистентность к терапии, что требует поиска новых тактик и комбинаций лечения. В последние десятилетия активно изучается процесс аутофагии в опухолях, представляющий собой способность клеток утилизировать собственные белки, органеллы, макромолекулы в целях сохранения жизнедеятельности в неблагоприятных условиях.

Задачи исследования. Изучение антипролиферативного и цитотоксического действия комбинированной терапии вемурафенибом с ингибиторами аутофагии – хлорокином (CQ) и LY-294002 (LY) – на клеточных линиях МК.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 2 B-RAF-мутированных клеточных линиях МК,

полученных от пациентов РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Эффективность действия вемурафениба с CQ или LY определяли МТТ-тестом. Количественным критерием цитотоксичности служил индекс IC50. Изменение экспрессии LC3B исследовали иммуноцитохимически и вестерн-блоттингом. Уровень экспрессии мРНК генов *Beclin 1* и *LC3B* оценивали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, количество апоптотических клеток – цитофлуориметрически методом двойного окрашивания. Клеточный цикл анализировали методом проточной цитометрии.

Результаты. Преинкубация клеток с CQ (20 мкМ) и LY (5 мкМ) обладает антипролиферативным действием и приводит к увеличению цитотоксичности вемурафениба при 144-часовой коинкубации на 15–20 % у обеих линий относительно вемурафениба. Анализ уровня мРНК генов *Beclin 1* и *LC3B* показал, что вемурафениб индуцирует процесс аутофагии в клетках МК. Данные подтверждены иммуноцитохимически: тера-

пия вемурафенибом приводила к увеличению пунктата белка LC3B на аутофагосомах, а также повышенной экспрессии LC3B и *Beclin 1* по сравнению с контролем. При комбинированной терапии отмечали еще большее увеличение экспрессии LC3B, а также активацию апоптоза. Показано, что и LY, и CQ в комбинации с вемурафенибом синергично увеличивали арест клеточного цикла, приводя к накоплению популяции G0/G1 в обеих B-RAFV600-линиях.

Выводы. Процесс аутофагии является необходимым для поддержания клетками энергетического баланса, и его инактивация на различных этапах может быть новой перспективной мишенью в качестве адъювантной терапии при B-RAF-мутированной МК. Мы показали, что комбинированное действие вемурафениба с CQ или LY приводило к усилению цитотоксичности вемурафениба. Планируются исследования опытных комбинаций *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 14-35-00107 от 17.09.2014).

Возможности технологии секвенирования «нового поколения» (NGS) для анализа биологических образцов с низким содержанием мутантной ДНК

Е.Н. Тельшева, Н.Н. Новицкая, Г.П. Снигирева

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»
Минздрава России, Москва

Введение. Свободно циркулирующая ДНК (сцДНК) плазмы крови все чаще используется в качестве малоинвазивного метода диагностики, мониторинга и прогноза течения заболевания у пациентов с различными формами рака. Такие исследования в отличие от биопсии менее травматичны и гораздо лучше подходят для оценки состояния пациента в динамике, сохраняя при этом достаточно высокую информативность. В последнее время для анализа сцДНК используется секвенирование «нового поколения» (NGS), которое позволяет точно определить клинически значимые мутации даже при малом количестве исходного материала.

Задачи исследования. Оценить возможности метода NGS для определения клинически значимых мутаций в сцДНК плазмы крови у онкологических больных.

Материалы и методы. Проанализированы образцы сцДНК, собранные до операции и на 5-й день после хирургического лечения у 20 пациентов с диагнозом колоректального рака, у которых были выявлены мутации в генах *KRAS* и *BRAF* в тканях первичной опухоли. Поиск мутаций в образцах проводили методом NGS на 2 платформах: секвенатор MiSeq фирмы Illumina, набор для подготовки библиотек GeneRead DNASeq Targeted Panel v2 Human Colorectal Cancer (Qiagen, США); секвенатор Ion Torrent PGM, набор для подготовки библиотек Ion Ampliseq Cancer HotSpot Panel (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты. При исследовании образцов сцДНК плазмы крови только в 60 % случаев были подтверждены мутации в генах *KRAS* и *BRAF*, обнаруженные ранее в ткани первичной опухоли. В оставшихся образцах мутации не выявлены.

Выводы. Остается актуальным обсуждение возможных причин, которые могут оказывать влияние на расхождения результатов при исследовании ДНК первичной опухоли и сцДНК плазмы крови, включая стадию заболевания и особенности его течения, а также методические аспекты, касающиеся выделения ДНК из плазмы крови и особенностей подготовки библиотек.

Корреляционная зависимость экспрессии белка BRCA1, маркера репарации ДНК и рецепторов стероидных гормонов, маркеров пролиферации в ткани рака молочной железы

Е.А. Шестакова, Е.А. Дудко, А.Н. Гришанина, И.Г. Воробьева,
Н.О. Вихлянцева, С.Д. Коломийцев, Т.А. Богуш

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

Введение. Супрессор опухолей BRCA1 участвует в репарации повреждений ДНК. Нарушение функции BRCA1 приводит к развитию ряда онкологических заболеваний, при этом BRCA1-ассоциированный рак развивается в основном в эстрогензависимых тканях организма.

Задачи исследования. В целях клинической оценки экспериментальных данных о взаиморегуляции экспрессии BRCA1 и эстрогеновых рецепторов (ЭР) α проведен сравнительный анализ экспрессии BRCA1, ЭР α и других стероидных рецепторов в ткани рака молочной железы (РМЖ). Для выявления прогностической значимости экспрессии BRCA1 проведена сравнительная оценка уровня маркера в ткани РМЖ в группах с благоприятным и неблагоприятным прогнозом по статусу ЭР α .

Материалы и методы. Количественная оценка экспрессии BRCA1, ЭР α , ЭР β и прогестероновых рецепторов (ПР) проведена в 50 хирургических образцах РМЖ с использованием иммунофлуоресцентного анализа, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией. В работе использованы первичные антитела к BRCA1 (SD118, Calbiochem), ЭР β (14C8, Abcam), ПР (M3569, DAKO), ЭР α (SP-1, Abcam) и вторичные – DyLight650 (ab98729) и DyLight650 (ab98510). Уровень экспрессии маркеров анализировали с помощью программы FlowJo 10.0 и статистического метода Колмогорова–Смирнова.

Результаты. Продемонстрирована прямая умеренная и достоверная корреляционная связь уровня экспрессии BRCA1 и ЭР α (критерий Спирмена, $r = 0,44$; $p = 0,001$), сопровождавшаяся прямой умеренной и достоверной корреляцией экспрессии ЭР α и ЭР β ($r = 0,28$; $p = 0,05$) в ткани РМЖ.

Найдена прямая умеренная и достоверная корреляционная связь уровня экспрессии BRCA1 и ПР ($r = 0,41$; $p = 0,02$).

Не обнаружено достоверной корреляционной связи экспрессии BRCA1 и ЭР β .

Выявлена корреляция сниженного уровня экспрессии BRCA1 с отрицательным статусом ЭР α в опухоли: в 80 % случаев уровень экспрессии BRCA1 в ЭР α -отрицательных опухолях был ниже медианы уровня экспрессии BRCA1 по всей группе включенных в исследование больных.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о прямой корреляционной связи экспрессии BRCA1 с ЭРа и ПР, а также ЭРа с ЭРβ, что проливает свет на возможные причины тканевой специфичности BRCA1-ассоциированных опухолей.

Повышение частоты случаев сниженного уровня BRCA1 в прогностически неблагоприятной группе пациенток с ЭРа-отрицательным РМЖ свидетельствует в пользу возможной прогностически неблагоприятной значимости пониженного уровня экспрессии BRCA1 в опухолевой ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 15-04-06991_а, № 16-34-01049_мол_а) и гранта Президента РФ № МК-7709.2016.7.

Анализ динамики экспрессии генов *HER2-neu* и *BIRC5* в циркулирующих опухолевых клетках при раке молочной железы на фоне терапии трастузумабом

Е.А. Шляхтунов

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск

Введение. Доказанная эффективная анти-HER2-терапия трастузумабом является оптимальным методом лечения больных раком молочной железы (РМЖ) с гиперэкспрессией HER2-neu. Однако к настоящему времени эффективность терапии в динамике определить сложно. Экспрессия сурвивина (BIRC5) может служить индикатором агрессивности опухолевого процесса.

Задачи исследования. Выявление корреляции между эффективностью терапии трастузумабом и экспрессией генов *HER2-neu* и *BIRC5* в циркулирующих опухолевых клетках (ЦОК) при РМЖ.

Материалы и методы. В исследование включено 46 пациенток. Во всех 46 случаях имела место подтвержденная иммуногистохимическим (ИГХ) или FISH-методом гиперэкспрессия HER2-neu. Также определена экспрессия генов *HER2-neu* и *BIRC5* в нативной опухолевой ткани методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Кроме того, в каждом случае проводили выделение ЦОК из образцов периферической крови и определение экспрессии вышеназванных генов. Всем женщинам проводили системную терапию трастузумабом в соответствующем режиме. Эффективность терапии оценивали путем экспрессии генов *HER2-neu* и *BIRC5* в ЦОК, выделенных из периферической крови пациенток.

Результаты. В первичной карциноме молочной железы определялась высокая экспрессия гена *HER2-neu* во всех 46 образцах. Экспрессия гена *BIRC5* определялась в 26 (57 %) образцах. В ЦОК в 34 (74 %) слу-

чаях определялась высокая экспрессия гена *HER2-neu* со средним значением $1,40 \pm 0,49$. У 30 (65 %) женщин в ЦОК определялась экспрессия гена *BIRC5* со средним значением $0,90 \pm 0,19$.

Уже через 1 мес от начала терапии трастузумабом в адъювантном режиме у пациенток отмечали динамическое снижение экспрессии гена *HER2-neu* в ЦОК. Достоверное снижение уровня экспрессии рецептора эпидермального фактора роста в ЦОК наблюдалось у 18 пациенток, что составило 53 % из числа тех, у кого имела место гиперэкспрессия *HER2-neu* в ЦОК, и 39 % от числа всех женщин с гиперэкспрессией *Her2-neu* в первичной опухолевой ткани по данным ИГХ-/FISH-анализа.

Наибольшее снижение экспрессии гена *BIRC5* в ЦОК наблюдалось при применении комплексной терапии РМЖ – трастузумаба и полихимиотерапии. Однако следует отметить, что у 16 пациенток (53 % от числа тех, у кого была экспрессия *BIRC5*, и 35 % от числа всех пациенток) на фоне терапии всегда определялась экспрессия гена сурвивина. У 14 пациенток (47 % от числа пациенток с экспрессией *BIRC5*) экспрессия антиапоптотического гена не определялась.

Выводы. Исследование доказывает эффективность методики контроля таргетной терапии трастузумабом путем оценки экспрессии генов *HER2-neu* и *BIRC5* в ЦОК.

Дизайн таргетной панели для диагностики рака щитовидной железы методом высокопроизводительного секвенирования

В.Д. Якушина, Л.В. Лернер, А.В. Лавров

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва; ООО «ПреМед», Научно-клинический центр «ПреМед – Европейские технологии», Москва

Введение. Существующий в настоящее время подход к диагностике рака щитовидной железы, основанный на цитологическом исследовании, обладает недостаточно высокой точностью и в 20–30 % случаев не позволяет установить доброкачественный или злокачественный характер узловых изменений щитовидной железы.

Задачи исследования. Дизайн таргетной панели для диагностики рака щитовидной железы по материалу тонкоигольной аспирационной биопсии методом высокопроизводительного секвенирования.

Результаты. Список диагностически значимых мутаций был сформирован по результатам анализа данных литературы и базы данных COSMIC. Для включения в панель были отобраны 456 соматических мутаций (в 25 генах), 3 мутации типа CNV (SCNA-22q-del, 9q21.3-q32 del, 1q gain), 23 генные перестройки.

Дизайн праймеров осуществляли инструментом AmpliSeq Designer версии 5.4.1 по референсному геному GRCh37, длина ампликона была задана в диапазоне 125–375 п. н. Для детекции выбранных CNV на основе оценки глубины покрытия в дизайн добавлено 20 дополнительных ампликонов для каждого CNV. Для оценки дизайна использовали инструменты IGV (Integrative Genomic Viewer) и UCSC Genome Browser. Оптимизация дизайна включила объединение кластеров мутаций, удаление лишних ампликонов в протяженной делеции гена *P TEN*, перемещение таргетных регионов для оптимального расположения ампликонов, включение в дизайн гена *RET* в виде таргетных регионов, покрывающих экзоны, 3' UTR и 5' UTR-области. В ре-

зультате был получен дизайн панели праймеров со следующими характеристиками: количество пар праймеров – 221, количество пулов праймеров – 2, покрытие отобранных мутаций – 99,59 %.

В специализированном разделе AmpliSeq Designer – RNA Gene Fusion designs был создан дизайн пула праймеров, обеспечивающий идентификацию отобранных 23 генных перестроек в материале РНК.

Выводы. Выполнен дизайн таргетной панели, позволяющий детектировать мутации, ожидаемые, по разным оценкам, в 90–95 % случаев рака щитовидной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (грант № 442ГС2/9119).

Тезисы

Исследование эстроген-негативных форм рака молочной железы

А.А. Абдувалиев¹, А.Х. Рахманов¹, F.W. Wang²

¹Ташкентская медицинская академия, Ташкент;

²Chengdu Institute of Biology,
Chinese Academy of Sciences, Chengdu

Введение. Эстроген-негативный фенотип рака молочной железы (РМЖ) характеризуется высокой скоростью развития и низкой эффективностью терапии.

Задачи исследования. Верификация, выделение и систематизация эстроген-негативных форм РМЖ.

Материалы и методы. Для определения экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону использовали метод иммуногистохимической визуализации.

Результаты. В отобранном для исследования опухолевом материале ($n = 48$) проведено определение экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону на поверхности опухолевых клеток методом иммуногистохимической визуализации. В $66,66 \pm 6,80$ % исследованных опухолевых образцов наблюдалась положительная экспрессия рецепторов к эстрогенам (от 2+ до 3+ по 4-балльной шкале учета иммуногистохимической реакции), в $33,4 \pm 6,80$ % образцов экспрессия рецепторов к эстрогенам отсутствовала.

При эстроген-негативных формах РМЖ чаще всего выявлялась стадия T1N0M0 – в $37,5 \pm 12,1$ % наблюдений, тогда как при эстроген-положительном фенотипе только в $9,3 \pm 5,15$ %. Наиболее часто встречающимся морфологическим типом опухоли являлся инфильтрирующий рак, четверть исследованных случаев составил протоковый рак. Таким образом, РМЖ с отсутствием экспрессии рецепторов к эстрогенам в большинстве наблюдений диагностируется на ранних стадиях развития заболевания, однако низкоэффективная терапия без учета фенотипических особенностей раковых клеток не позволяет добиться хороших исходов заболевания.

Выводы. Исследования показали более низкие показатели общей и безрецидивной выживаемости в подгруппе РМЖ с эстроген-негативным фенотипом по сравнению с эстроген-положительным, а определение молекулярных характеристик эстроген-негативных форм РМЖ помогает лучше понять патофизиологию болезни и разработать более эффективные методы лечения, в том числе создавая препараты нового поколения с использованием компонентов из природного сырья.

IL-16 и VEGF в сыворотке крови при новообразованиях костей

А.А. Алферов, И.В. Бабкина, А.В. Бондарев, М.Ю. Щупак,
А.И. Батырев, А.Н. Махсон, М.Д. Алиев

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;
ГМУЗ г. Москвы «Московская городская онкологическая больница
№ 62 Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

Введение. В последнее десятилетие появились неопровержимые факты роли воспаления и провоспалительных цитокинов в онкологическом процессе и среди них IL-16, который обладает также способностью стимулировать экспрессию факторов неоангиогенеза.

Задачи исследования. Определение содержания IL-16 и VEGF в сыворотке крови больных саркомами костей, анализ их взаимосвязи с клинико-морфологическими характеристиками опухоли и прогнозом.

Материалы и методы. Обследовали 138 больных с опухолями костей в возрасте от 14 до 50 лет. Доброкачественных опухолей выявлено 10, пограничных (гигантоклеточная опухоль кости) – 22, злокачественных – 106. Злокачественные опухоли были представлены остеогенной саркомой – 45 (типичная – 35, паростальная – 6, периостальная – 4), хондросаркомой – 24, саркомой Юинга – 27, злокачественной фиброзной гистиоцитомой – 7, хордомой – 3. Использовали метод иммуноферментного анализа для определения сывороточных уровней IL-16 (Biosource, США) и концентрации VEGF (R&D, США).

Результаты. IL-16 выявлен в сыворотке крови у 93 % пациентов с опухолями костей. Не обнаружено связи уровней IL-16 с гистологическим строением и максимальным размером опухоли. Показатели общей 3- и 5-летней выживаемости больных саркомами костей при содержании IL-16 в сыворотке крови $> 33,0$ пг/мл были значительно ниже, чем у пациентов с уровнями IL-16 $< 33,0$ пг/мл. При остеосаркоме общая 5-летняя выживаемость у пациентов с высоким содержанием IL-16 была в 1,6 раза, при саркоме Юинга – в 1,7 раза, при хондросаркоме – в 1,8 раза ниже, чем у пациентов с содержанием IL-16 в сыворотке крови $< 33,0$ пг/мл. У больных саркомами костей концентрация VEGF в сыворотке крови была значительно выше, чем при пограничных и доброкачественных опухолях.

Выводы. Частота обнаружения IL-16 в сыворотке крови при новообразованиях костей составила 93 %, достоверных различий в уровнях IL-16 с учетом гистологического строения новообразования не выявлено. Наиболее низкие показатели общей 3- и 5-летней выживаемости отмечены среди больных саркомами костей при содержании IL-16 в сыворотке крови $> 33,0$ пг/мл.

У больных саркомами костей концентрация VEGF в сыворотке крови была значительно выше, чем при пограничных и доброкачественных опухолях. Обсуждается роль IL-16 и VEGF в клиническом течении и прогнозе сарком костей.

Анализ экспрессионных профилей генов и развитие диагностики светлоклеточного почечно-клеточного рака

Н.В. Апанович, М.В. Петерс, А.А. Коротаева,
П.В. Апанович, А.С. Маркова, Б.Ш. Камолов,
В.Б. Матвеев, А.В. Карпухин

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва;
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Рак почки не проявляется симптоматически до поздней стадии заболевания. Более 50 % случаев рака почки выявляется случайно. В связи с этим актуально развитие методов, позволяющих быстро и эффективно диагностировать опухоль. Молекулярно-генетической основой таких методов может служить экспрессия генов в злокачественной опухоли.

