

## СЕКЦИЯ II

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

### Доклады

#### Таргетное секвенирование и периферийный мониторинг в онкологии

П.М. Анфимов

*Thermo Fisher Scientific. Inc. (США), Москва*

Успехи научных и клинических исследований привели к смене парадигмы в онкологии: от анатомической классификации рака к молекулярному пониманию причин на уровне мутаций в определенных генах, активирующих или деактивирующих сигнальные пути в клетке. Это привело к появлению таргетных препаратов, оказывающих значимый терапевтический эффект для пациентов, несущих определенную мутацию. Число таргетных препаратов увеличивается, но при этом растет и количество мутаций, от выявления которых зависит назначение лекарства. Рутинный анализ большого числа генетических маркеров осложняется ограниченным количеством биоматериала, его генетической гетерогенностью, потребностью выявления увеличивающегося числа маркеров одновременно, недостаточной чувствительностью и высокой стоимостью традиционных молекулярных методов. Указанные трудности преодолимы с помощью высокопроизводительного секвенирования (next-generation sequencing, NGS). Технология таргетного секвенирования обладает высокой производительностью, точностью и чувствительностью. В сочетании с набором готовых и создаваемых на заказ таргетных панелей генов такой подход позволяет одновременно детектировать герминальные и соматические мутации с аллельной частотой  $\leq 1\%$ , выявлять инсерции-делеции, CNV и химерные транскрипты в нескольких нанограммах ДНК и РНК, полученных из опухолевой ткани, фиксированных формалином (FFPE) или из образцов «жидкой биопсии». Технология для захвата циркулирующих опухолевых клеток в сочетании с NGS позволяет проводить

периферийный мониторинг для раннего обнаружения повторного возникновения опухолей. Для задач, не требующих генотипирования большого количества локусов, а также для подтверждения результатов NGS используется секвенирование по Сэнгеру. Разработаны также протокол и программное обеспечение, позволяющие выявлять аллельные варианты с частотой  $\leq 5\%$ , используя капиллярные генетические анализаторы.

#### Эволюция запрета инфекционного переноса опухолевых клеток

Г.А. Белицкий, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая,  
М.Г. Якубовская

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

Невозможность заражения онкологическим заболеванием остается аксиомой, у которой, однако, есть исключения, проливающие свет на происхождение этой невосприимчивости.

В последнее время обнаружены и активно исследуются инфекционные гемобластозы моллюсков, в частности злокачественные гемобласты двусторчатого моллюска *Mya arenaria*, особи которого находятся на расстоянии сотен километров друг от друга и ведут оседлый образ жизни, имеют одинаковые генетические маркеры, отличные от маркеров их хозяев. Это было показано путем сравнительного анализа последовательностей митохондриального гена *mtCOI*, гена *EF1a* и набора нормальных полиморфизмов. Полученные данные свидетельствуют о клональном происхождении инфекционной опухоли. То же наблюдается у мидий *Mytilus trossulus* из Канады, моллюсков *Cerastoderma edule* и *Polititapes aureus* с берегов Испании.

Кроме того, оказалось, что в ареалах совместного обитания опухолевые гемоциты *Polititapes aureus* генетически соответствуют клеткам другого вида моллюсков — *Venerupis corrugata*, что свидетельствует о возмож-

ности распространения инфекции на близкородственные виды. Наиболее существенно, что среди *Venerupis corrugata* гемобластоз не распространяется, т. е. популяция исходного хозяина приобрела резистентность.

Аналогичный эффект наблюдается и среди сумчатых хищников *Sarcophilus harrisii* (тасманийских дьяволов), обитающих в Тасмании и Австралии. Начавшаяся около 20 лет назад эпизоотия, вызванная моноклоном злокачественной опухоли, которая передавалась при укусах и имела 100 % летальный исход, уничтожила до 90 % популяции. Расчеты предсказывали полное исчезновение этого редкого вида. Однако в последние годы началось размножение особей, у которых заболевание не наблюдалось. Продолжающееся в настоящее время исследование этого феномена позволило выявить у резистентных животных повышенную частоту встречаемости нескольких аллелей, имеющих отношение к иммунной системе.

В этом ряду существенно отличается моноклон венерической саркомы собак, который в течение примерно 11 000 лет паразитирует на собаках всех известных пород и может заражать других псовых — волков, койотов, лис. Опухоль в большинстве случаев не летальна, что не создает условий для популяционного сдвига.

Наличие инфекционных опухолевых клонов, поражающих в настоящее время популяции моллюсков и млекопитающих, позволяет считать, что эпидемическое распространение подобных им неоплазий играло и продолжает играть существенную роль в эволюционном совершенствовании системы трансплантационного противоопухолевого иммунитета.

