DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2026-13-3-27-35

CC BY 4.0

Влияние нокдауна гена *EPHB6* на миграцию, инвазию и туморогенность клеток рака полости рта *in vitro*

М.С. Третьякова, Е.С. Колегова, Е.А. Простакишина, И.К. Федорова, Р.С. Воробьев, Д.Е. Кульбакин, Е.Л. Чойнзонов, Е.В. Денисов

Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный, 5

Контакты: Мария Сергеевна Третьякова *trremar@mail.ru*

Введение. В последние годы отмечается рост заболеваемости раком полости рта (РПР) среди молодых пациентов без традиционных факторов риска (курение, употребление алкоголя, инфицирование вирусом папилломы человека), для которого характерны более агрессивное течение и повышенная частота развития рецидивов. В связи с этим актуальным становится поиск новых молекулярных особенностей, которые могли бы прояснить механизмы агрессивного течения заболевания у больных данной возрастной группы. Ранее нами обнаружены мутации в гене *EPHB6*, ассоциированные с развитием рецидивов РПР у пациентов молодого возраста.
Цель исследования – оценить влияние нокдауна гена *EPHB6* на функциональные характеристики клеток РПР *in vitro*.
Материалы и методы. В работе использовали клеточную линию РПР Cal-27. Нокдаун гена индуцировали с помощью малых интерферирующих РНК.
Результаты. Нокдаун *EPHB6* обеспечивал снижение экспрессии гена на 90 % относительно контроля, что сопровождалось изменением функциональных свойств клеток: ингибированием миграции и инвазии, а также снижением туморогенной способности в трехмерных культурах.
Заключение. Полученные результаты проливают свет на возможные механизмы участия *EPHB6* в прогрессировании РПР у пациентов молодого возраста.

Ключевые слова: рак полости рта, молодой возраст, прогрессия опухоли, рецидив, модель *in vitro*, малые интерферирующие РНК

Для цитирования: Третьякова М.С., Колегова Е.С., Простакишина Е.А. и др. Влияние нокдауна гена *EPHB6* на миграцию, инвазию и туморогенность клеток рака полости рта *in vitro*. Успехи молекулярной онкологии 2026;13(3):27–35. DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2026-13-3-27-35

Effect of *EPHB6* knockdown on migration, invasion, and tumorigenicity of oral cancer cells *in vitro*

M.S. Tretyakova, E.S. Kolegova, E.A. Prostakishina, I.K. Fedorova, R.S. Vorobev, D.E. Kulbakin, E.L. Choinzonov, E.V. Denisov

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences; 5 Kooperativny Lane, Tomsk 634009, Russia

Contacts: Maria Sergeevna Tretyakova *trremar@mail.ru*

Introduction. In recent years, a rising incidence of oral cancer (OC) has been observed among young adults without traditional risk factors (smoking, alcohol consumption, and human papillomavirus infection). An aggressive clinical course and a high recurrence rate are observed in patients of this age group. Therefore, there is a growing need to identify novel molecular alterations that could elucidate the mechanisms driving the disease progression. Previously, we identified mutations in the *EPHB6* gene associated with early-onset OC recurrence.
Aim. To evaluate the effect of *EPHB6* knockdown on the functional characteristics of OC cells *in vitro*.
Materials and methods. The OC cell line Cal-27 was used in this study. Gene knockdown was induced using small interfering RNAs.
Results. *EPHB6* knockdown resulted in a 90 % reduction in gene expression relative to the control, which was accompanied by alterations in cellular functional properties, including inhibition of migration and invasion, as well as reduced tumorigenic capacity in three-dimensional cultures.

Conclusion. These findings shed light on the potential mechanisms by which *EPHB6* contributes to early-onset OC progression.

Keywords: oral cancer, young adults, tumor progression, recurrence, *in vitro* model, small interfering RNA

For citation: Tretyakova M.S., Kolegova E.S., Prostakishina E.A. et al. Effect of *EPHB6* knockdown on migration, invasion, and tumorigenicity of oral cancer cells *in vitro*. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2026;13(3):27–35. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2026-13-3-27-35

ВВЕДЕНИЕ

Рак полости рта (РПР) – одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований головы и шеи: ежегодно в мире регистрируется 380 тыс. новых случаев [1]. Традиционно РПР рассматривался как заболевание лиц старшего возраста, ассоциированное с хорошо известными факторами риска – курением, употреблением алкоголя и инфицированием ВПЧ [2]. Однако в последние годы отмечается устойчивая тенденция к «омоложению» заболевания, проявляющаяся ростом заболеваемости среди лиц моложе 45 лет, у которых классические факторы риска, как правило, отсутствуют [3].

Клинически РПР у молодых пациентов характеризуется агрессивным течением, диагностикой на поздних стадиях и низкой эффективностью стандартных терапевтических подходов [4]. Традиционные представления о факторах и механизмах онкогенеза преимущественно основаны на данных пациентов старшего возраста (60 лет и старше), что обусловливает пробел в понимании биологии рака у молодых людей. Ранее нами изучены особенности мутационного профиля, метилома, транскриптома, протеома и микробиома РПР [5–7]. У молодых пациентов с РПР в тканях рецидива выявлена мутация гена рецептора эфрина типа B6 (*EPHB6)*, отсутствовавшая в первичной опухоли [7]. Ген *EPHB6* кодирует рецепторную тирозинкиназу семейства Eph, участвующую в регуляции клеточной адгезии, миграции и эпителиально-мезенхимального перехода [8, 9]. Потеря или изменение функции данного рецептора вследствие мутации, вероятно, нарушает межклеточные контакты и напрямую влияет на поведение клеток. Для экспериментальной проверки данной гипотезы в настоящем исследовании применен подход нокдауна экспрессии гена с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК).