Материалы и методы. В работе проведено изучение уровней экспрессии 21 гена в 45 образцах опухоли светлоклеточного почечно-клеточного рака (скПКР) в сравнении с нормальной почечной тканью с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. При анализе полученных результатов были выбраны 5 генов (*CA9*, *NDUFA4L2*, *HIG2*, *EGLN3*, *STC2*), демонстрирующих наибольшую частоту повышенной экспрессии на I–III стадиях развития рака почки. При одновременном анализе экспрессии генов *CA9* и *HIG2* чувствительность выявления скПКР составила 96,8 % при специфичности 92,9 %. Существенно, что в случае отрицательного результата теста вероятность отсутствия скПКР составляет 96,3 %. Характеристики экспрессии гена *STC2* позволяют с чувствительностью 83,3 % и специфичностью 91,7 % детектировать иные по отношению к светлоклеточному типу ПКР. Пониженная экспрессия гена *STC2* позволяет дифференцировать светлоклеточный и другие типы рака ($p = 0,0002$). Анализ панели из 3 генов – *CA9*, *HIG2* и *STC2* – показал, что при скПКР одновременно повышенная экспрессия генов *CA9* или *HIG2* и пониженная экспрессия *STC2* наблюдается в 3 % случаев, при других типах ПКР был отмечен 1 такой случай. Следовательно, экспрессионная панель из генов *CA9*, *HIG2* и *STC2* с высокой достоверностью позволяет диагностировать скПКР, отличая его от других типов ПКР. В целом, хотя разработанная панель ориентирована на диагностику скПКР, она позволяет выявлять и другие типы ПКР.

Выводы. Таким образом, разработана новая панель, включающая гены *CA9*, *HIG2* и *STC2*, которая позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью дифференциально диагностировать ранний скПКР на основе определения уровня мРНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Сравнительная оценка моделей определения фенотипа опухоли с использованием расширенной панели экспрессии генов и панели классических маркеров при раке молочной железы

В.К. Боженко, М.В. Захаренко, И.Д. Троценко,
Е.А. Кудинова, Н.В. Мельникова, В.А. Солодкий

ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

Введение. Определение фенотипа рака молочной железы (РМЖ) имеет большое клиническое значение. Использование классических маркеров (KI67, рецепторы эстрогена, прогестерона, HER2/neu) не является достаточным для прецизионного фенотипирования опухоли.

Задачи исследования. Расширение и оптимизация панели маркеров для получения клинически значимых результатов в целях более точной оценки фенотипа РМЖ.

Материалы и методы. Нами была выполнена сравнительная оценка моделей определения фенотипа опухоли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием расширенной панели из 19 генов (контроль пролиферации: *KI67*, *STK15*, *CCNB1*, *CCND*, *MYC*, *MIBL2*, *P16ink4A*, *PTEN*; контроль апоптоза: *BIRC5*, *BCL2*, *BAG*, *TERT*; дифференцировка/рецепторы: *ESR1*, *PGR*, *HER2/neu*, *GRB7*, *MGB1*; межклеточные взаимодействия: *MMP11*, *CTSL2*) и генов, кодирующих классические иммуногистохимические (ИГХ) маркеры (*KI67*, *ESR1*, *PGR* и *HER2/neu*), в 359 образцах парафинизированной ткани РМЖ. Для 318 больных РМЖ I–II стадии была выполнена оценка 10-летней безрецидивной выживаемости.

Результаты. С использованием кластерного анализа уровня экспрессии 19 генов (расширенная панель) исследуемые образцы были объединены в 5 фенотипов, соответствующих «классическим», результаты классификации были подтверждены линейным дискриминантным анализом. Наиболее благоприятный прогноз (на основании показателя безрецидивной выживаемости) отмечен для люминального фенотипа А (10,2 %; $p < 0,001$). Мы также провели проспективные исследования по верификации молекулярного фенотипа ИГХ-методом и ПЦР-методом в 83 образцах РМЖ. Результаты продемонстрировали низкое соответствие

классификации, полученной на основании расширенной панели с использованием ПЦР-метода и полученной стандартным ИГХ-методом (совпадение составило 61,7 %).

Выводы. Уровень экспрессии генов, кодирующих классические ИГХ-маркеры, хотя и отражает закономерности отличия фенотипов, тем не менее не является достаточным для прецизионной верификации. Молекулярный фенотип, определяемый методом анализа экспрессии мРНК с применением ПЦР в реальном времени с использованием панели из 19 генов, более адекватно отражает клинические отличия молекулярных подтипов (уровень безрецидивной выживаемости в группах). Полученные результаты совпадают с имеющимися в литературе данными о недостаточности используемой в настоящее время методики определения молекулярного фенотипа на основе ИГХ-метода («суррогатный метод») и необходимости перехода на расширенные панели с применением количественных молекулярно-биологических методов.

Комплексная экспрессия раковых тестикулярных антигенов в клетках HeLa

Д.И. Водолажский, Х.А. Могушкова, А.А. Пушкин,
И.В. Межевова, Н.Н. Тимошкина

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Раковые тестикулярные антигены (РТА) в силу топически ограниченного характера их экспрессии, преимущественно в малигнизированных тканях, могут эффективно распознаваться иммунной системой пациентов с онкологическими заболеваниями. Это свойство предоставляет возможность использования РТА в качестве вакцин, активно стимулирующих специфичный иммунный противоопухолевый ответ.

Задачи исследования. Изучение в модельных условиях в клетках HeLa спектра экспрессии РТА.

Материалы и методы. В модельном эксперименте использовали культуру перевиваемых адгезионных клеток HeLa (рак шейки матки), выращенную в стандартных условиях. Определение относительной экспрессии 12 генетических локусов (*GAGE4*, *CTAG1B*, *BAGE*, *MAGEA1*, *MAGEB2*, *MAGEA3*, *GAGE1*, *MAGEC1*, *MAGEB1*, *MAGEA4*, *MAGEA2*, *GAGE3*) проводили методом Real-Time qPCR (RT-qPCR). Суммарную РНК из тканей выделяли по методу P. Chomczynski и N. Sacchi (2006). Для синтеза библиотеки кДНК использовали набор реагентов «РЕВЕРТА-Л» («Интерлабсервис», Россия). Праймеры разработали с использованием базы данных NCBI GenBank. RT-qPCR-амплификацию проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, USA). Генетический локус GAPDH использовали в качестве референтного.

Результаты. Как следует из наших данных, все исследованные локусы по уровням транскрипционной активности разделились на подгруппы: высокоэкспрессивный локус – *GAGE4*; ограниченно-экспрессивные локусы – *CTAG1B*, *BAGE*, *MAGEA1*, *MAGEB2*, *MAGEA3*; низкоэкспрессивные локусы – *GAGE1*, *MAGEC1*, *MAGEB1*, *MAGEA*, *MAGEA2*; ультранизкоэкспрессивный локус – *GAGE3*.

Уровень относительной экспрессии РТА-генов выявил высокую вариабельность, достигающую диапазона почти 100-кратного размаха. Однако принадлежность к одному семейству не являлась гарантией однотипных показателей экспрессии исследованных локусов. Для семейства *MAGE* это предположение в рамках данного исследования подтвердилось: локусы *MAGEA1*, *MAGEB2* и *MAGEA3* проявляли идентичные уровни транскрипционной активности.

Выводы. Полученные данные позволяют более эффективно использовать линии перевиваемых клеточных культур, использующихся для антигенной нагрузки дендритно-клеточных вакцин, применяемых для лечения различных онкологических заболеваний.

Нарушение копийности генов EGFR и CCND1 при раке ротовой полости до и после лучевой терапии

Е.В. Голуб, В.В. Полькин, Г.Ф. Михайлова, Т.Г. Шкаврова,
В.В. Цепенко, В.С. Медведев, П.А. Исаев

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, Обнинск

Введение. В настоящее время остается актуальным решение задачи эффективного лечения и вероятности прогнозирования рецидива рака ротовой полости. В патогенезе данного заболевания несомненно участие генов *EGFR* и *CCND1*, нарушение копийности которых способствует аномальной пролиферации и предотвращает апоптоз. Можно предположить, что одновременная оценка генетического статуса *CCND1* и *EGFR* позволит выделить пациентов с повышенным риском рецидива и плохим прогнозом.

Задачи исследования. Изучение частоты клеток с нарушенной копийностью генов *EGFR* и *CCND1* как прогностических маркеров рецидива.

Материалы и методы. Исследовали частоту клеток с нарушением числа копий генов *EGFR* и *CCND1* в мазках слизистой оболочки ротовой полости 9 пациентов с различной стадией плоскоклеточного рака ротовой полости и разной локализацией опухоли до лечения и после суммарной очаговой дозы 19,0–28,8 Гр. У 5 пациентов в качестве внутреннего контроля взяты мазки слизистой оболочки ротовой полости со стороны, противоположной опухоли. Использовали метод интер-

фазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH). Просчитано по 100–400 клеток для каждого образца.

Результаты. У пациентов группы внутреннего контроля частота клеток с повышенным числом копий генов *EGFR* и *CCND1* не превышала 4,5 %. В мазках опухолевой ткани всех пациентов, взятых до проведения лучевой терапии, частота клеток с повышенной копийностью генов *EGFR* и *CCND1* варьировала в диапазонах 3,5–71,0 и 5,5–71,5 % соответственно. Полученные данные не зависели от стадии заболевания и места локализации опухоли. В группе пациентов с внутренним контролем частота клеток с повышенной копийностью обоих генов достоверно ($p < 0,05$) превышала показатели их собственного контроля. После проведения лучевой терапии у 4 пациентов отмечалось увеличение частоты клеток с повышенной копийностью генов *EGFR* и *CCND1*. Еще у 4 пациентов, наоборот, частота этих клеток снижалась, оставаясь достоверно ($p < 0,05$) выше показателей внутреннего контроля. У 1 пациента наблюдалась противоположная динамика частоты клеток с нарушенной копийностью генов *EGFR* и *CCND1*.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют об индивидуальной реакции организма пациентов на проведение лучевой терапии и необходимости дальнейших исследований.

Мутационный статус гена *BRAF* и клиничко-морфологические особенности меланомы кожи

И.Ю. Ефимова, Д.И. Водолажский, С.С. Кочуев

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Меланома кожи человека — исключительно агрессивная опухоль с высоким уровнем летальности и высокой склонностью к рецидивам и метастазированию. Оценка ряда морфологических характеристик новообразования имеет существенное значение при определении прогноза течения заболевания и формировании групп риска у больных меланомой кожи.

Задачи исследования. Определение ассоциаций между мутационным статусом гена *BRAF* и клиничко-морфологическими особенностями меланомы кожи у пациентов Юга России, проходивших плановое лечение в Ростовском научно-исследовательском онкологическом институте в 2013–2015 гг.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 50 мужчин в возрасте от 7 до 83 лет (медиана 56,5 года) и 50 женщин в возрасте от 24 до 80 лет (медиана 51 год) с морфологически подтвержденным диагнозом меланомы кожи. Проводили прямое секвенирование по Сэнгеру, Real-Time PCR. Для статистической обработки данных использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, точный критерий Фишера и таблицы

сопряженности с применением критерия χ^2 для порогового уровня $p < 0,05$.

Результаты. Присутствие мутации в гене *BRAF* было статистически достоверно ассоциировано с увеличением уровня инвазии по Кларку ($p < 0,05$). Также установлено, что опухоли с активирующими мутациями в гене *BRAF* чаще возникали на участках кожи, подверженных периодической инсоляции (туловище), тогда как опухоли с wt*BRAF* преобладали на участках кожи с хроническим солнечным облучением (голова и шея). Подобные данные согласуются с исследованиями, проведенными ранее.

Общая частота проявления соматических мутаций V600 в гене *BRAF* составила 57 %. Нами установлены 3 варианта мутаций в экзоне 15 гена *BRAF*: p.V600E, p.V600K и V600 K601>E. Мутация V600 K601>E впервые диагностирована у пациента популяции Юга России. Частота проявления *BRAF*-мутаций составила: p.V600E — 88 %, p.V600K — 10 % и K601>E — 2 % случаев от всего количества мутаций.

Выводы. Установлено, что присутствие мутаций в гене *BRAF* было достоверно связано с увеличением уровня инвазии по Кларку. Обнаружено, что опухоли с активирующими мутациями в гене *BRAF* чаще возникали на участках кожи, подверженных периодической инсоляции (туловище). Опухоли без мутаций в гене *BRAF* преобладали на участках кожи с хроническим солнечным облучением (голова и шея). Общая частота проявления соматических мутаций V600 в гене *BRAF* составила 57 % (57 из 100 пациентов). В рамках настоящего исследования в гене *BRAF* были выявлены 3 варианта мутаций с различными частотами встречаемости: p.V600E (88 %), p.V600K (10 %) и K601>E (2 %).

Количественный анализ опухолевых стволовых клеток в биопсийном материале трижды негативного рака молочной железы до лечения

И.А. Замулаева, Н.В. Орлова, С.Г. Смирнова,
А.А. Енилеева, И.А. Смирнова

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, Обнинск

Введение. В последние годы продемонстрировано существование опухолевых стволовых клеток (ОСК) в злокачественных новообразованиях различной локализации и стабильных линиях опухолевых клеток человека и животных. Рак молочной железы (РМЖ) был первой солидной опухолью, в которой установлено наличие ОСК. К настоящему времени накоплен значительный массив экспериментальных данных о более высокой резистентности ОСК к действию ионизирующего излучения и ряда химиопрепаратов по сравнению с остальными клетками опухоли, а также выяснены

многие молекулярно-клеточные механизмы такой резистентности. В связи с этим предполагают, что именно реакция этой резистентной фракции опухолевых клеток является фактором, определяющим результаты лечения больных РМЖ. Клинические данные о связи ОСК молочной железы с формированием резистентности к противоопухолевым воздействиям пока немногочисленны, но свидетельствуют о перспективности дальнейшей работы в этом направлении. При этом изучение ОСК в прогностически неблагоприятных злокачественных новообразованиях, включая тройной негативный (ТН) РМЖ, представляет особый интерес.

Задачи исследования. Определение доли ОСК в биопсийном материале ТН РМЖ до лечения для дальнейшего выяснения прогностического значения этого показателя.

Материалы и методы. Биопсийный материал 24 больных подвергали ферментативной дезагрегации. ОСК выявляли методом проточной цитофлуориметрии по иммунофенотипу CD44⁺CD24^{-low} среди ядросодержащих Хехст 33342+ клеток, для отрицательной селекции миелоидных клеток использовали моноклональные антитела к CD45.

Результаты. Доля ОСК широко варьировала у разных больных (от 0,7 до 76,1 %), составляя в среднем (\pm SE) $17,3 \pm 3,3$ %. Статистически значимых корреляций между долей ОСК и клинико-морфологическими показателями (стадия TNM, гистологический тип опухоли) не выявлено.

Выводы. Полученные результаты согласуются с данными литературы о более высоком содержании ОСК в ТН РМЖ по сравнению с остальными, прогностически более благоприятными типами РМЖ.

Анализ маркеров пролиферации в морфологически неизменной ткани кишечника при доброкачественных и злокачественных новообразованиях толстой кишки

М.В. Захаренко, В.К. Боженко, И.Д. Троценко, У.С. Станоевич, А.Л. Сенчукова, В.А. Солодкий

ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России, Москва

Задачи исследования. Оценка экспрессии маркеров пролиферации в морфологически неизменной ткани (МНТ) при доброкачественных и злокачественных новообразованиях толстой кишки.

Материалы и методы. Исследование проведено на послеоперационном и биопсийном материале, полученном от 147 пациентов, проходивших обследование и лечение в РНЦРР. Из них у 111 больных первичным

раком толстой кишки (I–IVB стадии) получены образцы ткани опухоли и морфологически неизменной ткани толстой кишки (МНТо). Образцы нормальной ткани кишечника (норма) ($n = 29$) были получены у здоровых добровольцев, образцы ткани полипа (П) ($n = 7$) и ткани, прилегающей к полипу (МНТп) ($n = 7$), получили у пациентов, проходивших плановое эндоскопическое обследование. Проанализирована экспрессия маркеров пролиферации: P16INK4A (CDKN2A) – ингибитора циклинзависимых киназ CDK4/6, циклинов CCND1 и CCNB1.

Результаты. Уровень экспрессии мРНК генов *CCND1* и *P16INK4A* при колоректальном раке достоверно увеличивается в ряду «норма – МНТо – опухоль». Сравнение экспрессии генов при полипозе показало, что в ряду «норма – МНТп – П» отсутствуют достоверные различия между тканями нормальной слизистой оболочки и МНТп. В группах «норма – П» увеличение значений экспрессии получено для *CCNB1* (0,51 и 1,82) и *CCND1* (0,57 и 0,97). Для *P16INK4A* достоверных различий не получено. В группах «П – опухоль» получено достоверное различие значений экспрессии для *P16INK4A* (0,57 и 3,92); для *CCNB1* и *CCND1* достоверных различий не получено. Сравнение групп МНТп и МНТо выявило достоверные отличия в уровне экспрессии *P16INK4A*. Показано, что ткань полипа отличается от нормальной ткани по 2 из 3 исследованных генов, в то время как уровень экспрессии исследованных генов в МНТп сопоставим с уровнем в нормальной ткани кишечника.

Выводы. Анализ уровней экспрессии маркеров пролиферации *CCNB1*, *CCND1* и *P16INK4A* в морфологически неизменной ткани толстой кишки показывает синхронное увеличение уровня экспрессии в ней при наличии злокачественной опухоли. В то же время при доброкачественных гиперпролиферативных процессах (полип) в морфологически неизменной ткани не происходит изменений в исследованных генах. Обнаруженные закономерности могут служить дополнительными диагностическими критериями и использоваться, например, при невозможности получить ткань патологического процесса для морфологического исследования.

Оценка влияния облучения на клетки постоянных и первичных линий глиобластом

Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, Н.Л. Варганян, М.В. Филатов, М.П. Самойлович

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России, Санкт-Петербург; ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», Ленинградская область, Гатчина

Задачи исследования. Оценка воздействия облучения на клетки постоянных линий глиобластом A172 и T98G, а также первичных линий глиобластом T2 и R1,

полученных из операционного материала больных глиобластомой.

Материалы и методы. Клеточные культуры подвергали однократному облучению в дозе 10 Гр или фракционированному облучению по 3 Гр в суммарных дозах 36 или 51 Гр. После облучения оценивали экспрессию генов ростовых факторов (*VEGF*, *FGF (b)*, *TGFβ1*, *HGF*, *EGF*), генов белков внеклеточного матрикса (*TNC*, *THBS1*) и генов внутриклеточных белков, определяющих принадлежность к мезенхимной линии (*FAP*, α *SMA*) в популяциях клеток, сохранивших способность к пролиферации, а также в популяции непролиферирующих клеток. Пролиферирующие клетки исследовали на первом после пересева пассаже.

Результаты. Однократное облучение в дозе 10 Гр вызывало незначительные колебания экспрессии генов в клетках линий A172, T98G и R1, в клетках T2 оно сопровождалось усилением активности генов *VEGF*, *FGF (b)*, *FAP* и *TNC*. Фракционированное облучение в дозе 36 Гр сопровождалось гибелью значительной части клеток A172 и R1, при этом экспрессия большинства генов в оставшихся клетках была снижена. В клетках T98G и T2 под воздействием фракционированного облучения сформировалась популяция непролиферирующих переживающих клеток, которая была устойчива к облучению в дозе 51 Гр и характеризовалась многократным усилением экспрессии ряда генов. В обеих линиях усиливалась активность генов *FGF (b)*, *EGF*, *FAP* и *TNC*. Кроме того, в переживающих клетках T98G была повышена экспрессия генов *HGF* и *THBS1*, а в клетках T2 – *VEGF*.