## Альтернативная система кровоснабжения опухоли

А.А. Варганян

Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

**Введение.** Долгое время неоангиогенез рассматривался как единственная возможность доставки в опухоль питания и кислорода. В последние годы были идентифицированы альтернативные механизмы кровоснабжения опухоли. Формирование васкулярных каналов, ограниченных базальной мембраной, в отсутствие эндотелиальных клеток и фибробластов получило название «васкулогенная мимикрия». Тот факт, что васкулярные каналы, высланные опухолевыми клетками, присутствуют практически во всех злокачественных новообразованиях, говорит о том, что, по всей видимости, мы имеем дело с новой характеристикой опухолевой клетки.

**Задачи исследования.** Изучение функциональной значимости васкулогенной мимикрии.

**Материалы и методы.** В работе использовали культивирование опухолевых клеток в 2D- и 3D-культуре, неконтантное культивирование 2 клеточных линий, проточную цитометрию, электрофорез, вестерн-блоттинг, полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией, иммуногистохимическое и иммуноцитохимическое исследования, экспериментальные модели опухолей, растущих у мышей.

**Результаты.** В докладе обсуждается:

- клиническое значение васкулогенной мимикрии;
- статус васкулогенной мимикрии в условиях ингибирования ангиогенеза опухоли;
- влияние блокады васкулогенной мимикрии на рост экспериментальной меланомы, рака молочной железы, рака легкого, рака шейки матки и рака толстой кишки;
- «обучение» нераковых клеток васкулогенной мимикрии агрессивной опухолью.

**Выводы.** Впервые выдвигается гипотеза о том, что васкулогенная мимикрия является такой же органической составляющей биологии злокачественной опухолевой клетки, как и инактивация апоптоза, нестабильность генома, уход от иммунного надзора, индукция ангиогенеза, способность к метастазированию.

## Адаптерный белок NEDD9 как регулятор развития карциномы яичников

Р.Т. Габбасов<sup>1,2</sup>, Л. Бикл<sup>2</sup>, Ш.У. О'Брайн<sup>2</sup>, С. Сио<sup>3</sup>,  
С. Литвин<sup>2</sup>, Э.А. Големис<sup>2</sup>, Д.К. Конолли<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательская лаборатория «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань;

<sup>2</sup>Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия;

<sup>3</sup>Университет Токио, Токио

**Введение.** Карцинома яичников (КЯ) является наиболее опасной онкогинекологической патологией в мире. Для улучшения эффективности борьбы с КЯ необходимо развивать имеющиеся представления о молекулярных механизмах развития заболевания. Белок NEDD9 выполняет адаптерные функции во взаимодействии киназ с их субстратами в ряде молекулярных каскадов, нарушение работы которых может привести к агрессивным клеточным фенотипам. Несмотря на то, что участие белка NEDD9 продемонстрировано во многих солидных и некоторых гемопоэтических опухолях, роль его в развитии КЯ не изучена.

**Задачи исследования.** Целью представленной работы было исследование роли адаптерного белка NEDD9 в регуляции онкогенных молекулярных процессов при КЯ.

**Материалы и методы.** Использовали мышей линии MISIR-TAg, у которых развивается спонтанная КЯ, и клеточные линии MOVCAR, выделенные из асцитной

жидкости мышеч MISIR-Tag; мышеч линии *Nedd9*<sup>-/-</sup>; мышеч линии MISIR-Tag-low, у которых не развиваются спонтанные опухоли, использовали в качестве сингенных иммунокомпетентных реципиентов в экспериментах с имплантацией клеток MOVCAR, а также ряд методов молекулярной и клеточной биологии (иммуноблоттинг, проточная цитометрия, исследования клеточных фенотипов *in vitro* и т. д.).

**Результаты.** Делеция *Nedd9* в первичной опухоли приводила к достоверному уменьшению скорости роста опухолей, их метастазирования и отрицательно влияла на развитие опухолевых асцитов в случае как спонтанной, так и имплантированной КЯ. В *Nedd9*<sup>-/-</sup> опухолях была понижена активность онкогенных киназ FAK, SRC и AKT, а также транскрипционного фактора STAT3. При этом делеция *Nedd9* в опухолевом микроокружении лишь незначительно влияла на развитие и исследованные молекулярные процессы в опухолях. Полногеномный скрининг экспрессии матричной РНК в спонтанных опухолях выявил изменения в экспрессии ряда генов в ответ на делецию *Nedd9*. Интересно, что этот список генов коррелировал с опубликованными данными по генам, изменяющим экспрессию в раковых стволовых клетках из злокачественных опухолей маточных труб, кишечника и яичников.

**Заключение.** Представленное исследование определяет NEDD9 как белок, оказывающий существенное влияние на агрессивность КЯ благодаря регуляции внутриклеточной онкогенной молекулярной сигнализации.