Цель исследования – оценить влияние нокдауна гена *EPHB6* на функциональные характеристики клеток РПР *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подбор миРНК и трансфекция клеточных культур. Трансфекцию миРНК проводили на иммортализованных клеточных линиях эмбриональной почки человека 293FT (Hek-293) и карциномы языка Cal-27. Клетки были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии, г. Санкт-Петербург). Клетки культивировали в смеси 1:1 модифицированной среды Игла Дульбекко и среды Хэма F12 (DMEM/F12; Gibco, США), дополненной 10 % фетальной бычьей сывороткой (FBS; Globe Kang, Китай), пируватом натрия, GlutaMAX и пенициллином/стрептомицином (Gibco, США) при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2. Все клеточные линии прошли тестирование на отсутствие микоплазменной контаминации с помощью набора для детекции микоплазм методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Servicebio, Китай).

Нуклеотидные последовательности миРНК подбирали с помощью онлайн-программ siDirect version 2.1 [10], InvivoGen's siRNA Wizard Software [11] и базы данных Nucleotide database (NCBI) [12]. Олигонуклеотиды (АО «ГенТерра», Россия) разводили водой до концентрации 100 пмоль/мкл. Далее комплементарные олигонуклеотиды смешивали, инкубировали в термостате при 95 °C в течение 2 мин и охлаждали до комнатной температуры. Последовательности олигонуклеотидов представлены в табл. 1.

Трансфекцию миРНК проводили с использованием реагента Lipomaster 3000 (Vazyme, Китай) в 24-луночных планшетах (Corning, США) при достижении 80–90 % конфлюэнтности клеток. Комплексы миРНК с трансфекционным реагентом готовили в бессывороточной среде по протоколу производителя.

Оценка эффективности нокдауна. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, трансфицированные неспецифической миРНК («скрембл»), не направленной на целевой ген. С помощью количественной ПЦР выявлено, что неспецифическая миРНК не влияла на уровень экспрессии гена *EPHB6* (рис. 1, *а*). Эффективность доставки оценивали с использованием неспецифической миРНК, меченной флуоресцентным красителем FAM (см. рис. 1, *б*). Через 24 ч после трансфекции >90 % клеток демонстрировали цитоплазматическую флуоресценцию. Для исключения неспецифического влияния в эксперимент была включена группа mock-контроля (mock transfection). Клетки подвергали всем этапам трансфекции, кроме добавления миРНК. Условия культивирования, объемы реагентов, время инкубации и плотность посева были полностью идентичны экспериментальным группам. Группа mock-контроля использовалась для оценки неспецифического влияния процедуры трансфекции на миграцию, инвазию и туморогенность. В качестве положительного контроля применяли миРНК, наце-

Таблица 1. *Последовательности олигонуклеотидов*

Table 1. *Oligonucleotide sequences*

Малые интерферирующие РНК (миРНК) Small interfering RNA (SiRNA)	Праймеры Primers	Последовательность Sequence
миРНК экспериментальной группы 1 miRNA of experimental group 1	EPHB6_1_pas	5'-rCrUrGrCrUrUrArUrArUrCrArArGrArUrUrGrArGrGTT-3'
	EPHB6_1_guide	5'-rUmCmAmArUrCrUmUrGrArUrArUrArArGrCrArGrGrATT-3'
миРНК экспериментальной группы 2 miRNA of experimental group 2	EPHB6_2_pas	5'-rCrArUrGrGrArArArGrCrArUrArCrArArCrArUrCrCTT-3'
	EPHB6_2_guide	5'-rArUrGrUrUrGrUrArUrGrCrUrUrUrCrCrArUrGrUrGTT-3'
миРНК экспериментальной группы 3 miRNA of experimental group 3	EPHB6_3_pas	5'-rCrUrGrGrArUrUrArCrArUrCrUrArCrUrUrArUrGrUTT-3'
	EPHB6_3_guide	5'-rArUrArArGrUrArGrArUrGrUrArArUrCrCrArGrGrATT-3'
миРНК экспериментальной группы 4 miRNA of experimental group 4	EPHB6_4_pas	5'-rCrUrGrCrArUrUrUrGrArCrArArGrArUrGrArUrCrCTT-3'
	EPHB6_4_guide	5'-rArUmCmAmUmCrUmUrGrUrCrArArArUrGrCrArGrCTT-3'
Неспецифический контроль «скрембл» Scrambled control	SCR_ pas_1	5'-rGrCrArTrTrCrTrCrArCrGrArGrCrTrArArTrTrGrATT-3'
	SCR_ guide_1	5'-rGrTrArTrCrTrCrCrTrCrGrArArGrCrCrArTrArTrATT-3'
Контроль трансфекции Transfection control	GFP_pas_1	5'-rGrCrArArGrCrUrGrArCrCrCrUrGrArArGrUrUrCrArUTT-3'
	GFP_guide_1	5'-rGrArArCrUrUrCrArGrGrGrUrCrArGrCrUrUrGrCrCrGTT-3'
Положительный контроль Positive control	GAPDH_pas_1	5'-rGrUrGrGrArGrArUrUrGrUrUrGrCrCrArUrCrATT-3'
	GAPDH_guide_1	5'- rUrGrArUrGrGrCrArArCrArArUrCrUrCrCrArCrTT-3'

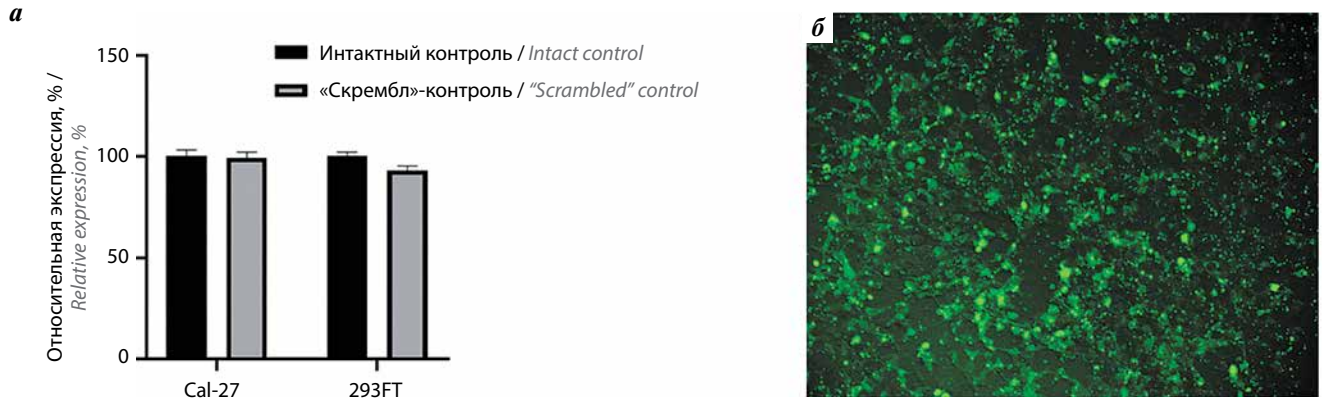

Рис. 1. *Валидация контролей малых интерферирующих РНК: а — оценка экспрессии гена EPHB6 в группах интактного контроля и неспецифической малой интерферирующей РНК («скрембл»); б — флуоресцентная микроскопия клеточной линии 293FT в группе неспецифической малой интерферирующей РНК, меченной FAM*