Выводы. В результате установлено, что: 1) клетки глиобластом отличаются по уровню резистентности к повреждающему действию облучения; 2) популяция мультиформной глиобластомы гетерогенна и содержит клетки, которые под действием облучения прекращают пролиферацию, но более месяца могут оставаться жизнеспособными и активно экспрессировать гены ростовых факторов, белков внеклеточного матрикса и внутриклеточных белков, определяющих принадлежность к мезенхимной линии.

Характеристика соматических мутаций в гене *KRAS* у больных колоректальным раком

О.И. Кит, Д.И. Водолажский, Я.С. Енин, Д.С. Кутилин,
М.А. Кожушко, Л.Ю. Владимирова

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Анализ мутационного статуса онкогена *KRAS* используется в качестве биомаркера прогностической эффективности таргетного лечения колоректального рака (КРР). Изучение частоты мутаций в гене *KRAS* и их связи с клинико-патологическими особен-

ностями у пациентов различных гендерных и возрастных групп с колоректальным раком на Юге России ранее не проводилось. Вместе с тем гендерные группы пациентов могут иметь свои особенности с точки зрения различий в частоте проявления соматических мутаций в гене *KRAS*.

Задачи исследования. Изучить полиморфизм 7 SNP-мутаций соматического происхождения в гене *KRAS* опухолевых биоптатов пациентов различных гендерных и возрастных групп с диагнозом КРР Юга России для прогнозирования потенциальных групп риска пациентов.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 800 пациентов Юга России с морфологически подтвержденным диагнозом аденокарциномы толстой кишки. Для молекулярно-генетического исследования использовали FFPE-срезы, содержащие не менее 20 % опухолевых клеток. Экстракция ДНК включала процедуру депарафинирования (ортоксилол), лизис в 2 % SDS-буфере в присутствии протеиназы К и очистку на колонках QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Германия). При помощи набора реагентов Real-Time-PCR-*KRAS*-7M («Биолинк», Россия) проводили определение 7 миссенс-мутаций в кодонах 12 и 13 гена *KRAS*: G12C, G12S, G12R, G12V, G12D, G12A, G13D.

Результаты. Обнаружено, что в объединенной группе пациентов мужского и женского пола частота соматических мутаций в гене *KRAS* была выше в группе старше 55 лет (41 %) по сравнению с группой пациентов моложе 55 лет (34 %) ($p < 0,05$). Подобного рода закономерность не была выявлена среди пациентов мужского пола, у которых частота соматических мутаций в гене *KRAS* составила в группе старше 55 лет 35 %, а в группе пациентов моложе 55 лет 32,4 %. Среди пациентов женского пола частота соматических мутаций в гене *KRAS* составила в группе старше 55 лет 35 %, а в группе пациентов моложе 55 лет 47,1 % ($p < 0,05$).

Выводы. Частота соматических мутаций в кодоне 2 гена *KRAS* различается у пациентов различных гендерных и возрастных групп Юга России. Частота соматических мутаций в кодоне 2 гена *KRAS* выше у пациентов женского пола. Среди пациенток частота соматических мутаций в кодоне 2 гена *KRAS* выше в возрастной группе старше 55 лет по сравнению с возрастной группой моложе 55 лет. Этот вывод позволяет предположить значимость изменения гормонального фона у пациенток в период пред- и постменопаузы в возникновении соматических мутаций в гене *KRAS*.

Возрастные закономерности проявления мутаций в генах *EGFR* и *KRAS* у пациентов Юга России

О.И. Кит, Д.И. Водолажский, М.А. Кожушко, И.А. Лейман, Ю.Н. Лазутин, Л.Ю. Владимирова

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Новая эра в лечении онкологических заболеваний была открыта с появлением таргетных препаратов – ингибиторов тирозинкиназы *EGFR*, которые обладают наибольшей эффективностью при выявлении активирующих мутаций гена *EGFR* (в случае рака легкого) или при отсутствии активирующих мутаций в гене *KRAS* (в случае рака толстой кишки). Поэтому важным показателем при прогнозировании объемов потенциальной таргетной терапии является оценка частот мутаций в генах *EGFR* и *KRAS* в разных возрастных группах пациентов с учетом их этнической принадлежности.

Задачи исследования. Определить частоту соматических мутаций в генах *EGFR* и *KRAS* у пациентов Юга России с аденокарциномами легкого и толстой кишки для улучшения прогнозирования и оценки величины клинических групп, ориентированных на использование таргетной терапии ингибиторами тирозинкиназы.

Материалы и методы. Обследовано 1312 пациентов (700 мужчин и 612 женщин) с морфологически подтвержденными диагнозами аденокарциномы легкого ($n = 512$) и аденокарциномы толстой кишки ($n = 800$). Выборку разделили по возрастным критериям: до 45 лет, 45–54 года, 55–64 года и старше 65 лет. Экстракцию суммарной ДНК проводили из FFPE-образцов опухолей. Методом ПЦР в реальном времени определяли 29 мутаций в гене *EGFR* (Therascreen EGFR RGQ PCR Kit, QIAGEN, Германия) и 7 SNP-мутаций в гене *KRAS* (Real-Time-PCR-KRAS-7M, «Биолинк», Россия).

Результаты. Частота мутаций в гене *EGFR* у пациентов различных возрастных групп варьировала в широком диапазоне: от 31,5 % у пациентов моложе 45 лет, до 19,8 % в возрастной группе 45–54 года. У пациентов от 55 до 64 лет и старше 65 лет этот показатель составил 27,2 %. Распределение частоты мутаций в гене *KRAS* у пациентов разных возрастов имело схожую тенденцию: максимальный показатель наблюдали у пациентов моложе 45 лет (44,5 %), минимальный показатель – в группе 45–54 года (28,3 %). У пациентов от 55 до 64 лет и старше 65 лет этот показатель составлял 39,1 и 42,4 % соответственно.

Выводы. Частота соматических мутаций в генах *KRAS* и *EGFR* у пациентов с аденокарциномами легкого и толстой кишки, проживающих на Юге России, в целом соответствует частоте, характерной для западноевропейской популяции. Распределение частоты мутаций в генах *KRAS* и *EGFR* по возрастным группам

отличается высокой анизотропией с минимумом у пациентов от 45 до 54 лет и максимумом у пациентов моложе 45 лет. Ввиду очевидной синхронности наблюдаемых изменений для генов *KRAS* и *EGFR* и при разных нозологиях мы делаем предположение о существовании общего механизма индукции/репрессии соматических мутаций.

Цитогенетические маркеры в клетках костного мозга мышей разных линий, ассоциированные с их позитивным онкостатусом или прогрессивным опухолевым ростом

А.А. Ковалева, Ю.И. Кудрявец

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. П.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев

Введение. Многостадийность канцерогенеза затрудняет обнаружение его ключевых цитогенетических событий. Неизвестно, с какими этапами развития опухоли может быть связана нестабильность хромосомного аппарата – с инициацией, проявлением неопластических признаков клеток или со стадией прогрессии.

Материалы и методы. Культура клеток, цитологические, цитогенетические и статистические методы. Исследованы мутационные спектры в клетках костного мозга (КМ) мышей линий BALB/c, C57BL/6, DBA и ICR в контрольных условиях (возраст 1,5–2 мес) и при индукции опухолевого роста (меланома B-16, аденокарцинома Ca755, спонтанный канцерогенез у мышей линии ICR). Учитывали степень анеуплоидии, количество клеток с хромосомными aberrациями (ХА), асинхронным расщеплением центромерных районов хромосом (АРЦХ), межхромосомными ассоциациями по типу Робертсоновских транслокаций (MARb), частоту лимфоцитов с микроядрами, митотических, апоптотических клеток, ядерных аномалий, патологии митоза.

Результаты. Выявлено, что в клетках КМ мышей высококорковых линий BALB/c, DBA и ICR цитогенетическая нестабильность проявляется задолго до реализации неопластических потенциалов. Выделяются общие для этих линий характеристики (анеуплоидия, АРЦХ, ХА, MARb), которые, вероятно, связаны с инициацией опухолевого процесса. У мышей низкорковой линии C57BL/6 лишь после индукции опухолевого роста клетками карциномы Ca755 или меланомы B-16 в клетках КМ достоверно увеличивается частота клеток с ХА, АРЦХ, лимфоцитов с микроядрами, апоптотических и митотических клеток, клеток с различными ядерными протрузиями и анеуплоидией I типа ($2N = 40 \pm 1 Xp$) и II типа ($2N = 40 \pm 6 Xp$). У животных с меланомой B-16 дополнительно повышена частота клеток с MARb.

Выводы. Уменьшение стабильности хромосомного аппарата с комплексом определенных цитогенетиче-

ских характеристик тесно ассоциировано с генетической предрасположенностью к опухолевому процессу. В КМ мышей разных линий выделяются цитогенетические показатели (клеточная пролиферация, высокая частота клеток с ХА и с АРЦХ, анеуплоидия, патология ядер), которые характерны при наличии как спонтанных, так и индуцированных опухолей.

Ренин-ангиотензиновая система в прогнозировании рецидива при терапии рака предстательной железы

М.И. Коган, Е.А. Черногубова, М.Б. Чибичян

Кафедра урологии и репродуктивного здоровья человека
с курсом детской урологии-андрологии ФПК
и ППС ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону;
ФГБУН «Институт аридных зон Южного научного центра
РАН», Ростов-на-Дону

Введение. Введение в реальную клиническую практику новых критериев диагностики неопластических процессов в предстательной железе (ПЖ) на основе выявления информативных предикторов и маркеров рака ПЖ (РПЖ), особенно его агрессивных форм, является одним из приоритетных направлений научных разработок в области онкоурологии.

Задачи исследования. Идентификация маркеров для прогнозирования клинически агрессивных форм РПЖ.

Материалы и методы. В исследование включен 51 пациент с РПЖ (у 76,5 % – Т3–4). Через 1, 6, 12 и 18 мес после завершения гормонотерапии (ГЛТ) проводили мониторинг уровня простатспецифического антигена в сыворотке крови. Для идентификации ассоциированных с прогрессированием РПЖ показателей определяли активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (КФ 3.4.15.1) в сыворотке крови с использованием в качестве субстрата N-[3-(2-фурил)-акрилоил]-L-фенилаланилглицилглицина, для иммуногистохимического исследования использован материал полифокальных пункционных биопсий и антитела Angiotensin II Type 2 Receptor (AT2).

Результаты. Снижение экспрессии AT2-R в ткани ПЖ до начала ГЛТ и увеличение активности АПФ в крови через 1 мес после начала ГЛТ отмечается у пациентов с последующим развитием биохимического рецидива. При использовании модели предсказания биохимической прогрессии в зависимости от значения AT2-R в ткани ПЖ до ГЛТ чувствительность и специфичность теста составляют 87,5 % ($p < 0,01$) и 85,71 % ($p < 0,01$) соответственно. Совместное определение активности АПФ и содержания ПСА в крови через 1 мес после начала ГЛТ позволяет выделить группу пациен-

тов с высоким риском развития биохимического рецидива с чувствительностью и специфичностью 78,6 % ($p < 0,001$) и 94,6 % ($p < 0,001$) соответственно.

Выводы. Использование идентифицированных прогностических маркеров позволяет на ранних этапах выделить группу пациентов с высоким риском развития рецидива РПЖ. Ренин-ангиотензиновая система относится к числу систем организма, вовлеченных в сложные пути канцерогенеза и может рассматриваться как новая терапевтическая мишень для таргетной терапии при РПЖ.

Представлены результаты работ, выполненных при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках Соглашения о предоставлении субсидии № 14.607.21.0099, уникальный идентификатор ПНИЭР (проекта) RFMEFI60714X0099, ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

Ключевые проангиогенные факторы у больных почечно-клеточным раком

А.В. Колпаков, В.В. Муштенко, А.А. Морозов

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

Введение. Ключевым активатором ангиогенеза считают фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – мультифункциональный цитокин, повышающий способность опухолевых клеток к инвазии и метастазированию. VEGF проявляет свои биологические эффекты посредством взаимодействия с 3 трансмембранными рецепторами. Кроме трансмембранных рецепторов VEGF обнаружены растворимые формы рецепторов и среди них sVEGFR-2, ингибирующий эффекты VEGF.

Задачи исследования. Анализ содержания VEGF и sVEGFR-2 в сыворотке крови, опухоли и непораженной паренхиме почки у больных почечно-клеточным раком (ПКР) с учетом клинико-морфологических характеристик заболевания.

Материалы и методы. Обследовали 37 больных (возраст 38–78 лет; 18 мужчин и 19 женщин) ПКР в различных стадиях заболевания. Группу контроля составили 57 практически здоровых лиц (12 мужчин и 45 женщин). У большинства (29/78,4 %) выявлен светлоклеточный рак почки, папиллярный и хромофобный варианты – по 4 наблюдения. Уровни VEGF и sVEGFR-2 определяли в сыворотке крови, в цитозольной фракции опухоли и непораженной паренхимы почки методом иммуноферментного анализа (R&D, США).

Результаты. У 87 % больных содержание VEGF в опухоли было выше, чем в гистологически неизменной ткани почки, а показатель медианы VEGF был выше в опухоли (525 пг/мг белка), чем в нормальной ткани почки (62,8 пг/мг белка; $p < 0,001$). Повышение содержания sVEGFR-2 в опухолях отмечено только

у 39 % больных, при этом различия в уровне маркера между опухолью и неизменной паренхимой почки незначимы. Сывороточный уровень sVEGFR-2 у больных не зависел от гистологического строения опухоли. Не выявлено связи между содержанием sVEGFR-2 в крови больных раком почки и максимальным размером, характером роста опухоли, ее локализацией в анатомических отделах почки. Уровни sVEGFR-2 в опухоли и неповрежденной ткани почки были достоверно связаны ($r = 0,41$; $p = 0,02$); для VEGF такой взаимосвязи не отмечено. Увеличение степени злокачественности ПКР сопровождалось достоверным повышением уровней VEGF, sVEGFR-2 в крови, при этом в цитозоле опухоли обнаружено снижение sVEGFR-2 и повышение VEGF. У большинства больных с инвазией псевдокапсулы опухоли обнаружены высокие показатели sVEGFR-2 в крови.

Выводы. Уровень экспрессии VEGF в цитозоле опухоли следует считать перспективным биологическим маркером ПКР при оценке распространенности первичной опухоли. Повышенная продукция VEGF и sVEGFR-2 в ткани ПКР позволяет рассматривать эти биологические маркеры в качестве мишеней антиангиогенной терапии.

Сравнение уровней экспрессии генов *FcγRIII* в зависимости от клинических характеристик у больных колоректальным раком

Н.В. Красногорова¹, Д.В. Новиков¹, С.Г. Фомина¹,
Ю.Д. Хромина², П.А. Будай², В.В. Новиков¹

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород;

²ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», Нижний Новгород

Введение. Класс низкоаффинных рецепторов *FcγRIII* представлен у человека двумя паралогичными и идентичными на 98 % генами. *FcγRIIIα* экспрессируется на поверхности натуральных киллеров и дополнительно обнаруживается на поверхности моноцитов, тканеспецифичных макрофагов, $\gamma\delta$ -Т-клеток и дендритных клеток, в то время как экспрессия *FcγRIIIβ* является молекулярным маркером нейтрофилов, а также на низком уровне детектируется в базофилах и эозинофилах. Изменения экспрессии генов *FcγRIIIα* и *FcγRIIIβ* в периферической крови являются отражением изменений состава клеток, что может быть использовано в прогностических целях.

Задачи исследования. Сравнение относительных уровней мРНК *FcγRIII* в периферической крови больных колоректальным раком (КРР) с различными клиническими характеристиками.

Материалы и методы. В работе использовали периферическую кровь 43 больных КРР (27 женщин и 16 мужчин), которые проходили лечение в Нижегородском областном клиническом онкологическом диспансере. Возраст обследованных больных варьировал от 45 до 84 лет. Материал забирали при поступлении в стационар. От каждого участника получено информированное согласие на включение в исследование. Определение уровней экспрессии *FcγRIII* проводили с использованием специфичных праймеров методом ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени. Уровни мРНК рассчитывали по формуле $2\Delta Ct$ с учетом эффективности реакции. Нормировку проводили относительно мРНК убиквитина С.

Результаты. В периферической крови больных КРР мРНК *FcγRIIIα* и *FcγRIIIβ* детектировалась во всех исследуемых образцах. При поступлении в стационар относительный уровень мРНК *FcγRIIIα* превышал уровень мРНК *FcγRIIIβ* в 3,09 раза. Установлено, что у больных КРР с низкодифференцированными клетками опухоли обнаружено статистически значимое повышение уровней мРНК *FcγRIIIα* ($p = 0,007$) и *FcγRIIIβ* ($p = 0,034$). При сравнении уровней мРНК генов *FcγRIII* с другими клиническими характеристиками пациентов, такими как пол, возраст, локализация опухоли и стадия заболевания, статистически значимых различий не выявлено.

Выводы. Таким образом, в периферической крови больных КРР мРНК *FcγRIII* детектируется во всех исследуемых образцах и уровень экспрессии *FcγRIIIα* в 3 раза превышает уровень *FcγRIIIβ*. У больных с низкодифференцированными клетками опухоли регистрируются повышенные уровни мРНК обоих генов *FcγRIII*, что свидетельствует о повышении количества натуральных киллеров (*FcγRIIIα*) и нейтрофилов (*FcγRIIIβ*) в периферической крови.

Повышение эффективности терапии больных раком молочной железы на основе применения прогностического комплекса клеточных и гуморальных биомаркеров высокого риска развития рецидива заболевания

Ю.И. Кудрявец¹, Н.И. Семесюк¹, А.В. Жильчук²,
В.Е. Жильчук², Н.О. Безденежных¹, О.О. Лихова¹,
А.Л. Воронцова¹

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев;

²Ровенский областной онкологический диспансер, Ровно

На сегодня вместе со стандартными прогностическими факторами при раке молочной железы (РМЖ)

весьма перспективной в клинике считается так называемая малоинвазивная жидкая биопсия (liquid biopsy, ЖБ) периферической крови (ПК) пациента. Построенный нами алгоритм ЖБ включает выявление иммуноцитохимическим методом диссеминированных опухолевых клеток (ДПК), микрометастазов и провоспалительных цитокинов в костном мозге (КМ) и ПК больных еще до начала лечения. Исследование 66 больных РМЖ в стадии T1–4N0–2M0–1 и 15 здоровых доноров показало, что только у 48,5 % больных в стадии прогрессирования заболевания и у 25,7 % в стадии ремиссии в КМ выявляются цитокератин-положительные опухолевые клетки (ЦКП).