## Эпигенетические аспекты рака молочной железы

Л.Ф. Гуляева

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», Новосибирск

**Введение.** МикроРНК играют принципиальную роль в эпигенетических механизмах регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне. Нарушение экспрессии микроРНК регистрируется во многих типах рака, включая рак молочной железы (РМЖ). Исследования последних лет показали, что профиль экспрессии некоторых онкогенных или онкосупрессорных микроРНК зависит от фенотипа РМЖ. Изучение механизмов, лежащих в основе изменения спектра микроРНК и экспрессии их генов-мишеней, открывает новые возможности не только в исследованиях канцерогенеза молочной железы, но и при поиске новых маркеров для диагностики и лечения.

**Задачи исследования.** Поиск кандидатных микроРНК, селективно экспрессирующихся в образцах РМЖ, различающихся по рецепторному статусу, и определение уровня их экспрессии. Выявление «генов-хозяев» для микроРНК, содержащих в промоторе последовательности для взаимодействия с рецепторами CAR, AhR,

ER, и экспериментальное подтверждение их экспрессии под действием ксенобиотиков.

**Материалы и методы.** Исследованы опухоли больных РМЖ перед лечением и после неoadъювантной терапии (*n* = 188). Были взяты также самки крыс линии вистар (*n* = 16). Использовали программы Pathway Studio 10, miRBase v21, TargetScan, miRanda и MicroCosm. Экспрессию микроРНК и матричной РНК оценивали с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени. Белковые продукты регулируемых микроРНК генов определяли методом вестерн-блоттинга или иммуногистохимически.

**Результаты.** Биоинформатический анализ выявил ряд потенциальных микроРНК: miR-21, -221, -200a, -146, -17, -27, -155, -125, -16, экспрессия которых меняется наряду с изменением экспрессии рецепторов ER, PR, HER2. Экспрессия онкогенных miR-21 и -221 достоверно увеличивается в трижды негативном РМЖ, тогда как miR-200a и -146 экспрессируются на высоком уровне в ER-положительном РМЖ. Снижение экспрессии miR-17 выявлено в трижды негативном РМЖ. Корреляции экспрессии miR-27 и -155 с фенотипом РМЖ не обнаружено. Экспрессия miR-16 коррелировала с высокой экспрессией рецепторов ER и HER2. Экспрессия miR-21, -221, -155, -222 и -205 менялась под действием неoadъювантной терапии. С помощью *in silico* были выявлены «гены-хозяева» микроРНК, потенциально регулируемые рецепторами-ксеносенсорами CAR, AhR ER, а также гены-мишени для таких микроРНК. Показана тканеспецифичная экспрессия исследуемых генов в различных органах самок крыс, зависящая от активации ядерных рецепторов ДДТ или бензо(а)пиреном.

**Выводы.** Выявлены микроРНК, специфично экспрессирующиеся в различных типах РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 15-15-30012).

## Предопухолевые изменения в бронхолегочном эпителии больных раком легкого: клинические аспекты и экспрессионные особенности

Е.В. Денисов<sup>1,2</sup>, О.В. Панкова<sup>1</sup>, В.Д. Якушина<sup>1</sup>, Т.С. Герашенко<sup>1,2</sup>, Л.А. Таширева<sup>1</sup>, С.А. Тузиков<sup>1</sup>, В.М. Перельмутер<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН», Томск;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

**Введение.** Канцерогенез в бронхолегочном эпителии — сложный многоступенчатый процесс, ведущий

к морфологическим нарушениям нормального эпителия и его переходу в рак через ряд последовательных предопухолевых изменений: дисрегенераторных (базальноклеточная гиперплазия (БКГ) и плоскоклеточная метаплазия (ПМ)) и диспластических (дисплазии I–III степени).

**Задачи исследования.** Мы оценили, насколько прогрессия плоскоклеточного рака и аденокарциномы легкого связана с предопухолевым процессом, протекающим в отдалении от первичного опухолевого очага. Кроме этого, мы охарактеризовали экспрессионный портрет различных предопухолевых изменений.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 104 больных раком легкого. Использованы морфологический и иммуногистохимический методы, лазерная микродиссекция, микроматричный экспрессионный анализ и стандартные статистические подходы.

**Результаты.** Показано, что в смежной с опухолью ткани легкого могут обнаруживаться различные сочетания предопухолевых изменений. Пациенты с наличием одновременно БКГ и ПМ характеризовались высокой частотой развития рецидивов, тогда как больные только с БКГ — повышенной вероятностью гематогенного метастазирования. Выраженность предопухолевого процесса положительно коррелировала с экспрессией Ki-67, p53 и Bcl-2 и отрицательно с CD138. БКГ, сочетанная с ПМ, чаще экспрессировала Ki-67, p53 и Bcl-2 и реже CD138 по сравнению с изолированной БКГ. Различные варианты дисрегенераторных изменений бронхов демонстрировали значимую ассоциацию со следующими биологическими процессами: изолированная БКГ — формирование внеклеточного матрикса, сочетанная БКГ — продукция межклеточных молекул, изолированная ПМ — воспаление, сочетанная ПМ — онкогенез.