Fig. 1. *Validation of siRNA controls: a — EPHB6 gene expression analysis in the intact control group and the non-specific small interfering RNA group ("scrambled"); b — fluorescence microscopy of the 293FT cell line transfected with FAM-labeled non-specific small interfering RNA*

ленную на *GAPDH*. Подавление экспрессии этого гена вызывало метаболический стресс и снижало жизнеспособность клеток.

После оптимизации условий трансфекции и валидации системы РНК-интерференции экспериментальные миРНК в комплексе с трансфекционным реагентом добавляли к клеточным культурам Cal-27 и 293FT.

Тест на жизнеспособность. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью микротитрационного теста (МТТ-тест). Для МТТ-теста клеточную суспензию засевали в 96-луночные планшеты с плоским дном (Corning, США) и инкубировали в течение 24 ч при 37 °C и 5 % CO_2. Затем добавляли тетразолиевый краситель (Acros Organics, США) и инкубировали в течение 4 ч; в качестве растворителя использовали диметилсульфоксид (PANREAC, Испания). Измерение оптического поглощения проводили на планшетном спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США)

на 2 длинах волн: 570 (рабочая) и 620 (сравнение) нм. Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность, } \% = (O_{570-620}) - (\Phi_{570-620}) / (K_{570-620}) - (\Phi_{570-620}) \times 100\ \%,$$

где O – оптическая плотность опытного образца, Ф – фоновые значения, K – оптическая плотность контрольного образца.

Жизнеспособность клеток после трансфекции перед функциональными тестами (и во время – через 24, 48, 72 и 96 ч) в экспериментальных группах оценивали с использованием трипанового синего (ООО «БиолоТ», Россия) с помощью автоматического счетчика клеток LUNA-II (Logos Biosystems, Корея). Жизнеспособность клеток, рассчитанная как процент живых клеток от общего количества, варьировалась от 83 до 95 %.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Через 48 ч после трансфекции оценивали уровень экспрессии исследуемого гена с помощью количественной ПЦР с использованием технологии TaqMan на амплификаторе QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США). ПЦР ставили в 3 повторах. Последовательность праймеров, используемых для постановки ПЦР, представлена в табл. 2. В качестве гена-рефери применяли ген *GAPDH*; уровень экспрессии целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии гена-рефери в группе контроля – неизмененной клеточной линии. Относительная экспрессия гена *EPHB6* оценена с помощью метода 2^(–ΔΔCt) (Livak). Отношение экспрессии между образцом и калибратором определяли по формулам:

$$\Delta Ct_{(target)} = Ct_{(target)} - Ct_{(ref)},$$

$$\Delta Ct_{(control)} = Ct_{(target,\ control)} - Ct_{(ref,\ control)},$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(target)} - \Delta Ct_{(control)},$$

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)} = \text{нормализованный коэффициент экспрессии},$$

где Ct – пороговый цикл, $Ct_{(target)}$ – пороговый цикл для гена-мишени, $Ct_{(ref)}$ – пороговый цикл для гена-рефери, $Ct_{(control)}$ – пороговый цикл для контрольного образца.

Вестерн-блоттинг. Оценку снижения уровня белка EPHB6 проводили с помощью вестерн-блоттинга. Клетки лизированы в буфере RIPA (Servicebio, Китай) с использованием коктейля ингибиторов протеаз (Abcam, Великобритания). Полученные лизаты использованы для проведения белкового электрофореза с дальнейшим электропереносом белков на поливинилиденфторидную мембрану (Servicebio, Китай). Мембрану блокировали 1X раствором iBind (Invitrogen, США). Окрашивание первичными и вторичными антителами выполнено с использованием устройства iBind Western Device (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 2,5 ч. В работе использовали следующие антитела: к EPHB6 (Invitrogen, США; разведение 1:1000), к β-актину (ABclonal, Китай; разведение 1:1000) и HRP-конъюгированные антимышиные и антикроличьи антитела (ABclonal, Китай; разведение 1:2000). Далее мембрану инкубировали с системой детектирования Ultra-Sensitive ECL для хемилюминисцентной детекции (Servicebio, Китай). Визуализацию осуществляли на системе ChemiDoc Touch (Bio-Rad, США). Плотность полос оценивали с помощью компьютерной программы ImageLab. Полученные результаты стандартизировали по уровню β-актина. В качестве стандарта молекулярной массы использовали маркер Rav-11 (ООО «Биолабмикс», Россия).

Анализ миграции и инвазии клеток. Анализ миграции и инвазии клеток *in vitro* проводили с использованием камеры Бойдена (Jet Biofil, Китай) с фильтрующей мембраной из полиэтилентерефталата с размером пор 8 мкм. Для анализа инвазии клеток верхние фильтрующие мембраны дополнительно покрывали Matrigel (Corning, США). Клетки в концентрации 10^4, суспендированные в 100 мкл бессывороточной среды, высевали в верхний отсек камеры. В качестве хемоаттрактанта использовали среду DMEM/F12 с 20 % FBS (Globe Kang, Китай), которую помещали в нижний отсек. Через 72 ч клетки, расположенные на нижней стороне мембраны, окрашивали витальным красителем Hoechst 33258 (ООО «Люмипроб РУС», Россия). Флуоресцентные изображения клеток получали с помощью системы визуализации EVOS (Thermo Fisher Scientific, США). Случайным образом выбирали 3 поля зрения, в которых подсчитывали количество клеток.