В этой ситуации традиционное выявление ДПК в КМ или ПК перестает быть достаточно достоверным маркером прогноза заболевания. Поэтому мы дополнительно исследовали уровень цитокинов в плазме крови и КМ больных по их биологической активности (TNF, CSF-1, IFN) или методом ELISA (IL-1, IL-6, TGF- β , VEGF). Установлено, что наличие ДПК в КМ и высокий уровень активности TNF и CSF-1 в ПК больных РМЖ с высокой вероятностью ($p < 0,001$) свидетельствуют о высоком риске возникновения рецидива злокачественного процесса, что требует корректировки принятых схем лечения.

Доказана высокая корреляционная связь между традиционными прогностическими маркерами (стадия TNM, экспрессия HER2/neu, рецепторы гормонов и др.) и комплексом ДПК/TNF/CSF-1. Интересно, что *in vitro* кокультивирование клеток КМ больных с прогрессией РМЖ с клетками РМЖ (MCF-7, T47D, MDA-MB-231) стимулирует в последних экспрессию белковых маркеров эпителиально-мезенхимального перехода (Twist, Slug, виментин). В то же время интерферон или золедроновая кислота в ряде случаев подавляли этот процесс.

Применение у больных с высоким риском рецидива РМЖ неoadьювантной терапии по схеме AC с переходом на паклитаксел с послеоперационным применением противовоспалительной терапии и профилактическим введением золедроновой кислоты значительно снизило частоту рецидивов злокачественного процесса.

Изменение копийности гена *MDM2* во внеклеточной ДНК у больных раком легкого

Д.С. Кутилин, Я.С. Енин

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. В настоящее время проблема ранней диагностики рака легкого остается нерешенной: у каждого 4-го больного опухоль диагностируется уже при наличии отдаленных метастазов. Исследование копийности генов во внеклеточной ДНК плазмы крови боль-

ных может стать основой для формирования нового эффективного малоинвазивного способа предиктивной диагностики и прогнозирования развития заболевания. Для этого необходимо установить существование связи изменения копийности генов внеклеточной ДНК с изменением копийности генов в ДНК, выделенной из тканей больных раком легкого.

Задачи исследования. Изучить копийность гена *MDM2* во внеклеточной ДНК плазмы крови здоровых доноров и больных раком легкого и в ДНК, выделенной из опухолевых и нормальных тканей больных раком легкого с метастазами и без метастазов.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили срезы тканей из FFPE-блоков 15 пациентов с аденокарциномой легкого (с метастазами в лимфатические узлы и без метастазов) и кровь этих же пациентов, взятая до операции, а также кровь 10 условно здоровых доноров (без онкологических заболеваний). Из окрашенных гематоксилином и эозином срезов с помощью лазерной микродиссекции (Palm MicroBeam, Carl Zeiss, Германия) выделяли опухолевые и нормальные клетки. Кровь центрифугированием разделяли на фракцию клеток и плазму. ДНК выделяли фенол-хлороформным методом. Определение относительной копийности гена *MDM2* (референсный ген *GAPDH*) проводили методом RT-qPCR на термоджеле CFX96 (Bio-Rad, США). Достоверность различий оценивали по критерию Манна–Уитни.

Результаты. Обнаружено увеличение копийности *MDM2*: в клетках аденокарциномы относительно клеток нормальной ткани на 150 % ($p < 0,05$), во внеклеточной ДНК пациентов с аденокарциномой относительно внеклеточной ДНК условно здоровых доноров на 160 % ($p < 0,05$). Достоверных отличий между копийностью *MDM2* во внеклеточной ДНК условно здоровых доноров и копийностью в нормальной ткани пациентов с аденокарциномой не обнаружено. Также установлено, что копийность *MDM2* в опухолевых клетках больных с метастазами в 1,6 раза ($p < 0,05$) превышает копийность у больных без метастазов, а копийность *MDM2* во внеклеточной ДНК больных с метастазами в 2 раза ($p < 0,05$) превышает копийность у больных без метастазов.

Выводы. Копийность гена *MDM2* во внеклеточной ДНК исследованной выборки пациентов отражает молекулярные особенности клеток опухоли легкого и имеет потенциал к использованию для малоинвазивной предиктивной диагностики и прогнозирования развития заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-34-00267_мол_а).

Фосфодиэстеразы цНМФ – PDE4 – новые мишени для таргетной терапии опухолей

Г.Б. Лапа

Институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Ранее нами показано, что соединения (LGB-014E, LGB-088 и др.), содержащие 3-амино-6,7-диметоксиизохинолиновый фрагмент, проявляли избирательную цитотоксичность к клеточным линиям HCT-116, Hке3, MOLT-4, K-562 на уровне IC50 2–0,5 μ M. Для дальнейшего улучшения цитотоксических и противоопухолевых свойств соединений этого ряда мы провели поиск их молекулярных мишеней. Проверка *in vitro* ряда молекулярных мишеней среди протеинкиназ, предсказанных *in silico* (PASS), не привела до сих пор к положительным результатам. Однако такая проверка молекулярных мишеней среди фосфодиэстераз (PDE) циклических нуклеотидов (цНМФ), также предсказанных *in silico*, привела к обнаружению изофермента PDE4B, аффинного для скринированных соединений.

Задачи исследования. Поиск ответов на вопросы: можно ли рассматривать PDE4 как надежные молекулярные мишени для новых таргетных противоопухолевых препаратов? Проявляют ли противоопухолевые свойства новые, скринированные нами, цитотоксические ингибиторы PDE4B? Частично ответить на эти вопросы могло бы предварительное тестирование *in vivo*.

Материалы и методы. Соединение LGB-088 разработано в нашей лаборатории, тестировалось на лимфолейкозе P-388 мышей в лаборатории экспериментальной химиотерапии НИИ ЭДнТО. Изучение сигнальных каскадов *in silico* проводили в KEGG PATHWAY Database.

Результаты. Данные литературы дают утвердительный ответ на поставленные вопросы. Описаны ингибиторы PDE4D, PDE5, PDE7A, а также PDE10, проявляющие противоопухолевые свойства в различных ксенографтах колоректального рака, опухолей центральной нервной системы, предстательной железы, моделях меланомы и ряде лейкоемий. Данные литературы, а также изучение сигнальных каскадов *in silico* показывают, что ингибирование PDE4, повышение уровня циклического аденозинмонофосфата и активация протеинкиназы A влияют на RAS/CRAF/MEK/ERK-сигнальный каскад, снижая развитие и выживание ряда линий меланом, колоректальных типов рака (HCT116, Hке3), лейкоемий (MOLT-4, K562) и других форм опухолей с мутациями RAS.

Поскольку ранее мы получили доказательства отсутствия токсичности LGB-088 на нечувствительных линиях *in vitro* при концентрациях 100–150 μ M, то мы решили предварительно тестировать соединения *in vivo*

в более высоких дозах. К сожалению, высокие дозы LGB-088 – 150, 125, 100 мг/кг – оказались токсичными для всех 3 опытных групп мышей при внутривентральном введении и вызвали гибель 100 % животных в течение 5 дней с начала введения.

Выводы. Вероятно, нужно продолжить как изучение противоопухолевых свойств ингибиторов PDE4B на основе 3-аминоизохинолинового фрагмента, так и поиск их новых молекулярных мишеней.

Угнетение экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и признаков злокачественности *in vitro*, туморогенности и метастазирования *in vivo* в клетках карциномы легких Льюис и меланомы B-16 путем их трансдукции геном интерферона β в составе бакуловирусного вектора

А.А. Лихова¹, Н.А. Безденежных¹, О.А. Ковалева¹, Л.И. Строковская², Ю.Й. Кудрявец¹

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев;

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

Введение. Рекомбинантные интерфероны (ИФН) в настоящее время широко используются в онкологической клинике. Создание длительной терапевтической концентрации ИФН в опухоли локально может быть достигнуто с помощью генной терапии. Мишенью противоопухолевого действия ИФН может быть процесс эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), который активирован в опухолевых клетках значительную агрессивность и устойчивость к лекарственным препаратам.

Задачи исследования. Изучение влияния трансдукции гена ИФН- β в бакуловирусном векторе в клетки карциномы легкого Льюис и меланомы B-16 (линии клеток LL и MM-4 соответственно) на биологию клеток *in vitro* и туморогенность *in vivo*.

Материалы и методы. В работе использованы методы культуры клеток, экспериментальной онкологии, цитологические, цитогенетические, иммунологические, вирусологические, молекулярно-биологические и статистические методы исследования.

Результаты. Показано, что трансдукция клеток LL и MM-4 рБВ с геном ИФН (рБВ/ИФН) сопровождается быстрым (72 ч) изменением морфологических и биологических характеристик клеток: увеличением

их площади и адгезии, значительным снижением скорости и плотности роста, ингибированием миграционной активности, угнетением роста в агаре. Трансдукция опухолевых клеток геном ИФН- β приводит к быстрому увеличению ядерной экспрессии белков-онкосупрессоров p19ARF, p21WAF, увеличению цитоплазматической экспрессии E-кадгерина и ингибированию экспрессии в клетках LL транскрипционных факторов Twist и Slug, ассоциированных с ЭМП. В клетках меланомы уровень экспрессии белков Twist и Slug не изменяется, но резко снижается экспрессия N-кадгерина. Трансдукция клеток LL и MM-4 pBB/ИФН оказывает также значительное генотоксическое действие на клетки.

Выводы. Клетки LL и MM-4, трансдуцированные бакуловирусом с геном ИФН- β , в значительной мере теряют способность индуцировать опухоли и метастазы у животных *in vivo*. Важно, что внутривенное введение pBB/ИФН также подавляет рост индуцированных метастазов в легких животных.

Мутации гена *VHL* в светлоклеточном раке почки

Н.Н. Мазуренко, И.В. Цыганова, Т.Ф. Маливанова,
С.Д. Бежанова, А.Ф. Мукерия, О.В. Шаньгина,
В.А. Драудин-Крыленко, Д.Г. Заридзе

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

Введение. Нарушения гена-супрессора *VHL* являются ранним и наиболее частым событием в канцерогенезе светлоклеточного рака почки (СКРП) и связаны с нарушениями на коротком плече хромосомы 3 (3p21p25). Ген *VHL* инактивирован при наследственном и спорадическом СКРП за счет мутаций, транслокаций либо aberrантного гиперметилирования.

Задачи исследования. Анализ частоты мутаций гена *VHL* в образцах светлоклеточного рака почки.

Материалы и методы. ДНК получали из свежемороженых биопсий из вновь созданного банка СКРП. В исследование включены образцы СКРП, которые содержали не менее 50 % опухолевых клеток, процент опухолевых клеток оценивали в криостатных срезах. Мутации определяли методом полимеразной цепной реакции с праймерами к экзонам 1, 2, 3 гена *VHL* с последующим прямым и обратным секвенированием.

Результаты. Проведен анализ мутаций в гене *VHL* в 32 образцах СКРП. Всего мутации выявлены в 29 (90 %) из 32 образцов. Функциональные значимые, инактивирующие нарушения обнаружены в 16 (50 %) СКРП. В 10 СКРП выявлены делеции (1, 2, 8, 22 и 37 нуклеотидов), при которых происходит сдвиг рамки (31 %), в 2 случаях выявлены миссенс-мутации с образованием стоп-кодона (6 %). В 4 случаях обнаружены инсерции или делеции с инсерцией. Эти нарушения приводят к образованию транскрибированного продукта *VHL*. Миссенс- (7 случаев) и сайлент-мутации (3 СКРП),

не нарушающие функцию *VHL*, обнаружены в 10 (31 %) СКРП. В 1 СКРП выявлена делеция в экзоне 2 без сдвига рамки и замены аминокислоты кодона Gly123. Мутации кодирующих последовательностей найдены в экзоне 1 в 7 (24 %) случаях, в экзоне 2 в 13 (46 %), в экзоне 3 в 8 (28 %) СКРП. В 3 СКРП обнаружены мутации в интронах (9 %).

Выводы. Мутации в гене *VHL* многочисленны и чрезвычайно разнообразны. Планируется сопоставление полученных результатов с клиническими и эпидемиологическими данными.

Микроделеции локуса гена *WT1* резко повышают риск развития опухоли Вильмса у пациентов с врожденной аниридией

А.В. Марахонов, Т.А. Васильева, О.В. Хлебникова,
А.А. Воскресенская, Н.А. Поздеева, Ю.О. Козлова,
Н.В. Шилова, Р.А. Зинченко

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва;
ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт
(государственный университет)», Москва

Введение. Опухоль Вильмса — одна из самых частых солидных опухолей детского возраста, проявляющая значительную гистопатологическую и генетическую гетерогенность. Развитие опухоли Вильмса I типа (OMIM: 194070) обусловлено мутациями в гене *WT1*. У пациентов с синдромом WAGR (OMIM: 194072) развитие нефробластомы ассоциировано с врожденным отсутствием радужки (аниридией). Синдром встречается только в спорадических случаях с частотой 1:500 000 новорожденных. Врожденная аниридия без синдрома WAGR (OMIM: 106210, частота 1:40 000—1:100 000 новорожденных) вызывается точковыми мутациями в гене *PAX6* или хромосомными перестройками, захватывающими кодирующие или регуляторные участки гена *PAX6*. Ассоциация врожденной аниридии и опухоли Вильмса в составе WAGR-синдрома обусловлена делециями разной протяженности того же хромосомного региона 11p13, захватывающими одновременно гены *PAX6* и *WT1*, составляет 7 % всех случаев аниридии. Опухоль Вильмса развивается у 70 % больных аниридией, несущих хромосомную делецию «WAGR-области». Медианный возраст развития WAGR-ассоциированной опухоли почки составляет 2 года. Мониторинг и своевременное удаление нефробластомы имеют решающее значение для лечения пациентов, и определение генетической причины аниридии — точковая мутация в гене *PAX6* или микроделеция, захватывающая ген *WT1*, — является критически важным.

Задачи исследования. Определение группы риска для развития злокачественной опухоли почки среди больных врожденной аниридией.

Материалы и методы. MLPA-, LOH-, FISH-анализы.

Результаты. В изученной группе из 117 пациентов с врожденной аниридией определены 62 спорадических случая без положительной семейной истории аниридии, среди них хромосомные делеции обнаружены у 30 пациентов, а делеции «WAGR-области» – у 14 пробандов (22,6 % от числа спорадических случаев). Семь пациентов уже перенесли операцию по удалению односторонней опухоли Вильмса, у 2 опухоль не развилась (взрослые пациенты). Идентификация хромосомных микроделеций, захватывающих локус гена *WT1*, еще у 5 пациентов – детей до года – резко повышает для них риск развития нефробластомы (до 70 %), однако предполагает возможность более внимательного мониторинга процесса развития опухоли и своевременного ее удаления.

Выводы. Во всех спорадических случаях врожденной аниридии (в российских популяциях около 50 % пациентов) необходимо проведение ДНК-диагностики с целью ранней дифференциальной диагностики с синдромом WAGR для оценки риска развития опухоли Вильмса.

Первичная диагностика перестроек иммуноглобулиновых генов опухолевых клонов при гемобластозах методом высокопроизводительного секвенирования

А.А. Минервина, А.Ю. Комков, Г.А. Нугманов,
И.З. Мамедов, Ю.Б. Лебедев

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академикова М.М. Шелякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Введение. Онкогематологические заболевания широко распространены как среди взрослых, так и среди детей. Как правило, возникновение таких заболеваний связано с наличием в крови пациента одного или нескольких опухолевых клонов. Одним из ключевых методов мониторинга эффективности терапии онкогематологических заболеваний является определение уровня минимальной остаточной болезни (МОБ), т. е. концентрации злокачественных клонов в кровеносной системе пациентов. Для определения уровня МОБ используется несколько типов маркеров: характерные хромосомные перестройки, комбинация поверхностных маркеров клеток и перестройки иммуноглобулиновых генов. Именно перестройки иммуноглобулиновых генов являются уникальными генетическими маркерами конкретного опухолевого клона. В отличие от поверхностных маркеров и хромосомных перестроек выявление перестроек иммуноглобулиновых генов происходит на уровне ДНК и не зависит от уровня

экспрессии. Таким образом, перестройки генов В- и Т-клеточных рецепторов – наиболее подходящие маркеры для слежения за уровнем МОБ, поскольку являются постоянной характеристикой опухолевых клонов.

Задачи исследования. Разработка системы для первичной детекции перестроек иммуноглобулиновых генов опухолевых клонов при лимфобластных лейкозах. Разработка уникальных праймеров позволяет определить любые клональные перестройки генов *IGH*, *IgL*, *IGK*, *TRB*, *TRD*, *TRG* всего в 8 параллельных реакциях.

Материалы и методы. Определение клональных перестроек иммуноглобулиновых генов производилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с дальнейшим секвенированием ампликонов на платформе Illumina. Для каждого образца ДНК пациента было проведено 8 параллельных реакций ПЦР с мультиплексными праймерами.

Результаты. С помощью разработанной системы протестированы 10 образцов ДНК из костного мозга пациентов с острым лимфобластным лейкозом. Для каждого из пациентов были определены одна или более перестроек иммуноглобулиновых генов опухолевых клонов. Полученные последовательности могут быть использованы как для определения клональной структуры опухоли, так и для дальнейшего мониторинга МОБ.

Выводы. В ходе работы нами разработана универсальная система для первичной диагностики перестроек опухолевых клонов при гемобластозах методом высокопроизводительного секвенирования. Данная система позволяет охарактеризовать опухолевый клон сразу по 6 независимым иммуноглобулиновым генам, что делает дальнейшее определение МОБ более точным по сравнению с существующими методами.

Работа поддержана грантом RFMEFI60414X0118.

CD38 gene polymorphism: expression in tumor foci of colon cancer patients

A. Mokran

Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod

Background. Human CD38 protein is a transmembrane glycoprotein with a molecular mass of 45 kDa that acts as a bifunctional ectoenzyme. The gene encoding CD38 is located on chromosome 4. It is shown that SNPs rs6449182 is associated with risk of chronic leukemia. In the present study, we have analyzed the association between allelic variants of single nucleotide polymorphism (SNP) rs6449182 gene *CD38*, which can affect gene expression and the risk of colon cancer, as well as loss of heterozygote frequency in colon tumor cells.

Objective. The aim of this work is to study the frequency of allelic variants of SNPs rs6449182 *CD38* gene in blood and tumor of patients with colon cancer.

Materials and methods. We studied 28 samples of peripheral blood of patients with colon cancer and 28 samples

of tumor nodes of patients with colon cancer, provided the Nizhny Novgorod State Medical Academy. *CD38* gene polymorphism analysis was performed by allele-specific PCR using specific primers. Compliance with the Hardy-Weinberg equilibrium in each case was analyzed by χ^2 test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. Colon cancer patients living in the Nizhny Novgorod region had the following distribution of allelic variants of SNPs rs6449182: CC-0.321, CG-0.572, and GG-0.107. Study of frequency of allelic variants of SNP rs6449182 in samples of tumor nodes of colon cancer patients showed the following distribution: CC-0.321, CG-0.572, and GG-0.107. Comparison of the genotypes of peripheral blood and tumor cells showed three of the tested patients (10 %) were detected in heterozygote loss of tumor samples in which the allele G allele is replaced by C.