**Выводы.** Таким образом, предопухолевый процесс в смежной с опухолью ткани легкого значительно ассоциирован с прогрессией рака легкого, а клинически релевантные варианты предопухолевых изменений характеризуются специфическими функциональными портретами.

*Исследование частично поддержано федеральной целевой программой (ФЦП) «Кадры» (№ 8719).*

## G-квадруплексы ДНК и онкологические заболевания

Н.Г. Долинная<sup>1</sup>, А.М. Оглоблина<sup>2</sup>, Н.Ю. Карпеченко<sup>2</sup>,  
М.Г. Якубовская<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Химический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва;

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

G-квадруплексы (G4) являются одной из наиболее изученных и биологически важных неканонических

форм ДНК. Исследования последних лет показали, что G4 образуются в геномной ДНК человека во всех фазах клеточного цикла, влияя на ключевые биологические процессы. Эти четырехспиральные структуры многолики. С одной стороны, они могут ингибировать экспрессию генов, блокировать нежелательную элонгацию теломерных ДНК, контролировать уровень сверхспирализации в геноме, служить мишенями противоопухолевых препаратов. С другой — образование G4 генерирует двуцепочечные разрывы, геномные перестановки, мутации и делеции, связанные с онкологическими заболеваниями и неврологическими расстройствами.

Для того, чтобы использовать противоопухолевый потенциал G4, применяют 2 подхода. В 1-м подходе предполагается взаимодействие низкомолекулярных соединений (G4-лигандов) с эндогенными G4, локализованными в промоторных областях онкогенов или теломерных ДНК злокачественных клеток. G4-лиганды узнают необычные структурные черты G4 и стабилизируют их *in vivo*, усиливая их ингибирующее действие на экспрессию онкогенов и механизм поддержания длины теломер под действием теломеразы, активированной в опухолевых клетках. Перспективный вариант этого подхода, развиваемый нашей научной группой, — эпигенетическая регуляция экспрессии сразу нескольких онкогенов, содержащих в промоторных районах квадруплексобразующие мотивы, под действием одного G4-лиганда (кластерная регуляция). В основе 2-го подхода лежит воздействие на G4-связывающие белки, которые участвуют в клеточной пролиферации и являются признанными мишенями таргетной терапии опухолей. В качестве агентов, ингибирующих сразу несколько сигнальных путей в опухолевых клетках (мультитаргетная стратегия), используют синтетические олигонуклеотиды, способные формировать квадруплексные структуры. Эти G4-аптамеры при введении в клетку могут взаимодействовать с несколькими белковыми мишенями, влияя на их биологические функции. В настоящее время нашей группой проводится анализ физико-химических свойств и плеiotропности (многонаправленности) действия специально сконструированных G4-аптамеров как потенциальных препаратов мультитаргетной противоопухолевой терапии.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (проект 16-04-00575\_А).*



## Влияние инфицирования *Bacteroides fragilis* на нарушение метаболизма полиаминов при колоректальном раке

О.Л. Кардымон<sup>1</sup>, А.В. Снежкина<sup>1</sup>, Д.В. Сидоров<sup>2</sup>,  
Г.С. Краснов<sup>1</sup>, Кудрявцева<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБУ «Московский научно-исследовательский  
онкологический институт им. П.А. Герцена» — филиал ФГБУ  
«Национальный медицинский исследовательский  
радиологический центр» Минздрава России, Москва

**Введение.** Колоректальный рак (КРР) — широко распространенное онкологическое заболевание, характеризующееся высокой смертностью. Одним из клинических факторов риска развития КРР являются воспалительные заболевания кишечника. Недавние исследования показали возможную связь между возникновением КРР, воспалительными заболеваниями кишечника и инфицированием микроорганизмами, главным образом *Bacteroides fragilis* (BF). Бактериальный энтеротоксин BF может активировать сперминоксидазу (SMO), окисляющую спермин в спермидин с высвобождением пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в качестве побочного продукта метаболизма полиаминов. Высвобождение H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в свою очередь, способствует развитию воспаления и повреждает ткани.

**Задачи исследования.** Оценка взаимосвязи инфицирования бактерией BF с нарушением метаболизма полиаминов при КРР.

**Материалы и методы.** Получены препараты ДНК и РНК из 50 парных образцов опухолевых и прилегающих к опухолям морфологически нормальных тканей от пациентов с первичным КРР. Оценку уровня экспрессии генов *ADC*, *PAOX*, *OAZ1*, *OAZ2*, *OAZ3*, *MAX*, *AD11*, *AMD1*, *SAT1*, *MYCN*, *AGMAT*, *AZIN1*, *ODC1*, *ARG2*, *SMS*, *MTAP*, *SRM*, *MYC*, *SMOX*, *C/EBPβ*, *EIF5A2* проводили с применением набора TaqMan Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, США) методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ΔΔCt-метод). Бактериальную нагрузку BF проводили с помощью абсолютного количественного ПЦР-анализа с использованием праймеров к гену *BfiI* и универсальных праймеров для оценки общего числа бактерий.