Анализ туморогенной способности. Сфероиды выращивали в среде MammoCult Human Medium Kit (STEMCELL Technologies, Канада). Клетки высевали в 96-луночные планшеты с низкоадгезивным покрытием (Thermo Fisher Scientific, США) из расчета 1×10^4 клеток на лунку в объеме 100 мкл культуральной среды. На 5-й день клетки образовали сфероиды, которые

Таблица 2. *Последовательности праймеров для постановки количественной полимеразной цепной реакции*

Table 2. *Primer sequences used for quantitative polymerase chain reaction*

Ген Gene	Последовательность Sequence
EPHB6	F 5'-CGCTACTATGACCAGGCAGA-3' R 5'-GTCACGGTGGCAGTGTTG-3' Probe FAM 5'-CGAATCCCACTCCTTCA CCCTGAC-3'BHQ1
GAPDH	F 5'-GCCAGCCGAGCCACATC-3' R 5'-GGCAACAATATCCACTTTACCAGA-3' Probe FAM 5'-CGCCCAATACGACCAAAT CCG-3'BHQ1

визуализировали с помощью системы EVOS (Thermo Fisher Scientific, США) и оценивали морфологические параметры – размер, степень округлости, компактность и наличие агрегатов в окружении.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 и GraphPad Prism 9.0. Все данные обрабатывали с использованием методов описательной статистики с расчетами среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (SD). Различия данных в экспериментальных группах оценивали с помощью теста ANOVA и U-критерия Манна–Уитни. Различия считали значимыми при p <0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ уровней экспрессии гена *EPHB6* в клеточных линиях 293FT и Cal-27 выявил различия между ними (рис. 2, *а*). В клетках линии Cal-27 уровень экспрессии исследуемого гена был несколько выше по сравнению с линией 293FT. Несмотря на исходные различия в базовой экспрессии *EPHB6* между линиями, миРНК демонстрировали сопоставимую эффективность в подавлении экспрессии *EPHB6* в обеих культурах. Уровень экспрессии *EPHB6* в экспериментальных группах 1 и 2 был значительно ниже, чем в экспериментальных группах 3 и 4 (>40 %), и на 90 % ниже относительно контроля (см. рис. 2, *б*). После подтверждения эффективного уменьшения экспрессии гена *EPHB6* клетки из экспериментальных групп 1 и 2 были использованы для проведения функциональных тестов.

По результатам МТТ-теста жизнеспособность клеток после трансфекции в группе mock-контроля варьировалась от 90 до 82 % (рис. 3, *а*). Жизнеспособность клеток в группе с нокдауном *GAPDH* снизилась до 38 ± 5 % по сравнению с mock-контролем, который условно принимался за 100 % (см. рис. 3, *б*). При оценке жизнеспособности клеток Cal-27 и 293FT с помощью МТТ-теста после трансфекции не было выявлено статистически значимых различий между контрольной и экспериментальными группами (см. рис. 3, *в*).

В модельных системах оценки миграции показано, что нокдаун гена *EPHB6* приводит к значимому снижению миграционной активности более чем на 40 % в клеточных линиях Cal-27 и 293FT по сравнению с контролем (рис. 4). При оценке инвазивного потенциала клетки 293FT продемонстрировали значительно более высокую способность к проникновению через матриксный барьер по сравнению с контролем и с линией Cal-27 (рис. 4). Инвазивная активность клеток Cal-27 была ингибирована на 90 % по сравнению с контрольной группой (рис. 5).

При оценке способности клеток линии 293FT к формированию сфероидов после нокдауна гена *EPHB6* значимых различий в морфологии трехмерных структур экспериментальных миРНК 1 и 2 по сравнению с контрольной группой выявлено не было: клетки формировали плотный округлый сфероид с ровными контурами и четкими краями (рис. 6). Клетки Cal-27 с нокдауном *EPHB6* в экспериментальных группах 1 и 2 образовывали сфероиды меньшего размера с неровными контурами по сравнению с контрольной группой (см. рис. 6). Наблюдаемая морфология указывает на слабую межклеточную адгезию и низкую туморогенную способность: сфероиды характеризовались рыхлой структурой, легко распадались, рядом с мелкими основными сфероидами наблюдались мелкие агрегаты.

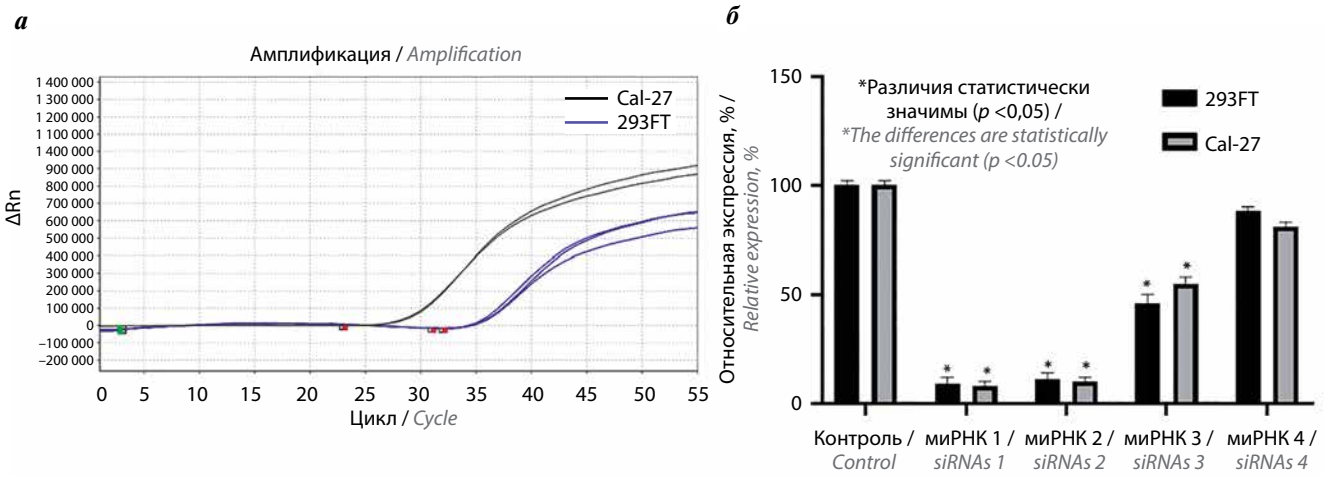

Рис. 2. *Экспрессия гена EPHB6: а – в контрольных образцах; б – в экспериментальных группах малых интерферирующих РНК (миРНК). ΔRn – величина нормализованного флуоресцентного сигнала за вычетом фонового шума; миРНК 1 – малые интерферирующие РНК (миРНК) экспериментальной группы 1; миРНК 2 – миРНК экспериментальной группы 2; миРНК 3 – миРНК экспериментальной группы 3; миРНК 4 – миРНК экспериментальной группы 4*