Conclusion. The tumor foci 10 % of colon cancer patients recorded the loss of heterozygous *CD38* gene. The biological significance of the detected changes remains unknown. These data suggest that allelic variants SNPs rs6449182 affect the expression of the gene encoding the CD38 molecule in tumor cells of patients with colon cancer, and can determine a predisposition to colon cancer.

Study of genetic variants SNPs rs6449182 *CD38* gene donor and patients with colon cancer

A. Mokran

Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod

Background. The gene encodes a transmembrane glycoprotein CD38, which is considered a marker of lymphocyte activation and possesses enzymatic activity against ADP-ribose. SNP rs6449182 located at the 5'-end of the first intron and can affect the expression of *CD38* gene. It is shown that the SNP rs6449182 GG genotype increased the risk of developing chronic B cell leukemia.

Objective. Study of the frequency of allelic variants of SNPs rs6449182 *CD38* gene in healthy donors and patients with colon cancer.

Materials and methods. The study included 100 samples of peripheral blood of healthy donors, 106 samples of peripheral blood of patients with colorectal cancer (RTC) and 30 samples of tumor lesions of patients with colon cancer. DNA was isolated by phenol-chloroform extraction. SNP rs6449182 *CD38* gene was detected by allele-specific PCR. Comparison of frequencies of occurrence of alleles and genotypes, as well as test samples for compliance with Hardy-Weinberg equilibrium was performed using χ^2 method.

Results. Healthy donors living in the Nizhny Novgorod region, had the following distribution of allelic variants of SNPs rs6449182: SS 0.570, 0.380 CG, and GG 0.050. Investigation of occurrence frequency of allelic variants of SNP rs6449182 in patients with colon cancer, showed

the following distribution: 0.434 CC, CG 0.462, GG 0.104. We are conducting a study of samples of healthy donors and cancer patients on the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Both samples showed compliance with Hardy-Weinberg equilibrium. No difference in the incidence of genotypic variants rs6449182 SNPs in cancer patients and healthy individuals have been identified. However, it was found that the G allele in patients with colon cancer occurs significantly more likely than healthy donors

Conclusion. The obtained results show that the G allele of SNP rs6449182 *CD38* gene probably linked to colon cancer (95 % CI: 1.04–2.46). Our data are consistent with the literature, which shows the role of GG genotype in the risk of chronic leukemia development. Furthermore it is known that the G allele is associated with increased levels of expression of *CD38* gene. Apparently, the increased level of *CD38* gene expression contributes to the development of colorectal cancer.

Идентификация циркулирующих опухолевых ДНК для ранней диагностики мелкоклеточного рака легкого

А.Ф. Мукерия, В.А. Драудин-Крыленко, М.В. Гаас, В.А. Юрченко, Ю.М. Кузиченкова, Д.Г. Заридзе
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Циркулирующая опухолевая ДНК не только потенциальный маркер для мониторинга больных с диагнозом злокачественной опухоли, но также может играть ключевую роль в выявлении раннего и/или пре-клинического рака. Учитывая то, что мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ) на поздних стадиях трудно излечим, и то, что практически универсальным его признаком является инактивация TP53, эта форма рака представлялась нам идеальным кандидатом для поиска методов ее ранней диагностики.

Задачи исследования. Поиск методов ранней диагностики МКРЛ.

Материалы и методы. Мы изучили частоту мутаций во внеклеточной ДНК в образцах плазмы крови от 51 пациента с диагнозом МКРЛ и 123 контрольных практически здоровых индивидуумов.

Результаты. Мутации в TP53 были обнаружены в 49 % образцов, полученных от пациентов с МКРЛ, и в 11,4 % образцов контрольных лиц. После стратификации всех случаев МКРЛ по стадиям оказалось, что в 35,7 % мутации TP53 встречались у пациентов с ранней стадией заболевания и в 54,1 % — с поздней стадией.

В дальнейшем наши результаты по контрольной группе были подтверждены при анализе дополнительной независимой серии 102 образцов, полученных от практически здоровых лиц, не имеющих онкологическо-

го диагноза. В этой серии образцов частота мутаций *TP53* была также довольно высокой и составила 10,8 %.

Выводы. Таким образом, обнаружение соматических мутаций *TP53* у 11 % из 225 условно здоровых лиц без онкологического диагноза позволяет предположить, что соматические мутации во внеклеточной ДНК среди «здорового» населения — распространенное и вполне обычное явление. Это наблюдение ставит под сомнение использование этого теста для скрининга и ранней диагностики рака.

Глобальное метилирование ДНК периферической крови и риск рака легкого у некурящих женщин

А. Ф. Мукерия, О. В. Шаньгина, М. В. Гаас,
Д. М. Максимович, А. М. Борода, Д. Г. Заридзе
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России,
Москва

Введение. Предполагается, что изменения в процессе глобального метилирования ДНК играют важную роль в развитии злокачественных опухолей, однако этот механизм пока недостаточно изучен.

Задачи исследования. Исследование связи между изменением в глобальном метилировании ДНК и риском развития рака легкого у некурящих женщин в 6 странах Центральной и Восточной Европы, в том числе в России, в рамках мультицентрового эпидемиологического исследования методом случай—контроль.

Материалы и методы. Оценивали уровень общего метилирования ДНК в периферической крови у 83 некурящих женщин с диагнозом рака легкого и у 181 женщины из контрольной группы. Анализ проводился с использованием метода люмометрического метилирования (LUMA).

Результаты. Выявлено, что изменения уровня LUMA ДНК не влияют на риск развития рака легкого у некурящих женщин. Также не было выявлено ассоциаций между различными уровнями метилирования ДНК в периферической крови и такими переменными, как возраст женщины, индекс массы тела, различные уровни потребления алкоголя или экспозиции к пассивному курению.

Выводы. Таким образом, наши результаты не подтверждают ранее существовавшее предположение о возможной связи между изменением уровня глобального метилирования ДНК и риском развития рака легкого у некурящих женщин.

Гипергомоцистеинемия у онкологических больных

К. А. Никифорова, А. В. Иванов, А. А. Кубатиев,
Е. И. Алексеева, Н. Е. Кушлинский

ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва;
ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Гомоцистеин — серосодержащая неотенная аминокислота, основной продукт метионинного цикла. Ключевыми для клетки в данном цикле являются уникальные реакции трансметилирования — перенос метильных групп с метионина на белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты и др. Недостаток доноров метильных групп или кофакторов этого цикла (витамины B_6 , B_9 , B_{12}) вызывает накопление гомоцистеина в клетках, что провоцирует окислительный стресс. Опухолевые клетки характеризуются высокой потребностью в аминокислотах и донорах метильных групп, что связано с высокими энергетическими потребностями. Поэтому внутриклеточное накопление гомоцистеина, связанное с синтезом и метилированием ДНК, может быть вовлечено в процесс канцерогенеза.

Задачи исследования. Определить и проанализировать уровни гомоцистеина в плазме крови больных раком молочной железы (РМЖ), колоректальным раком (КРР), раком почки и яичников.

Материалы и методы. В рамках работы проведен анализ 346 образцов плазмы крови до лечения у онкологических больных в различных стадиях опухолевого процесса, проходивших обследование и лечение в РОНЦ им. Н. Н. Блохина. У всех пациентов злокачественное новообразование выявлено впервые и подтверждено данными гистологического исследования опухоли. Из них: 64 образца — практически здоровые люди (группа контроля; 24 женщины и 40 мужчин в возрасте от 20 до 48 лет), 44 — рак почки (в возрасте 29—74 года), 20 — рак яичников (в возрасте 28—59 лет), 75 — КРР (в возрасте 31—81 год) и 142 — РМЖ (19—81 год). Все образцы плазмы исследованы методом капиллярного электрофореза с предварительной модификацией тиокарбонилдимидазолом.

Результаты. Показано, что средние уровни гомоцистеина в группах больных КРР ($11,0 \pm 3,6$ мкМ) и раком яичников ($9,8 \pm 3,7$ мкМ) статистически не отличались от контрольной группы ($10,2 \pm 3,7$ мкМ). У больных раком почки и РМЖ наблюдали повышенное содержание гомоцистеина в плазме ($12,5 \pm 4,4$ и $12,8 \pm 7,7$ мкМ соответственно). Во всех случаях его распределение при выявленных патологиях не носило нормальный характер, в отличие от контроля. Гипергомоцистеинемия (> 15 мкМ) наблюдали у 27 % больных раком почки и у 22 % больных РМЖ, что существенно выше, чем в контроле (4,7 %). Группы больных раком яичников и КРР занимали промежуточное место, в них доля больных с гипергомоцистеинемией составила соответственно 5 и 10 %.

Выводы. Обследованные группы онкологических больных характеризуются гетерогенностью по гомоцистеину плазмы крови. Поэтому необходимо дальнейшее исследование по выявлению факторов гипергомоцистеинемии при различных видах злокачественных новообразований.

Экспрессия CD133, N-кадгерина, TGF- α и карбоангидразы IX при почечно-клеточном раке

Д.Г. Пасечник, М.И. Коган, З.М. Ахохов, А.А. Гусев
Кафедра урологии и репродуктивного здоровья человека
с курсом детской урологии-андрологии ФПК и ППС
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный
медицинский университет» Минздрава России,
Ростов-на-Дону

Введение. Несмотря на прогресс в изучении молекулярной биологии почечно-клеточного рака (ПКР), эти новообразования остаются опухолями со сложно предсказуемым прогнозом. Это требует поиска новых маркеров, связанных с приобретением опухолевыми клетками способности к диссеминации и выживанию.

Задачи исследования. Оценить особенности экспрессии генов *CD133*, *N-кадгерина*, трансформирующего фактора роста (*TGF- α*) и карбоангидразы IX (*CA IX*).

Материалы и методы. Проанализированы 63 наблюдения ПКР различного гистологического строения: светлоклеточный вариант ($n = 36$), папиллярный вариант 1-го типа ($n = 14$), хромофобный вариант ($n = 13$). Иммуногистохимически в клетках опухоли выявляли CD133, N-кадгерин, TGF- α и CA IX, полуколичественно оценивали выраженность, распространенность и характер экспрессии этих молекул. Статистический анализ проводили на языке программирования R 3.1.0. Для оценки ассоциаций и значимых связей использовали отношение шансов, критерии χ^2 и Манна–Уитни, коэффициент ранговой корреляции Спирмена.

Результаты. Экспрессия исследуемых маркеров зависела от морфологической формы ПКР. CA IX обнаруживали только при светлоклеточном варианте ПКР, N-кадгерин и CD133 – только при светлоклеточном и папиллярном вариантах ПКР, TGF- α – в 100 % случаев папиллярного рака, 56,7 % наблюдений светлоклеточного варианта и 23,1 % наблюдений хромофобного варианта ПКР. Экспрессия N-кадгерина, CA IX, CD133 носила мембранный и цитоплазматический характер, TGF- α – преимущественно цитоплазматический характер. У пациентов с наличием инвазии ПКР в клетчатку и сосуды почечного синуса отмечена более высокая частота экспрессии CA IX ($p = 0,05$). При саркоматоидной трансформации ПКР отмечено повышение уровня мембранной экспрессии N-кадгерина. У больных с метастатическими формами ПКР выше экспрессия N-кадгерина ($p = 0,0039$) и CD133

($p = 0,045$). Выявлено, что при новообразованиях, сочетающихся с наличием дооперационного снижения скорости клубочковой фильтрации и артериальной гипертензией, выше экспрессия N-кадгерина в опухолевых клетках ($p = 0,017$). Экспрессию TGF- α наблюдали преимущественно при высоко- и умеренно-дифференцированных формах ПКР ($p = 0,002$).

Выводы. Характер экспрессии CD133, N-кадгерина, TGF- α и CA IX зависит от гистогенетической формы ПКР. Так, CA IX выявляли только при светлоклеточной форме ПКР, CA IX можно использовать как маркер для дифференциальной диагностики. Экспрессия CD133 и N-кадгерина определялась только при светлоклеточном и папиллярном вариантах ПКР, она коррелировала с развитием метастазов, что, возможно, указывает на значение изменения молекулярно-биологического фенотипа раковых клеток в прогрессии данных форм новообразований.

Корреляция уровней экспрессии эстрогеновых рецепторов α и β и их коэкспрессия в ткани немелкоклеточного рака легкого

Е.А. Пономаренко, Е.А. Дудко, Т.А. Богущ, Д.В. Новиков,
О.М. Рябинина, Е.А. Богущ, Б.Е. Полоцкий,
М.И. Давыдов, М.М. Давыдов
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
Москва

Введение. Неудовлетворительные результаты химиотерапии немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и высокая летальность при этом заболевании делают необходимым поиск новых путей его лечения. Ранее мы показали высокий уровень экспрессии эстрогеновых рецепторов β (ЭР β) в ткани НМРЛ, что указывает на перспективность развития антиэстрогеновой терапии этого заболевания.

Задачи исследования. В ткани НМРЛ одних и тех же пациентов исследовать экспрессию ЭР β , классических рецепторов эстрогенов – ЭР α и оценить корреляцию показателей экспрессии маркеров и частоту их коэкспрессии.

Материалы и методы. Иммунофлуоресцентным методом, сопряженным с проточной цитофлуориметрией, проанализированы 90 образцов НМРЛ. Используются антитела фирмы Abcam: первичные – к ЭР α (клон SP1), к ЭР β (клон 14C8) и вторичные – DyLight 650 (ab98510 и ab98729). Уровень экспрессии рассчитан в программе FlowJo 10.1 с помощью статистического критерия Колмогорова–Смирнова: высокий уровень – ЭР выявлены в ≥ 50 % клеток, средний – в 30–49 %, низкий – в 11–29 %. Для оценки зависимости уровней экспрессии ЭР обоих типов использовали коэффициент корреляции Спирмена (rs).

Результаты

1. Экспрессия ЭРβ выявлена во всех образцах НМРЛ, ЭРα – только в 89 % опухолей.

2. Медиана уровня экспрессии ЭРα в 2,3 раза меньше, чем ЭРβ, – 19 и 44 % соответственно.

3. Низкий уровень экспрессии ЭРα отмечен в 2,9 раза чаще, чем ЭРβ (70 и 24 %), высокий уровень – в 4,6 раза реже (11 и 47 %), а средний уровень – в 1,5 раза реже (19 и 29 %).

4. В 33 % опухолей с высоким уровнем экспрессии ЭРβ выявлена коэкспрессия ЭРα с высоким или средним уровнем маркера, в остальных – уровень ЭРα был низким (не превышал 29 %).

5. Показана умеренная корреляция экспрессии ЭРα и β ($r_s = 0,51$; 95 % доверительный интервал 0,4–0,76, $p = 0,03$).

Выводы

- НМРЛ является ЭР-положительной опухолью с более высокими показателями частоты и уровня экспрессии ЭРβ, чем ЭРα.
- Выявленная корреляция уровней экспрессии ЭРβ и ЭРα указывает на наличие общего механизма их регуляции в ткани НМРЛ, что согласуется с фундаментальными данными о корегуляции этих маркеров в культуре клеток.
- Считаем, что не менее половины больных НМРЛ с высоким уровнем экспрессии ЭРβ, и особенно пациенты с высоким или средним уровнем коэкспрессии в опухоли ЭРα, являются реальными претендентами на проведение антиэстрогеновой терапии (по аналогии с раком молочной железы – в адьювантном режиме).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 15-04-06991_а, № 16-34-01049_мол_а) и гранта Президента РФ № МК-7709.2016.7.

Зависимость уровня экспрессии лигандов белка PD1 от степени дифференцировки клеток линий меланомы человека

А.А. Рудакова, О.С. Бутова, В.А. Мисюрин, М.А. Барышникова
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Белки PD-L1 и PD-L2 связываются с рецептором PD1, экспрессированным на поверхности Т-клеток. Это приводит CD8⁺-Т-лимфоциты в состояние анергии, при которой данные клетки не осуществляют цитотоксическую функцию по отношению к клеткам-мишеням. Таким образом осуществляется защита тканей человека от аутоиммунных реакций. Однако экспрессия PD-L1 или PD-L2 на поверхности опухолевой клетки защищает ее от уничтожения Т-клетками. При метастатической меланоме прогноз забо-

левания во многом зависит от степени дифференцировки опухолевой клетки.

Задачи исследования. Установить зависимость уровня экспрессии PD-L1 и PD-L2 от степени дифференцировки клеток меланомы человека.

Материалы и методы. Использовали клеточные линии меланомы человека разной степени дифференцировки, полученные в лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей человека из опухолевого материала больных, проходивших лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Исследования проводили методом проточной цитометрии. Для интерпретации результатов использовали различные статистические методы: регрессионный анализ, U-тест и медианный тест.

Результаты. Выявлены отличия между линиями с высокой, средней и низкой степенью дифференцировки, разница в уровне экспрессии PD-L1 и PD-L2 не была статистически достоверной ($p = 0,1514$). При этом активность PD-L2 была незначительно выше активности PD-L1 ($p = 0,153$). При оценке взаимосвязи между уровнями экспрессии PD-L1 и PD-L2 оказалось, что при высоком уровне экспрессии PD-L1 наблюдается относительно меньший уровень экспрессии PD-L2, и наоборот (линейный коэффициент корреляции – 0,2291; $p = 0,0269$). Замечено, что наибольший уровень экспрессии PD-L1 характерен для некоторых низкодифференцированных линий. Интересно, что аффинность связывания PD-L1 с PD1 значительно выше аффинности связывания молекулы PD-L2 с PD1.

Выводы. Все исследованные линии меланомы человека потенциально способны инициировать анергию Т-клеток путем взаимодействия их с молекулой PD1. Некоторые низкодифференцированные линии, имеющие более высокий уровень экспрессии PD-L1, могут инициировать анергию более эффективно, чем все остальные.

Роль becl1n-зависимой аутофагии в защитном эффекте терафтала от токсичности доксорубина для клеток эритролейкоза K562

О.О. Рябая, Д.А. Хоченков, А.А. Малышева
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Важным механизмом защиты клеток от внешних факторов-стрессов и поддержания внутреннего гомеостаза клетки служит аутофагия. Известно, что внутриклеточными мишенями доксорубина (DOX) в опухолевых клетках являются белки митохондрий и эндоплазматического ретикулума, повреждение которых запускает процесс аутофагии. Ранее нами было установлено, что токсичность антрациклиновых антибиотиков для опухолевых клеток *in vitro* снижается в присутствии терафтала (натриевой соли 4,5-октакар-

боксифталоцианина кобальта, ТФ). Представляло интерес выяснить роль beclin-зависимой аутофагии с участием лизосом в механизме снижения токсичности DOX для опухолевых клеток в присутствии ТФ.

Задачи исследования. Выяснить влияние ТФ на способность DOX индуцировать белок beclin1 на уровне мРНК в клетках эритролейкоза линии K562; в условиях фармакологического ингибирования аутофагии хлороквином (CQ) оценить эффективность комбинации DOX с ТФ относительно клеток эритролейкоза линии K562.