**Результаты.** Анализ изменения экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм полиаминов, репрограммирование энергетического метаболизма и воспаление, позволил выявить повышенную экспрессию генов *SMOX*, *ODC1*, *SRM*, *SMS*, *MTAP*, *c-Myc* и *C/EBPβ*.

**Выводы.** Согласно полученным данным можно предположить, что повышение метаболизма полиаминов при КРР опосредовано в большей степени повышенной экспрессией *c-Myc* и *C/EBPβ*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ  
(грант № 14-15-01083).

## Использование *Danio rerio* в качестве модельного объекта в экспериментальной онкологии

И.В. Мизгирев

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

**Введение.** В настоящее время одним из ключевых объектов биомедицинских исследований является рыба *Danio rerio*, или зебрафиш. Это обусловлено такими особенностями данного организма, как небольшие размеры, легкость содержания в лабораториях, высокая скорость развития, прозрачность эмбрионов и личинок, характерный для всех позвоночных план строения, полностью секвенированный геном и наличие гомологов в геноме человека для более чем 80 % генов зебрафиш.

**Задачи исследования.** Изучение возможностей применения рыбы зебрафиш *D. rerio* для моделирования различных аспектов опухолевого роста.

**Результаты.** В области экспериментальной онкологии рыбы *D. rerio* были успешно использованы для изучения химического канцерогенеза, включая уникальную возможность индукции опухолей не только у диплоидных, но и у полиплоидных рыб, что, в принципе, невозможно на других моделях позвоночных животных. Наличие лишенных пигментных клеток транспарентных линий зебрафиш, получивших название Sheer и Casper, позволяет изучать поведение перевивных и индуцированных канцерогенами или генно-инженерными методами опухолей *in vivo* практически в режиме «реального времени». При этом вместо специализированного оборудования достаточно использовать стандартный флуоресцентный стереоскопический микроскоп, снабженный чувствительной цифровой камерой. Наличие трансгенных линий зебрафиш tg(fli1a: egfp) и tg(EGFR: egfp), экспрессирующих флуоресцентные репортеры в клетках эндотелия, позволяет визуализировать процессы опухолевого ангиогенеза, а также инвазию злокачественных клеток в кровеносное русло организма-опухоленосителя. Разработанные в настоящее время методы индукции опухолей зебрафиш, способных к экспрессии различных флуоресцентных репортеров (EGFP, dsRed, Cherry и др.), позволяют обнаруживать и отслеживать динамику развития опухолей, начиная от уровня одной клетки до терминальной стадии опухолевого процесса, а также выявлять отдаленные метастазы на самых ранних стадиях их возникновения. Помимо этого, данный подход позволяет проводить не только качественную, но и количественную оценку динамики развития опухолей, например посредством измерения интенсивности их флуоресценции, а также исследовать реакцию опухолей на действие противоопухолевых препаратов.

**Выводы.** Полученные данные дают возможность использовать указанные модели для выполнения широкого спектра исследований в области экспериментальной онкологии, а также для проведения высокопроизводительного скрининга библиотек низкомолекулярных соединений на противоопухолевую активность.

## **Значение белков CRABP1 и CRABP2 в патогенезе злокачественных опухолей различного гистогенеза**

**Е.М. Чевкина, В.В. Делекторская, Г.Ю. Чемерис,  
А.М. Строганова, А.Д. Еникеев, В.М. Сафронова,  
И.Б. Зборовская**

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

**Введение.** Ретиноевая кислота (РК) регулирует важнейшие процессы жизнедеятельности клетки, включая дифференцировку, пролиферацию, апоптоз и др. Функциональная активность РК реализуется посредством ядерных рецепторов — транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию целого ряда ретиноид-респонсивных генов-мишеней, обладающих зачастую противоположными функциями в контексте канцерогенеза и опухолевой прогрессии. Доставка РК к рецепторам либо секвестирование в цитоплазме и стимуляция последующего катаболизма зависят от белков, связывающих РК, в первую очередь CRABP1 и CRABP2 (Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1 и 2). Предполагается, что именно взаимодействие с этими белками определяет последующее связывание РК с различными рецепторами и, как результат, различную (проканцерогенную или опухолесупрессорную) ее активность. Белки CRABP представляются перспективными в от-

ношении использования в качестве маркеров, поскольку для ряда опухолей показано изменение их экспрессии. Однако данные о значении этих изменений указывают на то, что экспрессия CRABP может как способствовать, так и препятствовать возникновению опухолей и опухолевой прогрессии. Остается открытым и вопрос о сходстве или различии действия белков CRABP как в отношении активации РК, так и в аспекте опухолевой прогрессии.