Fig. 2. *EPHB6 gene expression: a – in control samples; б – in experimental groups. ΔRn – value of the normalized fluorescent signal minus background noise; siRNAs 1 – experimental group 1 small interfering RNAs (siRNAs); siRNAs 2 – experimental group 2 siRNAs; siRNA 3 – experimental group 3 siRNAs; siRNAs 4 – experimental group 4 siRNAs*

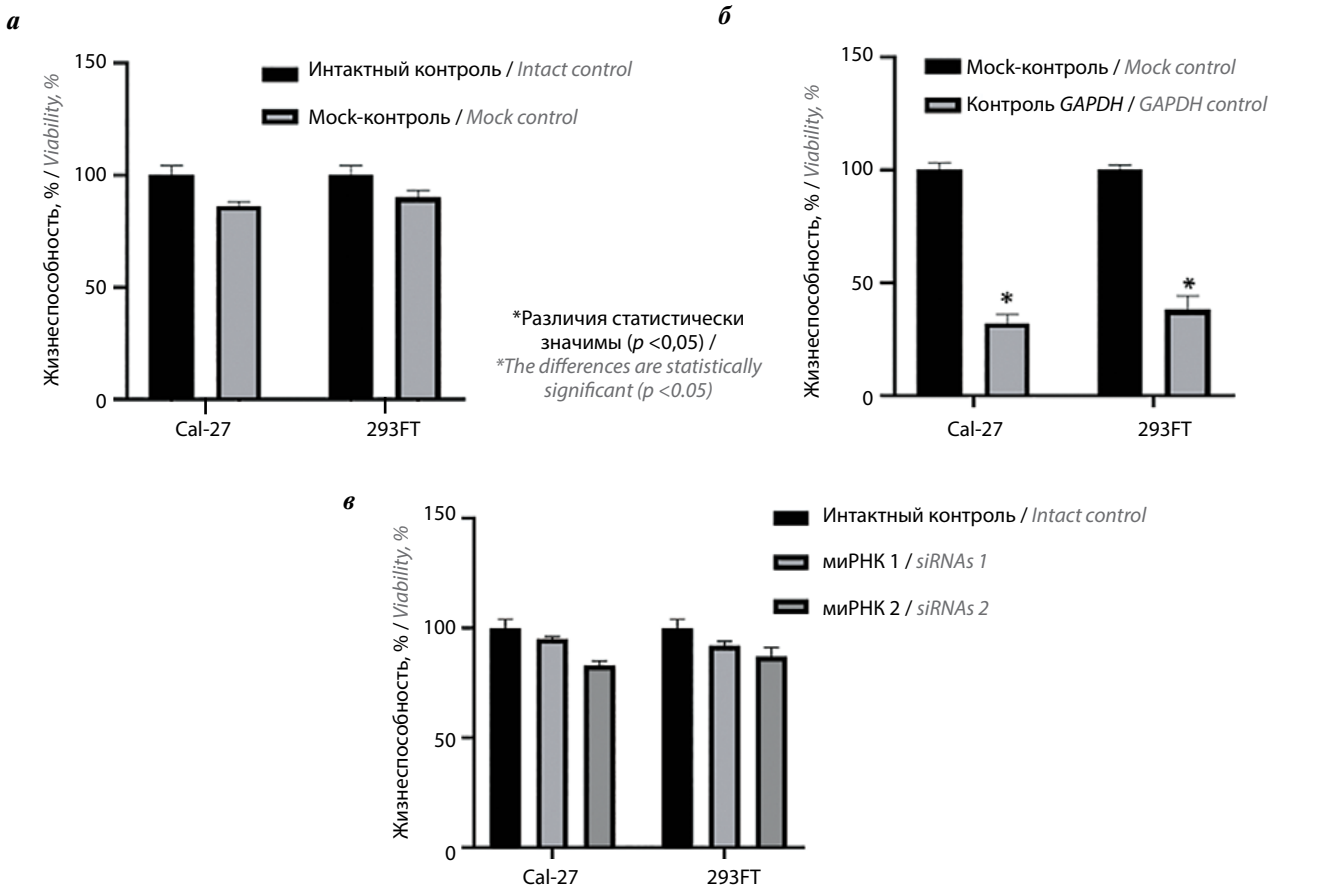

Рис. 3. *Жизнеспособность клеток: а – группа интактного контроля и контроля трансфекции (mock-контроля); б – группа контроля трансфекции (mock-контроль) и контроля GAPDH; в – малые интерферирующие РНК (миРНК) экспериментальных групп. миРНК 1 – миРНК экспериментальной группы 1; миРНК 2 – миРНК экспериментальной группы 2*

Fig. 3. *Cell viability: a – intact control and transfection control (mock control); б – transfection control (mock control) and GAPDH control; в – small interfering RNAs (siRNAs) of experimental groups. siRNA 1 – experimental group 1 siRNAs; siRNA 2 – experimental group 2 siRNAs*