Материалы и методы. В работе использована культура клеток эритролейкоза человека линии K562. Для оценки уровня (базального и в присутствии препаратов) экспрессии гена *beclin1* использовали метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени. Для оценки цитотоксической активности химиопрепаратов использован МТТ-метод. Морфологический фенотип клеток в присутствии и без препаратов изучали с помощью световой микроскопии на инвертированном микроскопе Leica DMIL на увеличении $\times 200$ и фотокамеры Canon 60D.

Результаты. По нашим данным, по сравнению с контрольными клетками базальный уровень экспрессии мРНК гена *beclin1* в присутствии DOX (5 мкМ, 10 ч инкубации) в клетках K562 увеличивается в 2 раза и не изменяется при комбинации антибиотика с ТФ (20 мкМ). В условиях фармакологического ингибирования аутофагии CQ (20 мкМ) цитотоксичность DOX возрастает в 2 раза. Однако в этих же условиях блокада аутофагии CQ не влияет на эффективность комбинации DOX с ТФ. Обнаружено, что в отличие от морфологических изменений клеток, вызванных DOX, в условиях комбинированного воздействия DOX с ТФ в популяции эритробластов линии K562 появляются варианты клеток со специфической деформацией поверхности. Высказывается предположение, что деформация поверхности клеток, вызванная комбинацией DOX с ТФ, является следствием повреждения актинового цитоскелета и может отражать специфический процесс гибели, что требует дальнейших исследований.

Выводы. Beclin-лизосомальный путь аутофагии не участвует в механизме снижения токсичности DOX для клеток лейкоза линии K562 в присутствии ТФ.

Исследование эффективности соединения T1023 в защите нормальных тканей

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

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, Обнинск

Введение. В настоящее время лучевая терапия является одним из основных методов лечения злокачественных новообразований. Несмотря на совершенствование методов и технологий лучевой терапии, возникновение и лечение лучевых повреждений является крайне сложной проблемой. Имеющиеся немногочисленные и малоэффективные препараты пока не обеспечивают удовлетворительного решения данной проблемы вследствие своей токсичности и низкой переносимости онкобольными. Одним из рациональных путей снижения инвалидизации онкологических пациентов может стать использование в лучевой терапии средств, селективно защищающих здоровые ткани. Значительный интерес в этом плане могут представлять вазоактивные радиопротекторы.

Задачи исследования. Изучение радиозащитных свойств нового оригинального производного изотиомочевинны T1023 на экспериментальной модели асцитной карциномы Эрлиха.

Материалы и методы. Исследования проведены на беспородных белых мышах-самках массой 22–26 г. В качестве опухолевой модели в работе использована перевиваемая асцитная карцинома Эрлиха. Животных подвергали облучению γ -лучами ^{60}Co на установке «Луч-1» в области правого бедра в дозе 30 Гр. Части животных опытных групп за 30 мин до облучения вводили вещество T1023 (однократно, внутривентриально, 75 мг/кг). Оценивали динамику роста опухоли и тяжесть острых лучевых реакций кожи по классификации RTOG/EORTC-95.

Результаты. Соединение T1023 не снижало эффективности радиотерапии опухоли, при этом его влияние на тяжесть лучевых повреждений было отчетливым. У группы животных, получавших облучение в дозе 30 Гр, тяжесть лучевых повреждений нарастала: эритема и сухой эпидермит (I и II степень лучевой реакции) сменились влажным эпидермитом с язвами (III и IV степень лучевой реакции). У мышей, которым перед облучением вводили T1023, после облучения наблюдалось усиление лучевой реакции лишь у небольшой части животных, при этом III и IV степени лучевых повреждений не отмечено.

Выводы. Соединение T1023 при локальном облучении мышей в дозе 30 Гр обладает способностью проявлять противолучевые свойства, что требует более глубоких исследований. На основании полученных

результатов становится возможной разработка новых химических средств и методик защиты здоровых тканей.

RAS/BRAF-тестирование при метастатическом раке кишечника в Республике Беларусь

С.Ю. Смирнов, К.Н. Батура, М.В. Якимова, Т.А. Чехович, Е.А. Гутковская, А.М. Пашкевич, И.В. Ануфриенко, Ю.В. Гуляева, Е.И. Субоч, Р.М. Смолякова, В.Т. Кохнюк
 ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», агрогородок Лесной, Минский район

Введение. Известно, что молекулярно-генетические особенности рака кишечника могут влиять на прогноз заболевания и чувствительность к химиотерапии. Наличие в образцах опухолевой ткани или метастазах пациентов с колоректальным раком (КРР) мутаций в генах *KRAS/NRAS* (*RAS*) является предиктором отсутствия ответа на лечение EGFR-ингибиторами, а наличие мутации V600E в гене *BRAF* ассоциировано с неблагоприятным прогнозом заболевания.

Задачи исследования. Оценить особенности *RAS/BRAF*-тестирования, а также частоту встречаемости мутаций в данных генах при метастатическом раке кишечника в Республике Беларусь.

Материалы и методы. В исследование включено 129 пациентов с метастатическим раком кишечника, которым в период с августа 2013 по июль 2016 г. проведено *RAS/BRAF*-тестирование методом автоматического секвенирования по Сэнгеру на базе РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова.

Результаты. Частоты тестирования различных экзонов генов *RAS* и *BRAF* составили: экзон 2 *KRAS* ($n = 129$; 100 %), экзоны 2, 3, 4 *KRAS* ($n = 93$; 72,1 %), экзоны 2, 3, 4 *KRAS/NRAS* ($n = 87$; 67,4 %), экзоны 2, 3, 4 *KRAS/NRAS* и экзон 15 гена *BRAF* ($n = 14$; 10,9 %). Частота *RAS*-тестирования увеличилась на 60 % в 2015–2016 гг. ($n = 81$) в сравнении с 2013–2014 гг. ($n = 48$). Спектр исследуемых экзонов генов *RAS* и *BRAF* увеличился с экзона 2 гена *KRAS* в 2013–2014 гг. до *RAS*-тестирования (экзоны 2, 3, 4 *KRAS/NRAS*) в 2015 г. и *RAS/BRAF*-тестирования в 2016 г.

Мутации в генах *RAS* и *BRAF* обнаружены у 50 (38,8 %) пациентов. Частота встречаемости мутаций в различных экзонах генов *RAS* и *BRAF* составила: экзон 2 *KRAS* ($41/129 = 31,8$ %), экзон 3 *KRAS* ($2/93 = 2,1$ %), экзон 4 *KRAS* ($2/93 = 2,1$ %), экзон 2 *NRAS* ($3/87 = 3,4$ %), экзон 3 *NRAS* (0 %), экзон 4 *NRAS* (0 %), экзон 15 *BRAF* ($2/14 = 14,3$ %). Общая частота встречаемости мутаций в указанных генах увеличилась с 31 % в 2013–2014 гг. до 43,2 % в 2015–2016 гг.

Медиана количества календарных дней между датой получения образца лабораторией, где проводилось

тестирование, и датой выдачи результатов исследования составила: экзон 2 *KRAS* в 2013–2014 гг. (5; с 3 до 8), *RAS/BRAF*-тестирование в 2015–2016 гг. (10; с 6 до 16).

Выводы. Частота и спектр выявленных мутаций в генах *RAS* и *BRAF* соответствуют данным литературы. Увеличение числа тестируемых экзонов генов *RAS* в соответствии с международными рекомендациями позволяет более точно выделять группу пациентов с метастатическим раком кишечника, потенциально чувствительных к терапии EGFR-ингибиторами. Проведение *BRAF*-тестирования пациентам с колоректальным раком является одной из новых рекомендаций ESMO, опубликованной в 2016 г.

Клиническая характеристика факторов роста фибробластов 1-го и 2-го типов в сыворотке крови больных саркомами костей

Е.А. Тен, А.В. Бондарев, М.Ю. Щупак, И.В. Бабкина, Ю.Н. Соловьев, А.Н. Махсон

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

ГАУЗ г. Москвы «Московская городская онкологическая больница № 62 Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

Введение. Экспериментально доказано, что факторы роста фибробластов (FGF) участвуют в дифференцировке клеток.

Задачи исследования. Анализ содержания FGF-1 и FGF-2 в сыворотке крови больных злокачественными новообразованиями костей и их взаимосвязи с основными клинико-морфологическими характеристиками опухолей.

Материалы и методы. Обследовали 105 пациентов в возрасте от 15 до 69 лет с саркомами костей: типичная остеосаркома ($n = 32$), паростальная остеосаркома ($n = 5$), периостальная остеосаркома ($n = 1$), хондросаркома ($n = 32$), саркома Юинга ($n = 26$), недифференцированная плеоморфная саркома ($n = 9$). Группу контроля составили 26 лиц в возрасте от 16 до 65 лет. Сывороточные уровни FGF-1 и FGF-2 определяли методом иммуноферментного анализа до лечения (R&D, США).

Результаты. Уровни FGF-1 в сыворотке крови больных саркомами костей колебались от 0 до 590 пг/мл (медиана 39,4 пг/мл); в образцах контрольной группы – от 0 до 98,4 пг/мл (19 пг/мл). Верхняя граница референсного 95 % доверительного интервала у практически здоровых лиц составила 86,3 пг/мл. За нулевые значения принято содержание FGF-1 < 13,9 пг/мл. Отличные от нуля уровни FGF-1 чаще выявляли в сыворотке крови у больных саркомами костей (65,7 %), чем в контроле (26,9 %; $p < 0,001$). Концентрации FGF-2 у больных саркомами костей колебались от 4,4 до 206 пг/мл

(16,3 пг/мл), а в группе контроля – от 4,9 до 62,8 пг/мл (11,9 пг/мл). Не обнаружили достоверной корреляционной связи между уровнями FGF-1 и FGF-2 в крови здоровых ($r = -0,57$; $p = 0,18$) и больных саркомами костей ($r = 0,04$; $p = 0,7$). При типичной остеосаркоме 5-летняя общая выживаемость (ОВ) при нулевом содержании FGF-1 равнялась 83,3 %, при значимых уровнях маркера она была в 1,7 раза ниже (49,7 %; $p = 0,019$). Не выявили взаимосвязи между уровнями FGF-2 и ОВ больных типичной остеосаркомой. При саркоме Юинга показатели 5-летней ОВ не зависели от уровня FGF-1. Максимальные показатели 5-летней ОВ у больных саркомой Юинга отметили при содержании FGF-2 < 10 пг/мл (80 %), минимальные (20,8 %) при уровнях FGF-2 > 27 пг/мл ($p = 0,032$). Не установлено связи между содержанием сывороточных FGF и прогнозом у больных хондросаркомой.

Выводы. Уровни FGF-1 выявлены в сыворотке крови у 65,7 % больных саркомами костей и у 26,9 % практически здоровых лиц ($p < 0,0001$). При выявлении значимых уровней FGF-1 в сыворотке крови больных типичной остеосаркомой 5-летняя ОВ была в 1,7 раза ниже, чем при его отсутствии ($p = 0,01$). Уровни FGF-1 > 20 пг/мл, FGF-2 > 16 пг/мл в сыворотке крови больных саркомой Юинга сочетались с низкими показателями их 5-летней ОВ.

Матриксная металлопротеиназа 7-го типа в сыворотке крови и опухолях больных с доброкачественными, пограничными и злокачественными новообразованиями яичников

И. В. Терешкина, Д. Н. Кушлинский, Е. С. Герштейн,
В. Д. Ермилова, Л. В. Адамян

ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А. И. Евдокимова»
Минздрава России, Москва;

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

Введение. Разрушение базальной мембраны и внеклеточного матрикса ассоциированными с опухолью протеазами считают одним из ключевых молекулярных механизмов прогрессии злокачественных новообразований, в том числе и рака яичников. Одним из основных регуляторов инвазии и метастазирования считается матриксная металлопротеиназа 7-го типа (ММП-7, матрилизин), единственная металлопротеиназа, синтезируемая непосредственно опухолевыми клетками.

Задачи исследования. Сравнительный анализ содержания ММП-7 в сыворотке крови и опухолях боль-

ных раком, пограничными и доброкачественными новообразованиями яичников.

Материалы и методы. В исследование включены 88 больных в возрасте от 23 до 68 лет с различными новообразованиями яичников: рак ($n = 55$), пограничные опухоли ($n = 10$), доброкачественные ($n = 23$). Содержание ММП-7 в сыворотке крови и экстрактах опухолей до лечения определяли методом иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы R&D (США).

Результаты. В качестве порогового уровня ММП-7 в сыворотке крови был выбран показатель 4,7 нг/мл, соответствующий 95-му перцентилю контроля. Частота выявления уровней ММП-7 $\geq 4,7$ нг/мл составила у пациенток с доброкачественными, пограничными и злокачественными опухолями 41, 70 и 78 % соответственно ($p = 0,0001$). Содержание ММП-7 в сыворотке крови больных доброкачественными новообразованиями яичников положительно коррелировало с возрастом пациенток ($rs = 0,61$; $p = 0,003$). Наибольшие уровни ММП-7 обнаружены в крови больных раком яичников с низкой степенью дифференцировки опухоли и при серозном ее варианте. Сывороточные уровни ММП-7 у больных раком яичников были достоверно взаимосвязаны со стадией заболевания ($p = 0,01$). Медиана содержания ММП-7 в опухоли составила 1,0 нг/мг белка при доброкачественных, 7,7 нг/мг белка при пограничных опухолях и 3,0 нг/мг белка при раке яичников. Выявлена достоверная положительная взаимосвязь между содержанием ММП-7 в сыворотке крови и опухоли у больных раком яичников ($rs = 0,32$; $p = 0,02$) и пограничными опухолями, тогда как при доброкачественных новообразованиях такая зависимость не выявлена.

Выводы. Уровни ММП-7 в сыворотке крови больных раком яичников достоверно выше, чем в контроле, при доброкачественных и пограничных опухолях, однако диагностическая ценность маркера для выявления рака яичников недостаточна. Показатели ММП-7 в опухоли и сыворотке крови больных раком яичников достоверно связаны, что может указывать на опухолевое происхождение ММП-7, циркулирующей в периферической крови.

Новые мутации в гене кальретикулина CALR при диагностике миелолипролиферативных заболеваний

В. В. Тихонова¹, Ю. П. Финашутина¹, Л. А. Кесаева¹,
Н. Н. Касаткина¹, Е. Н. Пушкова², Е. Н. Мисюрин^{1,2},
А. В. Мисюрин¹

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

²ООО «ГеноТехнология», Москва;

³ГБУЗ «Городская клиническая больница № 52»
Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва

Введение. Соматические мутации в экзоне 9 гена кальретикулина (*CALR*) встречаются примерно в 70 % случаев *Jak2*- и *MPL*-негативной эссенциальной тромбоцитемии (ЭТ) и первичного миелофиброза (ПМФ) и рекомендуются в качестве обязательного анализа для подтверждения диагноза миелопролиферативного заболевания (МПЗ). Мутации экзона 9 гена *CALR* включают инсерции и делеции, вызывающие сдвиг рамки считывания, а также точечные мутации. Наиболее часто встречающиеся варианты: мутация 1-го типа — делеция 52 пар нуклеотидов (п. н.) (с.1092_1143del (p.L367fs*46)) и мутация 2-го типа — инсерция 5 п. н. TTGTC (с.1154_1155insTTGTC (p.K385fs*47)).

Задачи исследования. Изучить частоту встречаемости мутаций в гене *CALR* у пациентов с подозрением на *Jak2*- и *MPL*-негативные ЭТ и ПМФ, описать новые мутации, разработать быстрый и точный метод молекулярной диагностики самых распространенных мутаций.

Материалы и методы. Из гранулоцитов периферической крови 97 пациентов с предварительными диагнозами ЭТ или ПМФ была выделена ДНК. Отсутствие мутаций в генах *Jak2* и *MPL* исследовалось с помощью стандартной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в реальном времени. Наличие мутаций в гене *CALR* исследовали с помощью стандартной ПЦР, ПЦР в реальном времени и секвенирования по Сэнгеру.

Результаты. Из 97 больных МПЗ мутации в гене кальретикулина были выявлены у 32 человек. Из них 18 имели делецию 52 п. н. (1-й тип), 8 — инсерцию 5 п. н. (2-й тип). Еще у 6 были обнаружены другие варианты мутаций экзона 9 гена *CALR*: делеция 31 п. н.; делеция 47 п. н. + инсерция 1 нуклеотида А; делеция 45 п. н.; делеция 10 п. н.; инсерция 6 пн и делеция 1 нуклеотида А; инсерция 8 п. н. Учитывая, что мутации 1-го и 2-го типов были обнаружены у 81 % пациентов с мутированным геном *CALR*, мы разработали метод детекции этих мутаций на основе ПЦР в реальном времени. Специфичность этого метода была подтверждена прямым секвенированием фрагментов ДНК гена *CALR* при чувствительности метода 10 копий мутантного гена на реакцию.

Выводы. Мутации разного типа в экзоне 9 гена *CALR* могут быть ассоциированы с разным прогнозом течения МПЗ, поэтому точная детекция и выявление новых вариантов мутаций очень важны для дифференциальной диагностики и мониторинга лечения. Разработанные в данном исследовании методики определения мутаций в гене *CALR* могут быть использованы для диагностики МПЗ, а также для оценки ответа пациента на проводимую терапию.

Анализ статуса мутаций *EGFR* при аденокарциноме легкого

Е. В. Федорова, Д. М. Вьюшков, С. Б. Глатко

БУЗОО «Клинический онкологический диспансер», Омск

Задачи исследования. Определить частоту мутации в гене *EGFR* у пациентов с аденокарциномой легкого, выявив наиболее характерные закономерности для групп больных.

Материалы и методы. В исследование включено 108 пациентов в возрасте 34–78 лет с аденокарциномой легкого после хирургического лечения в клинике. Мужчин было 55, женщин — 53. Некурящих — 35 пациентов, из них курили ранее 24, курящих — 29 пациентов. Материал для исследования — «архивные блоки» с образцами опухолевой ткани, полученными после операции. В качестве источника опухолевой ткани использовали как первичное новообразование, так и метастаз (лимфатический узел). Критерий отбора больных: аденокарцинома легкого с содержанием не менее 20 % опухолевых клеток в образце. Выделение ДНК проводили вручную с помощью набора sobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche, Швейцария). Для анализа использовали 1 срез толщиной 5 мкм. Определение мутационного статуса опухоли проводили с помощью набора Therascreen® *EGFR* RGQ PCR Kit (QIAGEN, Германия), предназначенного для выявления 29 мутаций в онкогене *EGFR* (19 делеций в экзоне 19; T790M; L858R; L861Q; G719X (выявляет G719S, G719A или G719C, но не различает); S768I; 3 инсерции в экзоне 20). Анализ проводили методом ПЦР и детекцией результатов в режиме реального времени на приборе Rotor-Gene Q.