**Результаты.** Мы впервые продемонстрировали протуморогенную функцию белка CRABP1 и его участие в патогенезе и прогрессии злокачественных новообразований мезенхимального и нейроэндокринного происхождения. Более того, обнаружено, что эта функция может быть не связана с активностью РК. Мы показали, что CRABP1 может выполнять также противоположную функцию в контексте опухолевой прогрессии в тех новообразованиях, в которых показана опухоль-промоторная роль CRABP2. В частности, в нейробластомах, для которых ранее обнаружена корреляция CRABP2 с амплификацией *MYC-N* и другими генетическими нарушениями, мы выявили обратную корреляцию экспрессии CRABP1 с наличием генетических aberrаций в низкодифференцированных опухолях. Кроме этого, уровень CRABP1 был выше в более дифференцированных опухолях. При анализе образцов немелкоклеточного рака легкого обнаружено наличие положительной корреляции между экспрессией CRABP1 и CRABP2, наиболее выраженной на ранних стадиях заболевания.

**Выводы.** Результаты свидетельствуют о противоположной роли белков CRABP в опухолевой прогрессии и возможной их взаиморегуляции, которая могла бы способствовать поддержанию баланса активности РК в клетке.

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
РФФИ (грант № 16-04-01559).*

## Постеры

### Появление в опухоли молочной железы при проведении неоадьювантной химиотерапии новых клонов, несущих амплификации, приводит к метастазированию

М. К. Ибрагимова<sup>1,2</sup>, М. М. Цыганов<sup>1,2</sup>,  
Н. В. Литвяков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН», Томск;  
<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

**Задачи исследования.** Изучение изменения статуса CNA (Copy Number Aberration) опухоли молочной железы в процессе неоадьювантной химиотерапии (НХТ).

**Материалы и методы.** Были обследованы 30 больных раком молочной железы (IIA–IIIB стадий), которые получали 2–4 курса НХТ по схемам FAC или CAH. Исследовали биопсийный материал до лечения и операционный материал после проведения НХТ каждого пациента. CNA-статус анализировали с помощью микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, США).

**Результаты.** В процессе НХТ у 13 (43 %) из 30 больных уменьшалось количество мутантных опухолевых клонов (вплоть до полной элиминации (4 случая полной генетической регрессии опухоли)), в 8 (27 %) случаях НХТ не оказала никакого влияния на опухоль и статус CNA. У 9 (30 %) пациентов наблюдались случаи появления в процессе НХТ новых CNA (делетий и/или амплификаций). В том случае, если у больных под действием НХТ происходило образование новых опухолевых клонов, несущих амплификации (6 (20 %) из 30 пациентов), в 100 % случаев это было сопряжено с развитием гематогенных метастазов, у остальных 24 больных не зарегистрировано гематогенных метастазов в 5-летний период наблюдения (по методу Каплана–Майера;  $p = 0,00000 \log\text{-rank}$ -тест). Установлено, что новые клоны, образованные под действием НХТ, содержали амплификации в следующих локусах: 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 19p, 18chr. Были аннотированы все гены, локализованные в данных хромосомных регионах, и наше внимание привлекли гены, которые, по данным литературы, участвуют в индукции плюрипотентных стволовых клеток (iPC). Была оценена экспрессия в опухоли некоторых из них (5p15.33 TERT; 6p21.31 OCT3; 7q32.1 SMO; 8q24 MYC; 8q11.21 SNAI2; 9p21.2 MOB3B; 9q22.33 TGFB1; 9q31 KLF4; 10p11.23 BMI1; 10p13 VIM; 13q12 FLT3; 16p11.2

LAT; 18q21.1 SMAD2; 19p13.3 LMNB2; 19p13.2 KLF1; 19q13.2 TGFb1).

**Выводы.** Образованные в результате действия НХТ на опухоль новые клоны, несущие амплификации, ассоциированы с метастазированием.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-04-03091A).*

### Значимость экспрессии LMP-1 в опухолях слюнных желез и ротовой полости, ассоциированных с вирусом Эпштейна–Барр

А. Б. Иванова<sup>1</sup>, Е. В. Моисеенко-Голубовича<sup>1</sup>,  
В. В. Грома<sup>1</sup>, М. Ф. Муровская<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Рижский университет им. П. Страдина, Рига;  
<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии  
им. А. Кирхенштейна, Рига

**Введение.** Герпес-вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) участвует в патогенезе ряда доброкачественных и злокачественных новообразований человека, включая рак носоглотки. Латентный мембранный белок 1 (LMP-1), кодируемый геном *LMP-1*, является основным белком-онкогеном ВЭБ. Это трансмембранный белок, который через активизацию ряда сигнальных путей и транскрипционных факторов клетки, приводит к ее трансформации и пролиферации.

**Задачи исследования.** Определение LMP-1 в опухолевых тканях рака ротовой полости и слюнных желез. Выявить взаимосвязь экспрессии LMP-1 с течением заболевания. Сравнение данных показателей в случаях доброкачественных и злокачественных опухолей слюнных желез и плоскоклеточного рака полости рта с раком носоглотки.