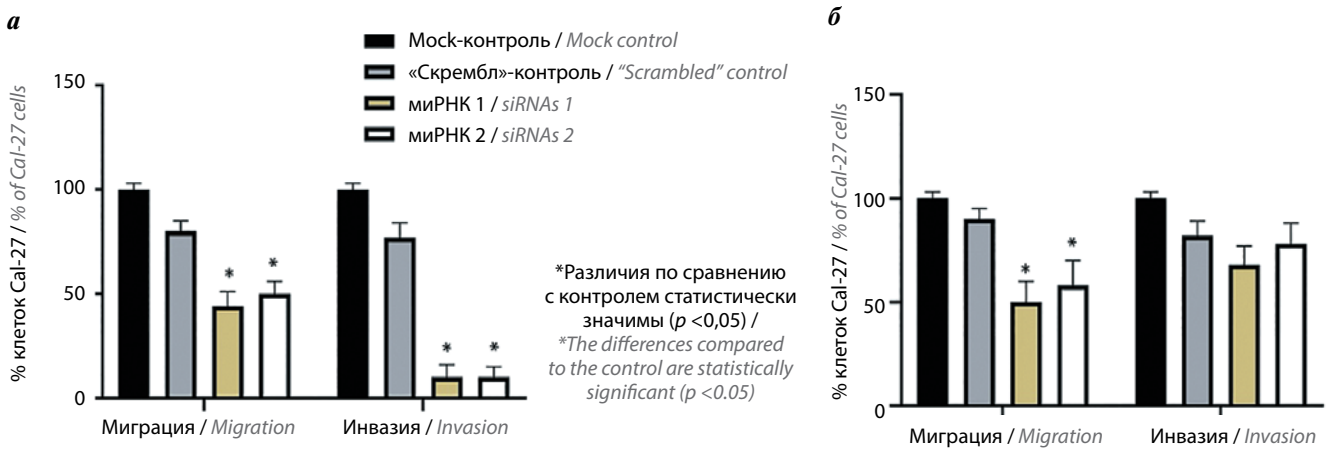

Рис. 4. *Результаты анализа миграции и инвазии клеток: а – Cal-27; б – 293FT. миРНК 1 – малые интерферирующие РНК экспериментальной группы 1; миРНК 2 – малые интерферирующие РНК экспериментальной группы 2*

Fig. 4. *Results of cell migration and invasion analysis expressed as percentage: a – Cal-27; б – 293FT. siRNAs 1 – experimental group 1 small interfering RNAs; siRNAs 2 – experimental group 2 small interfering RNAs*

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что *EPHB6* влияет на миграционную активность, однако его вклад в поддержание инвазивного потенциала и структурной целостности сфероидов варьирует в зависимости от типа клеток. Если в клетках карциномы языка Cal-27 *EPHB6* также оказывает

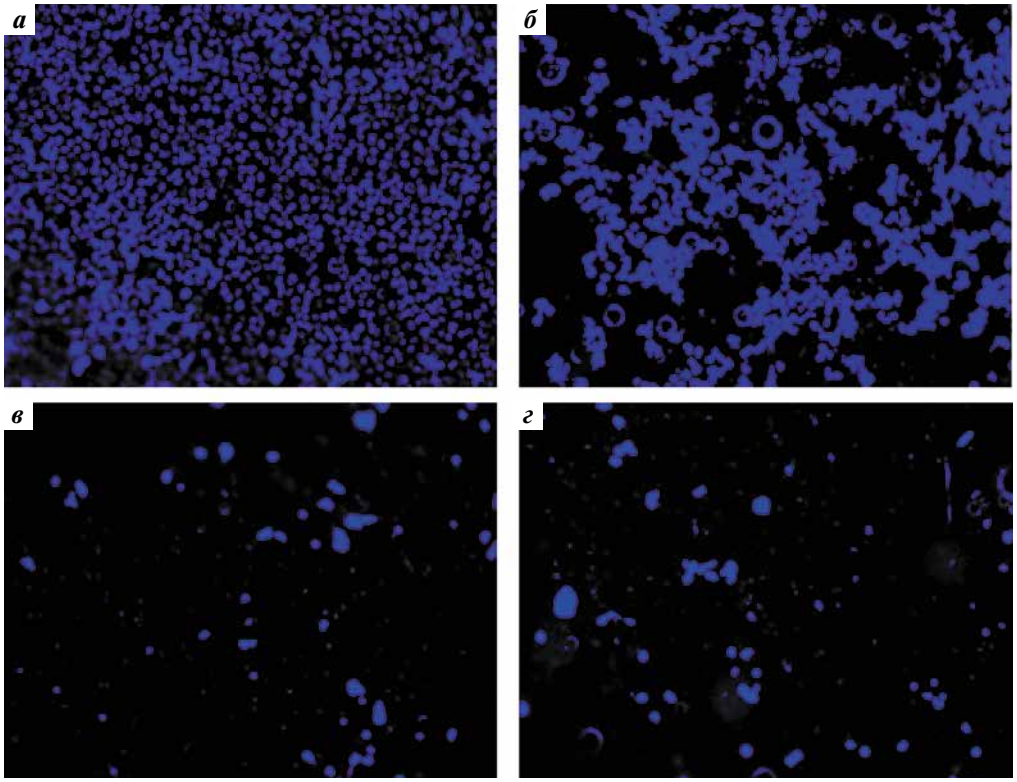

Рис. 5. *Флуоресцентная микроскопия клеточной линии Cal-27 при оценке инвазивной способности: а – группа mock-контроля; б – группа неспецифической малой интерферирующей РНК (миРНК) «скрембл»; в – миРНК экспериментальной группы 1; г – миРНК экспериментальной группы 2*
Fig. 5. *Fluorescence microscopy of the Cal-27 cell line in the assessment of invasive potential: a – mock control group; б – non-specific scrambled small interfering RNA (siRNA) group; в – experimental group 1 siRNA; г – experimental group 2 siRNA*