Результаты. В 23 (21,3 %) наблюдениях выявлены активирующие мутации в гене *EGFR*. Из них 95 % приходится на делеции в экзоне 19 и точечные замены в экзоне 21 (L858R). Опухоли с подобными мутациями характеризуются хорошим ответом на терапию ингибиторами тирозинкиназ. В 1 случае была выявлена инсерция в экзоне 20 (обуславливает устойчивость к ингибиторам тирозинкиназ). Из 53 обследованных женщин мутации выявлены в 20 (37,7 %) случаях, а из 55 мужчин — только у 3 (5,45 %). Из 35 некурящих пациентов мутации в гене *EGFR* выявлены у 57,1 %. Из 24 пациентов, которые курили ранее, положительный *EGFR*-статус наблюдался в 12,5 %. Среди 29 курящих пациентов исследуемые мутации не выявлены.

Выводы. Таким образом, частота встречаемости мутаций *EGFR* у пациентов с аденокарциномой легкого в нашем исследовании составила 21,3 %. Большая часть выявленных мутаций является показанием к применению ингибиторов тирозинкиназ *EGFR*. Опухоли, несущие мутированный ген *EGFR*, чаще наблюдаются у женщин и у пациентов с отрицательным статусом курения.

Исследование проводилось при поддержке Российского общества клинической онкологии RUSSCO и компании АстраЗенка.

МикроРНК miR-199a-5p, miR-199a-3p и miR-32-5p дифференциально экспрессируются в плазме крови больных остеосаркомой и здоровых лиц

М.Л. Филипенко, А.Н. Ширшова, Д.Н. Шамовская,
Ю.С. Тимофеев, М.Д. Алиев, Н.Е. Кушлинский
ФГБУН «Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск;
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
Москва

Введение. МикроРНК – семейство коротких рибонуклеиновых кислот длиной 19–24 нуклеотидов, выполняющих функцию посттранскрипционного регулятора экспрессии целевых генов и играющих критичную роль в онкогенезе. Известно, что каждая микроРНК может участвовать в регуляции множества белоккодирующих генов и, наоборот, структурный ген обычно представляет мишень для целого набора микроРНК. При этом микроРНК играют критичную роль в клеточной дифференцировке, пролиферации, подвижности, адгезии, апоптозе, ангиогенезе, ответе на стресс и других фундаментальных биологических процессах, связанных с развитием и прогрессией новообразований. Они могут подавлять экспрессию важных онкозначимых генов и функционировать и как супрессоры опухолевого роста, и как онкогены. Ранее в ряде работ было показано, что miR-32 и miR-199a могут участвовать в регуляции пролиферации клеток остеосаркомы, и сделано предположение, что эти микроРНК могут представлять собой потенциальные биомаркеры в диагностике и оценке прогноза этого типа опухолей.

Задачи исследования. Оценить уровень экспрессии miR-199a-5p, miR-199a-3p и miR-32-5p в плазме крови больных остеосаркомой и здоровых людей.

Материалы и методы. В исследование вошли 25 образцов плазмы крови доноров и 13 пациентов с остеосаркомой, предоставленных РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Количественный анализ микроРНК в плазме крови был выполнен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и с применением модифицированной в процессе исследования «цифровой» ПЦР.

Результаты. Показано, что уровень miR-199a-5p, miR-199a-3p статистически значимо понижен ($p = 10^{-6}$), а miR-32-5p повышен ($p = 3 \times 10^{-4}$) в плазме крови больных остеосаркомой. Цифровая ПЦР с выявлением miR-32-5p с Taq-man зондом, меченным флуорофором FAM, и miR-199a-5p с флуорофором HEX позволила провести высокоточное дуплексное выявление исследуемых микроРНК с увеличением чувствительности анализа за счет использования неразведенной кДНК (реакционной смеси) в качестве матрицы.

Выводы. Соотношение уровня miR-32-5p/miR-199a-5p, выявляемое в плазме крови методом полиаденирования и обратной транскрипции со специфическими олигонуклеотидными праймерами и последующей дуплексной цифровой ПЦР, является потенциальным неинвазивным биомаркером остеосаркомы. Требуется дальнейшая клиническая валидация на независимых группах пациентов.

Исследование поддержано грантом № 153 Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий».

Возможности и перспективы биохимической диагностики нейроэндокринных опухолей

Н.В. Любимова, Ю.С. Тимофеев, Т.К. Чурикова, М.Г. Томс
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Современная диагностика нейроэндокринных опухолей (НЭО) основывается на исследовании продуцируемых опухолевыми клетками соединений (пептиды, амины, гормоны).

Задачи исследования. Анализ клинической значимости хромогранина А (ХгА), серотонина и его метаболита 5-гидроксииндолилуксусной кислоты (5-ГИУК) в качестве биохимических маркеров НЭО при их сравнительном определении в сыворотке крови и моче больных опухолями нейроэндокринной природы и практически здоровых людей. Оценка биохимических маркеров в качестве факторов прогноза НЭО.

Материалы и методы. Определение ХгА и серотонина в сыворотке крови и 5-ГИУК в суточной моче выполнено у 330 больных НЭО легкого, поджелудочной железы, желудка, тонкой и толстой кишки, а также у 115 практически здоровых мужчин и женщин иммуноферментным анализом на основе тест-систем Chromogranin A ELISA kit (Dako A/S, Дания), Serotonin ELISA и 5-HIAA ELISA (IBL International, Германия).

Результаты. При всех локализациях НЭО уровни ХгА достоверно ($p < 0,000001$) превышали соответствующий показатель контроля, для серотонина и 5-ГИУК достоверные различия были получены во всех группах, за исключением НЭО желудка. Установлена зависимость концентрации маркеров от распространенности и биологической активности НЭО, уровни которых были достоверно выше у больных с наличием метастазов в печени и при карциноидном синдроме по сравнению с пациентами без соответствующих клинических характеристик опухолевого процесса. Оценку диагностической значимости ХгА, серотонина и 5-ГИУК проводили с учетом пороговых уровней, рассчитанных по результатам их определения в контрольной группе (соответственно 33 Ед/л, 320 нг/мл, 60 мкмоль/сут).

Продемонстрирована высокая диагностическая чувствительность ХгА, которая в целом по группе больных НЭО составила 80,6 % при специфичности 98,5 %. Серотонин и 5-ГИУК проявляли сравнимую диагностическую чувствительность только у пациентов с карциноидным синдромом (72,5 и 60,3 %). Прослежена связь выживаемости без прогрессирования у 37 больных НЭО с секрецией ХгА до лечения препаратом афинитор. Уровни ХгА более 100 Ед/л были достоверно ассоциированы с менее благоприятным прогнозом: 1-летняя выживаемость без прогрессирования была достоверно ниже (13,7 %), чем при умеренной секреции ХгА (66 %).

Выводы. Полученные данные подтверждают высокую эффективность ХгА как универсального маркера НЭО, определение которого способствует повышению точности диагностики, оценки распространенности и прогноза опухолей нейроэндокринной природы. Серотонин и 5-ГИУК применимы как маркеры карциноидного синдрома.

Изучение ингибиторов и активаторов плазминогена в опухолях щитовидной железы

Т.Ю. Харитиди, И.А. Казанцева

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;
ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва

Введение. Центральное место в проблеме своевременной диагностики и оценки прогноза опухолей ряда локализаций занимает система активации плазминогена — многокомпонентный каскад протеолитических реакций, участвующих в разрушении базальной мембраны и внеклеточного матрикса окружающих опухоль тканей, что способствует образованию метастазов. Главную роль в этих процессах играют сериновые протеазы — активаторы плазминогена урокиназного (uPA) и тканевого (tPA) типа и 2 специфических ингибитора PAI-1 и PAI-2. Роль ингибиторов, в частности PAI-1, может сводиться не только к подавлению метастазирования и инвазии, но и к распространению опухолевого процесса, поэтому высокий уровень ингибитора PAI-1 является неблагоприятным прогностическим фактором. Высокие концентрации uPA в тканях считают признаком плохой общей и безрецидивной выживаемости при некоторых опухолях. Высокие значения tPA, наоборот, коррелируют с хорошей общей и безрецидивной выживаемостью.

Задачи исследования. Сравнительная оценка показателей активности uPA и tPA и их ингибитора (PAI-1) при раке, аденоме и гиперпластических процессах щитовидной железы с учетом основных морфологических и клинических характеристик заболевания.

Материалы и методы. Определение уровней tPA, uPA и PAI-1 проводили иммуноферментным методом (ELISA) в цитозольных фракциях тканей железы у 146 больных: рак щитовидной железы (РЩЖ) — у 44, аденома щитовидной железы (АЩЖ) — у 18, узловой коллоидный зоб (УЗК) в сочетании с аденоматозом — у 19; УЗК без аденоматоза — у 43; диффузный токсический зоб (ДТЗ) с аденоматозом — у 9; ДТЗ без аденоматоза — у 13 пациентов. У всех больных диагноз установлен впервые и подтвержден данными гистологического исследования.

Результаты. При РЩЖ выявили самые низкие уровни tPA ($1,51 \pm 0,22$ нг/мг белка) по сравнению с другими группами больных (УЗК с аденоматозом, $p = 0,04$; УЗК, $p = 0,02$; ДТЗ с аденоматозом, $p = 0,06$; ДТЗ, $p = 0,02$; АЩЖ, $p = 0,04$) и самые высокие уровни uPA ($0,69 \pm 0,15$ нг/мг белка) (УЗК, $p = 0,02$; ДТЗ с аденоматозом, $p = 0,03$; ДТЗ, $p = 0,02$; АЩЖ, $p = 0,02$), как и PAI-1 ($0,91 \pm 0,16$ нг/мг белка).

Выводы. Полученные результаты указывают на потенциальную возможность использования маркеров uPA, tPA, PAI-1 для оценки риска малигнизации при гиперплазии и доброкачественных новообразованиях щитовидной железы.

Связь эффективности химиотерапии с особенностями экспрессии белка Р-гликопротеина (ABCB1) у больных люминальным В и трижды негативным субтипами рака молочной железы

К.Ю. Христенко, С.В. Вторушин, Н.В. Крахмаль, М.В. Завьялова

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск;
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

Введение. На сегодняшний день лечение рака молочной железы отличается мультимодальностью и комплексностью подходов, включающих неoadъювантную химиотерапию. Особое значение этот вид терапии имеет для люминального В и трижды негативного субтипов опухоли, чувствительных к цитостатическим препаратам. Но все чаще в своей практике онкологи сталкиваются с таким феноменом, как множественная лекарственная устойчивость. Одним из механизмов развития резистентности является активация трансмембранных белков ABC-транспортеров, в частности Р-гликопротеина (ABCB1).

Задачи исследования. Изучение связи особенностей экспрессии ABCB1 в клетках опухоли и в строме с эффективностью неoadъювантной химиотерапии у боль-

ных люминальным В и трижды негативным субтипами рака молочной железы.

Материалы и методы. В исследование включен биопсийный материал от 91 пациентки с инвазивным раком молочной железы, которые в дальнейшем получали неoadъювантную химиотерапию. Изготовление гистологических препаратов и иммуногистохимическое исследование осуществляли по стандартной методике. Чувствительность опухоли к химиотерапии определялась с помощью системы RECIST. Был проведен анализ связи ответа опухоли на химиотерапию с особенностями экспрессии ABCB1. Применяли дисперсионный анализ и критерий χ^2 , корреляционно-регрессионный анализ по Спирмену.

Результаты. Исследование эффектов неoadъювантной химиотерапии в зависимости от наличия мембранной экспрессии Р-гликопротеина показало, что в 79 % случаев с отсутствием мембранной экспрессии данного белка у пациенток наблюдалась полная или частичная регрессия опухоли от проводимого лечения ($p = 0,002$). При наличии экспрессии данного белка эффективность химиотерапии коррелировала с долей окрашенных клеток в опухоли. Наибольшие показатели мембранной экспрессии ABCB1 наблюдали при прогрессировании заболевания, наименьший процент позитивно окрашенных клеток выявляли в группе больных с полной морфологической регрессией новообразования ($r = 0,23$; $p = 0,03$). Установлено, что экспрессия Р-гликопротеина в клетках воспалительного инфильтрата связана с эффективностью химиотерапии ($\chi^2 = 4,2$; $p = 0,004$), но не связана с его экспрессией в стромальных элементах ($p = 0,06$).

Выводы. Таким образом, установлено, что эффективность химиотерапии зависит от наличия мембранной экспрессии Р-гликопротеина и степени выраженности его экспрессии опухолевыми клетками, а также наличия экспрессии указанного белка в клетках воспалительного инфильтрата первичной опухоли.

Исследование поддержано грантом Президента РФ (№ 14.W01.16.9084-МД от 14.03.2016).

Генетические особенности увеальной меланомы

И.В. Цыганова, В.В. Назарова, И.А. Утяшев, К.В. Орлова, Д.В. Мартынков, Н.Н. Мазуренко

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

Введение. Увеальная меланома (УМ) составляет 3,7–5 % всех случаев меланомы и возникает при трансформации меланоцитов сосудистой оболочки глазного яблока (хориоидеи) (80 %), реснитчатого (цилиарного) тела (15 %) или радужки. Основные молекулярные нарушения при УМ состоят в активации митогенактивированных протеинкиназ MEK и ERK вследствие мутации в *GNAQ* или *GNA11*, кодирующих альфа-субъединицы гетеротримерных G-белков, участвующих

в регуляции дифференцировки меланоцитов. Реже в меланоме хориоидеи встречаются мутации *KIT*, а в меланоме радужки — *BRAF*. Анализ мутаций онкогенов необходим для выбора тактики лечения УМ и назначения препаратов таргетной терапии.

Задачи исследования. Анализ мутаций онкогенов в УМ и изучение выживаемости пациентов с мутациями различных драйверных генов.

Материалы и методы. Исследовали опухолевую ДНК, полученную с помощью макродиссекции парафиновых срезов первичных опухолей (11 %) или метастазов (89 %) от 65 пациентов с УМ. Мутации в генах *GNAQ* (экзон 5), *GNA11* (экзон 5), *KIT* (экзоны 11, 13, 17), *BRAF* (экзон 15) или *NRAS* (экзон 2) определяли секвенированием.

Результаты. Большинство пациентов с УМ — женщины (68 %), средний возраст постановки диагноза — 53 года, 40 % больных моложе 50 лет. В 80 % УМ выявлены мутации *GNAQ* (40 %) и *GNA11* (40 %), при этом в *GNAQ* доминируют замены Q209P (85 %), а в *GNA11* — замены Q209L (92 %). Кроме того, в 3 (4,6 %) образцах УМ выявлены мутации в экзоне 11 *KIT*, в 1 меланоме цилиохориоидальной зоны — мутация *BRAF*, а иридоцилиарной зоны — *NRAS*. Частота мутаций *GNAQ* и *GNA11* одинакова в разных возрастных группах. Мутации *GNAQ* чаще обнаружены в первичных УМ и в 60 % опухолей с веретеночлеточным фенотипом. Пятилетняя безрецидивная выживаемость при УМ составила 70 % и не зависела от типа мутации *GNAQ/GNA11*. Метастазирование через 10 лет наступило у 20 % пациентов с мутацией *GNAQ* и 30 % — с мутацией *GNA11*.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют, что УМ характеризуется молекулярной гетерогенностью. Для лечения УМ с мутацией *GNAQ/GNA11* или *NRAS* возможно применение ингибитора MEK селуметиниба, для лечения УМ с мутацией *KIT* применяют иматиниб, а для лечения меланомы с мутацией *BRAF* возможно применение дабрафениба.

Матриксные металлопротеиназы и их тканевой ингибитор 1-го типа в сыворотке крови больных опухолями костей

И.С. Черномаз, И.В. Бабкина, Е.С. Герштейн, И.В. Булычева, Ю.Н. Соловьев

ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва;

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

Введение. Саркомы костей — агрессивные злокачественные опухоли, склонные к быстрому метастазированию, при этом известно, что в механизмах инвазии и метастазирования опухолей активное участие принимают матриксные металлопротеиназы (ММП).

Задачи исследования. Анализ содержания ММП-2, ММП-7, ММП-9 и их тканевого ингибитора ТИМП-1 в сыворотке крови больных первичными опухолями костей.

Материалы и методы. Обследовали 54 больных с различными гистологическими вариантами опухолей костей в возрасте от 14 до 59 лет. ТИМП-1 определяли в сыворотке крови до лечения методом иммуноферментного анализа (Biosource, США), ММП-2, ММП-7, ММП-9 (R&D, США). Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Statistica 8 (Statsoft, США).

Результаты. Показано, что медианы ММП-2 в сыворотке крови у практически здоровых людей (196 нг/мл) и больных опухолями костей (160 нг/мл) не различались и не зависели от гистологического строения опухоли. Не выявлено достоверных различий в сывороточных уровнях ММП-7 между больными опухолями костей и контрольной группой. Однако при анализе значений маркера с учетом гистологического строения опухоли достоверные отличия отмечены в уровне ММП-7 между пациентами с гигантоклеточными опухолями (3,4 нг/мл) и саркомой Юинга (2,6 нг/мл; $p < 0,05$). Обнаружено достоверное повышение содержания ММП-9 в сыворотке крови в контроле (501 нг/мл) относительно общей группы (377 нг/мл; $p < 0,05$). Отмечены достоверные различия в содержании ММП-9 между больными хондросаркомой (311 нг/мл) и периостальной остеосаркомой (552 нг/мл; $p < 0,05$). Сывороточные уровни ТИМП-1 не зависели от пола, возраста, локализации и размера опухолей костей. Медианы ТИМП-1 были достоверно выше при типичной (484 нг/мл; $p < 0,038$) и периостальной (609 нг/мл; $p < 0,007$) остеосаркомах по сравнению с контролем (436 нг/мл). Наиболее низкие показатели общей 5-летней выживаемости (33 %) выявлены в группе больных с сывороточными уровнями ММП-2 < 160 нг/мл и ММП-9 > 377 нг/мл.

Выводы. Представленные данные могут служить предметом дальнейших исследований по определению клинической значимости уровней ММП-2, ММП-7, ММП-9 и ТИМП-1 в прогнозе клинического течения различных гистологических вариантов сарком костей.

Полногеномный анализ рака полости рта и глотки

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

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

Полногеномный анализ 6034 больных раком полости рта и глотки и 6585 практически здоровых лиц (контрольная группа) выявил 8 локусов, влияющих на риск развития рака этих органов ($p < 5 \times 10^{-8}$). Причем 7 из них были выявлены впервые. Обнаружена

статистически достоверная связь между риском рака полости рта и глотки и локусами на хромосомах 6p21.32 (rs3828805, HLA-DQB1) (относительный риск (ОР) 1,28), 10q26.13 (rs201982221, LHPP) (ОР 1,67) и 11p15.4 (rs1453414, OR52N2-TRIM5) (ОР 1,19). Подтвержден протективный эффект полиморфизма локуса на хромосоме 4q23 (rs1229984, ADH1B) (ОР 0,56). Два новых участка хромосом 2p23.3 (rs6547741, GPN1) (ОР 0,83) и 9q34.12 (rs928674, LAMC3) (ОР 1,24), а также 2 уже известных локуса на хромосомах 9p21.3 (rs8181047, CDKN2B-AS1) (ОР 1,24) и 5p15.33 (rs10462706, CLPTM1L) (ОР 0,74) были ассоциированы с раком полости рта.