**Материалы и методы.** Для исследования данных иммуногистохимического анализа в целях идентификации LMP-1 были отобраны образцы тканей (диаметром около 5 мм) опухоли слюнных желез, плоскоклеточного рака ротовой полости и рака носоглотки во время операции.

**Результаты.** Иммуногистохимически в базальном и парабазальном слоях плоскоклеточного рака ротовой полости была выявлена экспрессия LMP-1. Все образцы плоскоклеточного рака также показали экспрессию LMP-1 в инфильтрированных лимфоцитах. Кроме этого, была отмечена тенденция к увеличению интенсивности окрашивания с одновременным снижением уровня дифференциации опухоли. В доброкачественных образованиях экспрессия LMP-1 не обнаружена.

**Выводы.** Присутствие LMP-1, главного онкобелка вируса, во многих ВЭБ-позитивных образцах плоско-клеточного рака ротовой полости различной локализации указывает на то, что эта скрытая инфекция может влиять на онкогенную трансформацию инфицированного эпителия полости рта.

## Поиск новых регуляторов клеточного движения среди недавно обнаруженных партнеров связывания ГТФазы Ras

М.Е. Ломакина<sup>1</sup>, А. Полесская<sup>2</sup>, А.Ю. Александрова<sup>1</sup>, А. Готро<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

<sup>2</sup>Ecole Polytechnique, Palaiseau

**Введение.** ГТФаза Ras является одним из ключевых регуляторов клеточного движения. Ее фосфорилирование обеспечивает, в частности, запуск сигнальных путей, ответственных за формирование активного клеточного края и осуществление инициального этапа движения. Увеличение экспрессии Ras приводит к перераспределению активности по периметру клетки (R. Pankov и соавт., 2005). Подобные фенотипические изменения характерны для ряда опухолевых клеток, способных к инвазии (М.Е. Ломакина и др., 2016). В последнее время были обнаружены новые участники Ras-активируемых сигнальных каскадов, в частности арпин (Dang и соавт., 2013), и показана его роль как возможного прогностического маркера при развитии рака молочной железы (М.Е. Ломакина и др., 2016).

**Задачи исследования.** Наши коллеги провели масштабный скрининг и обнаружили ряд ранее неизвестных партнеров связывания фосфорилированной ГТФазы Ras. Целью данного исследования стало выявление возможных новых регуляторов клеточной миграции и инвазии среди обнаруженных партнеров активного Ras.

**Материалы и методы.** Мы отобрали 6 партнеров связывания активного Ras из предложенного списка, для которых не известно других значимых функций и которые являются хорошими кандидатами для анализа их участия в регуляции клеточного движения: SASH1, CASKIN2, ANKS1A, FAM49A, FAM49B, eIF4G1. Было исследовано влияние снижения уровня экспрессии отобранных белков (путем трансфекции соответствующих esiRNA в клетки линии молочной железы человека MCF10A) на миграцию одиночных клеток в редкой культуре. Для этого проводили прижизненную видеосъемку клеток и последующий анализ скорости и направленности их движения на протяжении 24 ч.

**Результаты.** Сравнительный анализ миграции показал, что снижение экспрессии SASH1, CASKIN2, ANKS1A сопровождалось уменьшением скорости и уве-

личением направленности движения клеток. Однако в случае трансфекции esi-CASKIN2 наблюдались наиболее слабые эффекты на клеточную миграцию. Уменьшение экспрессии FAM49A, FAM49B и eIF4G1, напротив, приводило к увеличению скорости и снижению направленности клеточного движения. Среди этой группы белков трансфекция esi-eIF4G1 приводила к наиболее выраженным эффектам.

**Выводы.** Подавление экспрессии SASH1, ANKS1A и eIF4G1 приводит к существенному изменению характера движения клеток. Эти белки могут рассматриваться в качестве новых регуляторов клеточного движения, и механизмы их действия требуют дальнейшего изучения.

*Работа частично выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-34-01316).*

## Генетическая поликлональность клеточной линии рака почки

А.А. Лушников<sup>1</sup>, Н.В. Шилова<sup>2</sup>, Ж.Г. Маркова<sup>2</sup>, Ю.О. Козлова<sup>2</sup>, Л.Ф. Морозова<sup>1</sup>, А.В. Балбуцкий<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

**Введение.** Известно несколько подтипов рака почки, которые различаются по патоморфологическим, гистологическим, иммунологическим и генетическим характеристикам. Наиболее распространен светлоклеточный рак почки (СРП), составляющий 60–85 % всех диагностированных случаев рака почки. Для СРП характерны высокая гетерогенность, быстрое метастазирование и неблагоприятный прогноз. Молекулярно-генетическая характеристика СРП возможна с помощью модельных клеточных линий, полученных из хирургически удаленных первичных опухолей или биопсийного материала.

**Задачи исследования.** Изучение цитогенетических особенностей стабильной клеточной линии Рпоч1-КК с морфологическими характеристиками СРП.