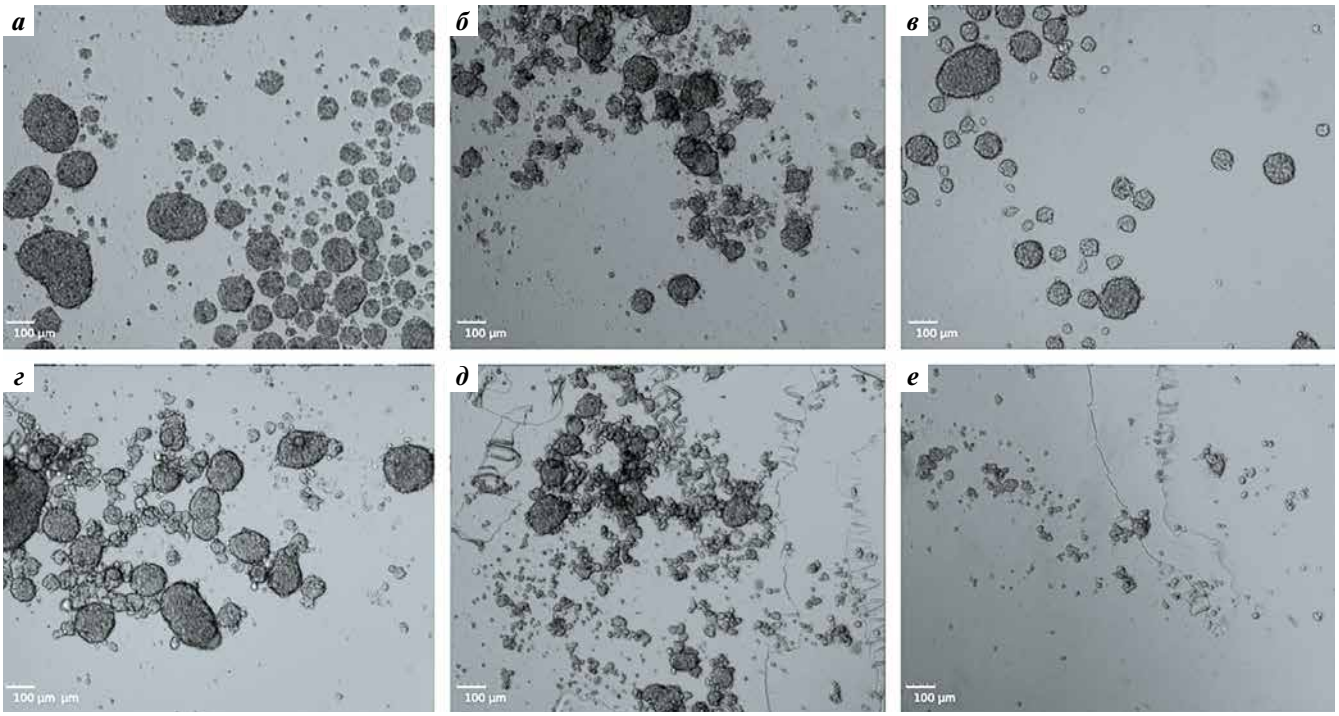

Рис. 6. *Микроскопия клеточных линий при оценке туморогенной способности: а – группа mock-контроля 293FT; б – группа неспецифической малой интерферирующей РНК (миРНК) «скрембл» 293FT; в – экспериментальная группа миРНК 293FT; г – группа mock-контроля Cal-27; д – группа неспецифической миРНК «скрембл» Cal-27; е – миРНК экспериментальной группы 1 Cal-27*
Fig. 6. *Microscopy of cell lines in the assessment of tumorigenic potential: a – 293FT, mock control; б – 293FT, scrambled siRNA; в – 293FT, experimental small interfering RNA (siRNA); г – Cal-27, mock control; д – Cal-27, scrambled siRNA; е – Cal-27, experimental group 1 siRNA*

влияние на туморогенность и инвазию, то в линии 293FT его подавление не оказывает значимого влияния на данные процессы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные функциональных тестов свидетельствуют о том, что EPHB6 играет ключевую роль в поддержании инвазивного и миграционного фенотипов клеток. Эти результаты коррелируют с данными многочисленных исследований, подчеркивающих фундаментальное значение рецепторов семейства Eph в контроле над клеточной подвижностью, пространственной полярностью и динамикой клеточно-матриксных взаимодействий [13–15].

Наблюдаемые изменения морфологии сфероидов Cal-27 с нокдауном *EPHB6* свидетельствуют о нарушении трехмерной организации клеток, что также согласуется с данными литературы, по которым сигнальный путь Eph/ephrin регулирует клеточную адгезию и экспрессию транскрипционных факторов эпителиально-мезенхимального перехода [16, 17]. С учетом регуляторной роли *EPHB6* можно предположить, что генетические изменения в этом гене непосредственно влияют на клеточный фенотип. Согласно результатам наших предыдущих исследований, мутации в *EPHB6* (сдвиг рамки считывания, точковые несинонимичные замены) влияют на функцию белка (согласно оценке с использованием биоинформатических инструментов (Sorting Intolerant From Tolerant и Polymorphism Phenotyping), и ассоциированы с повышенным риском рецидивирования у пациентов [7]. Вероятно, выявленные мутации модулируют межклеточную адгезию и подвижность, хотя точные молекулярные механизмы, лежащие в основе этих изменений, требуют дальнейшего изучения.

Несмотря на убедительность полученных данных, их интерпретацию следует проводить с учетом ряда ограничений. Двухмерные и трехмерные модели *in vitro* не полностью воспроизводят сложное микроокружение опухоли. Валидация полученных данных на ортотопических моделях *in vivo* может использоваться для проверки выдвинутой гипотезы о влиянии нокдауна *EPHB6* на клеточные функции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что подавление экспрессии *EPHB6* не только ингибирует миграцию и инвазию, но и снижает способность клеток РПР к поддержанию туморогенного потенциала *in vitro*. Предполагается, что подавление миграции, инвазии и туморогенности клеток опосредовано участием сигнального каскада Eph/ephrin в контроле ремоделирования цитоскелета, клеточной адгезии и экспрессии регуляторов эпителиально-мезенхимального перехода. Полученные данные обосновывают целесообразность дальнейшего изучения функциональной значимости мутаций в гене *EPHB6*, обнаруженных при рецидивах РПР у молодых пациентов.