Риск развития рака ротоглотки был связан только с генами человеческого лейкоцитарного антигена (HLA). Классический анализ аллелей HLA показал, что гаплотипы II класса HLA DRB1*1301-HLA-DQA1*0103-HLA-DQB1*0603 (ОР 0,59) играют защитную роль в развитии рака ротоглотки. При дополнительной стратификации больных раком ротоглотки по статусу инфицированности вирусом папилломы человека (ВПЧ) было обнаружено, что защитная роль этих антигенов с риском рака ротоглотки была значительно сильнее у ВПЧ-положительных больных (ОР 0,23), чем у ВПЧ-отрицательных лиц (ОР 0,75).

Полногеномный анализ рака полости рта и глотки выявил новые локусы, полиморфизм которых ассоциирован с предрасположенностью к развитию опухолей данной локализации.

Разработка системы анализа генетических данных, полученных методом высокопроизводительного секвенирования, для диагностики онкопатологий и подбора таргетной терапии

Л.В. Шаталова, Д.И. Борисевич, Д.О. Коростин,
В.В. Ильинский

ООО «Генотек», Москва;
ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН»,
Москва

Введение. Онкологические заболевания являются одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Таргетная терапия онкопатологий обладает значительным потенциалом, однако для ее применения необходимо развитие своевременных методов диагностики, основанных на молекулярных методах анализа опухолей. Перспективным направлением является использование методов высокопроизводительного секвенирования ДНК (NGS) опухолей. Для эффективного применения данного подхода необходима разработка программных комплексов для обработки

данных NGS в реальном времени в целях получения результатов, необходимых для прогнозирования эффективности таргетной терапии.

Задачи исследования. Разработать комплекс алгоритмов и программного обеспечения для обработки и интерпретации генетических данных опухолей, полученных методом NGS.

Материалы и методы. В работе использованы математические алгоритмы, обеспечивающие идентификацию мутаций при обработке генетических данных и оценивающие функциональный эффект наличия мутации, эволюционную консервативность сайта, где произошла мутация, а также степень ассоциации гена с развитием злокачественных опухолей и наличие для него таргетных лекарственных противоопухолевых препаратов.

Результаты. Было разработано программное обеспечение (ПО) на языке программирования Python. Для анализа эффективности ПО отсекарованы и проанализированы 2 типа рака — 8 пар образцов рака предстательной железы и 9 пар образцов аденокарциномы желудка — в сравнении с контрольными образцами морфологически неизменной ткани соответствующего органа тех же пациентов.

В результате работы ПО из тысяч детектированных мутаций на 1 образец отбирается до 8 соматических коротких мутаций, до 1 инсерции или делеции протяженного участка и до 3 транслокаций. Среди генов, в которых обнаружены мутации, присутствуют гены, являющиеся типичными онкомаркерами, такие как *TP53*, *APC*, *NF1*, что подтверждает работоспособность системы. Для генов с наибольшим числом обнаруженных мутаций *SHENK2* и *ATM* были найдены лекарственные средства, чувствительность к которым снижалась при наличии мутаций в данных генах с $FDR < 5\%$.

Выводы. Нами было разработано ПО, способное выполнять автоматическую биоинформатическую обработку генетических данных образцов опухолей и выявлять драйверные мутации, связанные с развитием опухолей и затрагивающие гены, ассоциированные с чувствительностью к уже существующим, а также к перспективным препаратам для таргетной терапии опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (идентификатор соглашения RFMEFI60716X0152).

Новый опухолевый супрессор почечно-клеточного рака

М.С. Шитова, О.В. Ковалева, О.Р. Назарова,
Д.К. Малаева, Ю.Г. Кжышкова, А.Н. Грачев

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский
государственный университет», Томск

Введение. За 2 последних десятилетия во всем мире наблюдается неуклонный рост заболеваемости раком почки. В России данная патология занимает 10-е место по частоте встречаемости среди злокачественных новообразований, и несмотря на большое количество исследований ее этиология остается до конца не выясненной. С уверенностью можно сказать, что рак почки по-прежнему является достаточно сложным заболеванием как в диагностическом, так и в терапевтическом плане. Выявление новых диагностических или прогностических факторов рака почки — одно из основных направлений современной молекулярной онкоурологии. Ранее нами был обнаружен белок CLTAP, претендующий на роль опухолевого супрессора почечно-клеточной карциномы.

Задачи исследования. Исследование экспрессии белка CLTAP в различных типах опухолей почки методом иммуногистохимии, а также анализ его диагностического и терапевтического потенциала.

Материалы и методы. Образцы тканей почечно-клеточной карциномы, а также соответствующих морфологически нормальных тканей получены от пациентов, оперированных в 2009–2014 гг. по поводу рака почки в РОИЦ им. Н.Н. Блохина. Весь материал проходил гистологическую верификацию и охарактеризован в соответствии с TNM-классификацией. Анализ экспрессии CLTAP в образцах почечно-клеточной карциномы на уровне белка проводился методом иммуногистохимии.

Результаты. На предыдущем этапе исследований, проведенных методом количественной полимеразной цепной реакции, показано, что уровень экспрессии мРНК CLTAP в почечно-клеточных опухолях снижен более чем в 50 раз по сравнению с нормальной тканью. В данной работе мы проанализировали экспрессию белка CLTAP методом иммуногистохимии в 71 образце тканей опухолей почки и 20 образцах тканей нормальной почки. Из 71 исследуемого образца 66 составляли светлоклеточные карциномы (42 образца I–II степени градации по Фурману, 24 образца — III–IV степени), 4 образца папиллярного рака и 1 образец хромофобного рака. Во всех исследованных образцах опухолей отмечена потеря экспрессии исследуемого белка. В 20 исследованных образцах условно нормальной ткани почки экспрессия CLTAP была выявлена во всех исследованных образцах.

Выводы. Проведенное исследование подтверждает потерю экспрессии белка CLTAP в почечно-клеточных карциномах и указывает на то, что данный белок функционирует как классический опухолевый супрессор.

Потеря его экспрессии происходит непосредственно в процессе опухолевой трансформации и не зависит от клинико-морфологических характеристик опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-15-00396).

Сигнальные пути эпителиально-мезенхимального перехода и регуляторы ангиогенеза в опухолях молочной железы

А.М. Щербаков¹, О.Г. Овсий², Е.С. Герштейн¹,
Л.К. Овчинникова¹, В.Д. Ермилова¹, Г.П. Генс¹

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

²ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва

Введение. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) – комплексный процесс изменения фенотипа клеток от эпителиального к мезенхимальному. Центральным событием в инициации ЭМП является активация транскрипционных факторов семейства Snail – SNAI1 и SNAI2/SLUG, которые вызывают снижение синтеза белка E-кадгерина и последующее ослабление клеточных контактов. Представляет интерес исследование взаимосвязи ЭМП с другими сигнальными путями при раке молочной железы (РМЖ).

Задачи исследования. Оценка уровня экспрессии белков SNAI1, SNAI2, NF-κB (одного из коактиваторов Snail), VEGF и его рецепторов 1-го и 2-го типов в опухолях больных РМЖ.

Материалы и методы. Иммуногистохимическим методом (ИГХ) в 157 образцах РМЖ выполнен анализ SNAI1, SNAI2, NF-κB, VEGF-А и его рецепторов (VEGFR1, VEGFR2), Ki67 и HER2/neu. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0 (StatSoft).

Результаты. Уровни экспрессии SNAI1 и SNAI2 в опухоли достоверно положительно коррелировали ($R = 0,55$; $p < 0,05$), что может указывать на одновременный синтез этих белков-регуляторов ЭМП в РМЖ. Опухоли со средней и высокой экспрессией SNAI2 составили суммарно более 65 % наблюдений, экспрессия SNAI1 была менее выраженной: преобладали опухоли, в которых этот белок не выявлен. Транскрипционный фактор NF-κB (один из основных коактиваторов Snail) содержался приблизительно в половине образцов РМЖ, при этом уровни экспрессии NF-κB и SNAI1, а также SNAI2 достоверно коррелировали ($R = 0,54$ и $0,46$ соответственно; $p < 0,05$). Оценка взаимосвязи экспрессии белков-регуляторов ЭМП и компонентов VEGF-сигнального пути продемонстрировала следующие тенденции: уровень экспрессии как SNAI1, так и SNAI2 достоверно и положительно взаимосвязан с уровнем экспрессии VEGFR1 (в обоих случаях $R = 0,44$; $p < 0,05$). Корреляционная взаимосвязь уровней экс-

прессии VEGFR2 с экспрессией SNAI1 и SNAI2 также имеет выраженный положительный характер ($R = 0,53$ и $0,51$ соответственно; $p < 0,05$). Более чем в 100 случаях выявлена коэкспрессия VEGFR2 и SNAI2. Таким образом, при РМЖ прослеживается координированная активация белков-регуляторов ЭМП и основных компонентов VEGF-сигнального пути.

Выводы. Впервые на клиническом материале продемонстрирована координированная активация белков-регуляторов ЭМП (Snail) и основных компонентов VEGF-сигнального пути при РМЖ. Представленные результаты могут свидетельствовать о важной роли процессов ЭМП в регуляции неоангиогенеза.

Пересмотр фундаментальных представлений о раке тела матки: от дуализма к большему разнообразию в приложении к механизмам канцерогенеза, типам заболевания и вариантам терапии

Л.М. Берштейн, И.В. Берлев, А.Н. Балтрукова

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова»,
Санкт-Петербург, пос. Песочный

Рак тела матки (РТМ) принадлежит к числу ведущих онкогинекологических новообразований. Многолетняя оценка ситуации в этой области вынуждает искать как причины роста частоты заболеваемости, так и подходы к ограничению числа заболевающих женщин и случаев, характеризующихся большей агрессивностью. В отношении характеристик опухолевого процесса удалось установить, что в противоположность британским данным о нарастании в последние годы преимущественно эндометриоидных с благоприятным течением новообразований, по собственным предварительным наблюдениям, имеются сведения об увеличении доли опухолей с экспрессией HER2/neu, что может способствовать более раннему прогрессированию заболевания и сочетанию с повреждением/меньшей способностью к репарации ДНК. Не исключено, что таким карциномам присущ сдвиг в сторону большего образования генотоксических метаболитов классических эстрогенов. В то же время среди больных РТМ в комбинации с избыточной массой тела выявлено постепенное относительное увеличение доли женщин с признаками инсулинорезистентности, что сочетается с более высокой клинической стадией заболевания в отсутствие большей выраженности признаков системной генотоксичности. Благодаря применению современных высокотехнологичных методов лабораторного анализа формируется представление о существовании не 2 (т. е. дуалистической модели), как казалось ранее, а большего числа типов рака эндометрия, что законо-

мерным образом ведет к созданию современных его молекулярно-биологических классификаций (учитывающих, в частности, представленность в опухоли мутаций гена ДНК полимеразы POLE_epsilon и микросателлитной нестабильности) и, как можно надеяться, к оптимизации клинической практики. Соответственно, упомянутые и другие накапливающиеся материалы позволяют наметить мишени (как в эндометрии, так и вне его) для предупредительных и терапевтических воздействий, в том числе, и специфической природы применительно к отдельным подтипам РТМ, как это уже реализуется при раке молочной железы. Среди внеэндометриальных мишеней системного характера, в отношении каждой из которых продолжается поиск «сдерживающих» средств, следует назвать, во-первых, стероидную, а также 2 нестероидные — сопряженную с гормонально-метаболическими нарушениями по типу упоминавшейся инсулинорезистентности и воспалительно-цитокиновую (прогенотоксическую). Применительно к последней речь, в частности, может идти о восстановлении в опухолевой и жировой тканях гомеостатического баланса про- и противовоспалительных липидных медиаторов на основе молекул типа резольвина, протектина и марезина и их производных, что как в области онкогинекологии, так и онкологии в целом пока обсуждается в недостаточной степени. Дополнение представлений о гормоноассоциированных факторах риска, прогноза и чувствительности к терапии этого заболевания с учетом роли провоспалительного/антивоспалительного гомеостата указывает на необходимость поиска доступных оценке маркеров этой системы, в том числе ассоциированных с состоянием генома (включая профиль мутаций онкогенов и генов-супрессоров) как у больных с нормальной массой тела, так и с различными подтипами ожирения. Все это открывает значительное поле деятельности в целях оптимизации мер по предупреждению и лечению РТМ и пониманию механизмов эндометриального канцерогенеза.

Рак эндометрия и фенотипы ожирения: генетический и генотоксический компонент

Л.М. Берштейн, А.Г. Иевлева, Т.Е. Порошина,
Е.А. Туркевич, И.М. Коваленко

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова»,
Санкт-Петербург, пос. Песочный

Введение. Хотя избыточная масса тела является широко известным фактором риска развития рака эндометрия (РЭ), далеко не всегда учитывается факт гетерогенности ожирения (в частности, подразделения его на метаболически здоровое ожирение (МЗО), т. е. не имеющее выраженных гормонально-метаболических нарушений, и стандартное ожирение (СО), сочетающееся с симптомокомплексом инсулинорезистент-

ности). Помимо этого, неясно, в силу чего у больных РЭ с СО клиническая стадия опухолевого процесса более продвинута, чем у больных с МЗО (ЛМБ и др., 2015), и вовлечены ли в формирование потенциальных связей различных фенотипов ожирения со стадией и дифференцировкой карцином эндометрия в период установления диагноза такие параметры, как состояние генома и признаки системного генотоксического повреждения.

Материалы и методы. В исследование были включены ранее нелеченные больные РЭ ($n = 70-110$ в зависимости от использованного метода), преимущественно находящиеся в постменопаузальном периоде (средний возраст 60,2 года). В опухолевой ткани иммуногистохимическим методом исследовали экспрессию HER2/neu и онкосупрессора PTEN ($n = 70$). В ДНК, выделенной из мононуклеаров венозной крови, взятой натощак, методом полимеразной цепной реакции определяли представленность полиморфных вариантов генов *FTO*, *rs9939609* и рецептора лептина *LEPR Gln223Arg* ($n = 110$), а также длину теломер ($n = 110$). С использованием мононуклеаров из той же крови и с применением Comet assay оценивали в автоматизированном варианте момент хвоста комет и долю ДНК в хвосте ($n = 70$), а в сыворотке крови тех же больных методом иммуноферментного анализа определяли уровень 8-ОН-дезоксигуанозина (8-ОН-dG, $n = 87$), интерлейкина 6 (ИЛ-6, $n = 79$) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α , $n = 79$).

Результаты. По средним данным, различия между группами СО и МЗО (в пользу СО) продемонстрировали лишь уровень ИЛ-6 в сыворотке крови и представленность генотипа AA над генотипом TT (полиморфизм *FTO*); при МЗО в отличие от СО генотип GG превалировал над генотипом AA (полиморфизм *LEPR Gln223Arg*). С более высокой стадией РЭ коррелировали длина теломер в мононуклеарах (МЗО, тенденция (Т)), экспрессия HER2/neu в опухоли (МЗО, Т) и содержание ИЛ-6 в сыворотке крови (СО, достоверно (Д)), а с менее продвинутой стадией — доля ДНК в хвосте комет (МЗО, Т), экспрессия PTEN в опухоли (МЗО, Т) и длина теломер (СО, Т). Корреляция с более низкой степенью дифференцировки опухолевой ткани оказалась свойственна уровню 8-ОН-dG в крови (МЗО, Т) и моменту хвоста комет (СО, Т), а с более высокой дифференцировкой коррелировали длина теломер (МЗО, Т) и экспрессия PTEN в опухолевой ткани (СО, Д).

Выводы. Корреляции исследованных параметров оказались более «логичными» в отношении дифференцировки опухоли, и эта «логика» была в равной степени присуща больным РЭ с СО и МЗО. Обращает на себя внимание, что различия между группами СО и МЗО по средним данным и в отношении связи с большей клинической стадией опухолевого процесса были свойственны уровню ИЛ-6, являющемуся маркером не только прогенотоксического, но и провоспалительного сдвига.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-00384).

Циркулирующие антитела и копии ДНК вируса Эпштейна–Барр в качестве биомаркеров рака носоглотки в неэндемичном регионе

**В.Э. Гурцевич, Н.Б. Сениота, В.Н. Кондратова,
А.В. Игнатова, М.В. Ломая, М.А. Кропотов,
А.М. Мудунов, А.В. Лихтенштейн**

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

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), относящийся к семейству герпес-вирусов человека, обладает уникальными биологическими свойствами. Им инфицировано практически все население планеты, как правило без каких-либо клинических проявлений. В то же время ВЭБ – признанный этиологический агент для ряда злокачественных заболеваний. Среди них особое место занимает рак носоглотки (РНГ), в возникновении которого ВЭБ играет ключевую роль, стимулируя прогрессирование патологического процесса от предраковых поражений до появления злокачественной опухоли. Еще одна особенность вируса состоит в отличающейся частоте вызываемых им патологий в различных географических регионах и этнических группах. Так, наиболее часто РНГ диагностируют в южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии, несколько реже – в арабских странах Северной Африки и на Аляске. Россия относится к неэндемичным регионам с уровнем заболеваемости РНГ, составляющим десятые доли процента от числа солидных опухолей, регистрируемых в стране.

Исследованиями, проведенными в эндемичных регионах, доказано, что у больных РНГ возникновение заболевания сопровождается повышенными титрами гуморальных антител к ВЭБ, которые поднимаются до высоких уровней еще в доклинической фазе болезни.

При этом обнаружение антител, относящихся к группе иммуноглобулинов (Ig) класса А, против капсидного антигена ВЭБ (ВКА), широко используется для скрининга РНГ в эндемичных по этому заболеванию южных провинциях Китая, Гонконга, Сингапура и Малайзии.

В последнее время наблюдается нарастающий интерес к тестированию в плазме крови нуклеиновых кислот, ассоциированных с опухолью, в качестве метода, способствующего раннему выявлению рака и мониторингу опухолевого процесса. При этом в эндемичных регионах ДНК ВЭБ в плазме крови больных РНГ является одним из наиболее изученных опухолевых маркеров, количественное определение которого представляется полезным для идентификации остаточной клинически скрытой опухоли после проведенной терапии и для прогнозирования эффективности лечения.

С учетом вышесказанного цель настоящего исследования состояла в сравнительной оценке клинической значимости уровней гуморальных антител к комплексу антигенов ВЭБ (IgG- и IgA-антител к ВКА; IgG-антител к раннему антигену) и числа копий ДНК-вируса в плазме больных РНГ в неэндемичном регионе – России. При этом впервые предстояло выяснить, какой из изучаемых маркеров наиболее полезен для диагностики РНГ и оценки клинического статуса больных после проведенной химиолучевой терапии. Результаты исследований свидетельствуют о том, что оба плазменных маркера – IgA-антитела к ВКА и ДНК ВЭБ могут быть успешно использованы для диагностики нРНГ в России и, по-видимому, в любом неэндемичном по РНГ регионе. Однако число копий ДНК-вируса в плазме больных является более чувствительным и специфическим маркером, более точно отражающим эффективность проведенной терапии, а также состояние ремиссии или рецидива болезни.