Литература / References

1. Lenoci D., Moresco E., Cavalieri S. et al. Oral cancer in young adults: incidence, risk factors, prognosis, and molecular biomarkers. Front Oncol 2024;20;14:1452909. DOI: 10.3389/fonc.2024.1452909
2. Da Silva Souto A.C., da Silva B.N.M., Heimlich F.V. et al. Epidemiological landscape of tongue cancer in younger patients in a National Cancer Center in Brazil. Sci Rep 2024;14(1);30573. DOI: 10.1038/s41598-024-83470-9
3. Kolegova E.S., Patysheva M.R., Larionova I.V. et al. Early-onset oral cancer as a clinical entity: aetiology and pathogenesis. Int J Oral Maxillofac Surg 2022;51(12):1497–509. DOI: 10.1016/j.ijom.2022.04.005
4. Hong X., Quimby A.E., Mavedatnia D. et al. Oral cavity squamous cell carcinoma in young patients: a multi-institutional study of the Canadian Head & Neck Collaborative Research Initiative. J Otolaryngol Head Neck Surg 2025;54:19160216251351562. DOI: 10.1177/19160216251351562
5. Простакишина Е.А., Дампилова Т.Д., Кононова Л.А. и др. Молекулярный ландшафт рака полости рта у молодых пациентов. Генетика 2023;59(11):1290–302. DOI: 10.31857/S0016675823110103
Prostakishina E.A., Dampilova T.D., Kononova L.A. et al. The molecular landscape of oral cancer in young patients. Genetika = Russian Journal of Genetics 2023;59(11):1290–302. DOI: 10.31857/S0016675823110103
6. Patysheva M.R., Kolegova E.S., Khozyainova A.A. et al. Revealing molecular mechanisms of early-onset tongue cancer by spatial transcriptomics. Sci Rep 2024;14:26255. DOI: 10.1038/s41598-024-76044-2
7. Колегова Е.С., Коробейникова А.А., Воробьев Р.С. и др. Генетические нарушения рака полости рта, ассоциированные с прогрессированием заболевания в молодом возрасте. Генетика 2025;61(5):67–77. DOI: 10.31857/S0016675825050064
Kolegova E.S., Korobeinikova A.A., Vorobev R.S. et al. Genetic alterations of oral cancer associated with progression in young adult. Genetika = Russian Journal of Genetics 2025;61(5):67–77. (In Russ.).DOI: 10.31857/S0016675825050064
8. Liang L.Y., Geoghegan N.D., Mlodzianoski M. et al. Co-clustering of EphB6 and ephrinB1 in trans restrains cancer cell invasion. Commun Biol 2024;7(1):461. DOI: 10.1038/s42003-024-06118-4
9. Strozen T.G., Sharpe J.C., Harris E.D. et al. The EphB6 receptor: kinase-dead but very much alive. Int J Mol Sci 2021;22(15):8211. DOI: 10.3390/ijms22158211
10. Naito Y., Yoshimura J., Morishita S., Ui-Tei K. siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. Available at: https://sidirect2.rnai.jp/doc
11. National Center for Biotechnology Information. NCBI resource coordinator. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/.

12. InvivoGen. siRNA Wizard: Online Tool to Choose and Design short hairpin RNAs. Available at: https://www.invivogen.com/sirnawizard/
13. Shi J., Lyu C. The role of eph/ephrin-driven actomyosin contractility in promoting cell segregation and boundary formation. Int J Mol Sci 2026;27(7):3250. DOI: 10.3390/ijms27073250
14. Poliakov A., Cotrina M., Wilkinson D.G. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. Dev Cell 2004;7(4):465–80. DOI: 10.1016/j.devcel.2004.09.006
15. Darling T.K., Lamb T.J. Emerging roles for eph receptors and ephrin ligands in immunity. Front Immunol 2019;10:1473. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01473
16. Pasquale E.B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. Nat Rev Cancer 2010;10(3):165–80. DOI: 10.1038/nrc2806
17. Cho H.J., Hwang Y.S., Yoon J. et al. EphrinB1 promotes cancer cell migration and invasion through the interaction with RhoGDI1. Oncogene 2018;37(7):861–72. DOI: 10.1038/onc.2017.386

Вклад авторов
М.С. Третьякова: разработка концепции и дизайна исследования, руководство исследованием, статистическая обработка данных, написание текста статьи;
Е.С. Колегова, Р.С. Воробьев: сбор и обработка данных, написание текста статьи;
Е.А. Простакишина: сбор и обработка данных, подготовка иллюстративного материала;
И.К. Федорова, Д.Е. Кульбакин, Е.Л. Чойнзонов, Е.В. Денисов: написание текста статьи, редактирование.
Authors' contributions
M.S. Tretyakova: development of the research concept and design, research management, statistical data processing, article writing;
E.S. Kolegova, R.S. Vorobyov: data collection and processing, article writing;
E.A. Prostakishina: data collection and processing, preparation of illustrative material;
I.K. Fedorova, D.E. Kulbakin, E.L. Choynzonov, E.V. Denisov: article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors
М.С. Третьякова / M.S. Tretyakova: https://orcid.org/0000-0002-5040-931X
Е.С. Колегова / E.S. Kolegova: https://orcid.org/0000-0001-9122-3274
Е.А. Простакишина / E.A. Prostakishina: https://orcid.org/0000-0002-1405-3723
И.К. Федорова / I.K. Fedorova: https://orcid.org/0000-0002-7540-8532
Р.С. Воробьев / R.S. Vorobev: https://orcid.org/0000-0002-5705-8479
Д.Е. Кульбакин / D.E. Kulbakin: https://orcid.org/0000-0003-3089-5047
Е.Л. Чойнзонов / E.L. Choinzonov: https://orcid.org/0000-0002-3651-0665
Е.В. Денисов / E.V. Denisov: https://orcid.org/0000-0003-2923-9755

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № FGWM-2022-0015 (регистрационный номер темы 122020200182-8) и с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».
Funding. The study was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation No. FGWM-2022-0015 (state registration number 122020200182-8) and using the equipment of the Core facility "Medical genomics" of the Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences.

Статья поступила: 28.05.2026. **Принята к публикации:** 03.08.2026. **Опубликована онлайн:** 18.09.2026.
Article submitted: 28.05.2026. **Accepted for publication:** 03.08.2026. **Published online:** 18.09.2026.