**Материалы и методы.** Хромосомные препараты получены из фиксированных клеток линии Рпоч1-КК. Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) проводили с локус-специфичными ДНК-зондами для хромосом 13, 21, 18 и Y, мультиплексную FISH (mFISH) — с помощью набора 24X Cyto-MetaSystems 24 color kit (MetaSystems, Германия). Определяли хромосомный состав и копийность отдельных хромосом в метафазах и интерфазных ядрах (клетках).

**Результаты и обсуждение.** Ранее в клетках Рпоч1-КК мы обнаружили 2 мутации генов *TP53* и *VHL*, а также 2 полиморфизма гена *TP53* в гомозиготном состоянии, которые могут быть связаны с хромосомными абберациями. Генетический анализ опухолевых клеток



в 2- и 3-суточной культуре линии Рпоч1-КК, полученной от пациентки с СРП, выявил мозаичность по хромосомам 13, 21, X, 18, тестированную методом FISH со специфичными ДНК-зондами. Обнаружена трисомия и тетрасомия по хромосоме 21 (субклоны 2/2, 2/3, 2/4) и анеуплоидия по хромосоме 18 и X-хромосоме (субклоны с соотношением хромосом 2/2, 2/3, 1/2). В метафазных пластинках выявлено не менее 18 структурных перестроек, включая несбалансированные транслокации с формированием дериватных хромосом, изохромосомы 1 и 8 с транслоцированными сегментами негомологичных хромосом, инсерция хромосомы 14 в хромосому 5, теломерная ассоциация между хромосомами 2 и 11 и дицентрическая хромосома вследствие транслокации между хромосомами 3, 19 и 20.

**Выводы.** С помощью метода FISH в клеточной линии СРП были обнаружены субклоны с различными модальными наборами хромосом, многочисленные хромосомные перестройки и дериваты. Полученные данные говорят о накоплении в опухоли генетических нарушений, включая изменение копийности отдельных хромосом и хромосомных фрагментов с последующей анеуплоидией и усилением генетической нестабильности.

## Взаимные изменения свойств опухолевых клеток и макрофагов, происходящие при совместном культивировании

Л.В. Марченко, И.В. Гужова

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

**Введение.** Одним из важнейших компонентов микроокружения опухоли являются макрофаги. Они обеспечивают опухолевые клетки различными биоактивными молекулами, например EGF, TGF, VEGF и др. Экспрессия этих факторов макрофагами модулирует пролиферацию и метастазирование опухолевых клеток. В процессе развития опухоли макрофаги способны изменять свой фенотип на более выгодный для опухолевых клеток, что проявляется, в частности, в активации ангиогенеза и усилении гипоксии. Малоизученным остается вопрос о том, как изменяется во времени фенотип популяции макрофагов микроокружения опухоли, является ли этот процесс обратимым, и какие изменения при этом происходят в опухолевых клетках.

**Задачи исследования.** Исследование изменений во времени миграции и инвазии опухолевых клеток, вызванных совместным культивированием с макрофагов. Изучение способности макрофагов дифференцироваться в проопухолевый M2-фенотип при их культивировании в присутствии опухолевых клеток.

**Материалы и методы.** В качестве модели макрофагов мы использовали линию THP-1, модели опухоле-

вых клеток A431. Выявление маркеров проопухолевого M2-фенотипа макрофагов, а также маркеров метастазирования (Е-кадгерин) проводили с помощью методов электрофореза и иммуноблоттинга. Анализ активности ММП-2 в A431 после сокультивирования с THP-1 выполняли с использованием метода зимографии. За миграционными свойствами клеток A431 наблюдали с помощью прибора xCELLigence RTCA DP в режиме реального времени.

**Результаты.** Мы использовали клетки карциномы A431 после 2 различных этапов сокультивирования: 1-й этап — A431 после инкубации с наивными THP-1, 2-й — A431 после инкубации с THP-1, предварительно культивированными 24 ч с A431. Мы обнаружили, что миграционная активность A431 резко возрастала после 1-го этапа и снижалась после 2-го. Для оценки инвазии мы определяли активность ММП-2 и уровень Е-кадгерина в опухолевых клетках. Оказалось, что активность ММП-2 в клетках A431 значительно возрастала после 1-го этапа и резко уменьшалась после 2-го. Уровень Е-кадгерина снижался после обеих инкубаций примерно в 2 раза.

Для подтверждения перехода макрофагов к проопухолевому M2-фенотипу мы определяли уровень аргиназы 1. После 1-го этапа содержание аргиназы 1 увеличивалось в 2,5 раза по сравнению с начальным уровнем, после 2-го этапа — приближался к начальному.

**Выводы.** Наши исследования позволяют предположить, что изменения, происходящие с макрофагами, попавшими в микроокружение опухоли, не фатальны. Задача будущих исследований состоит в том, чтобы найти триггеры редифференцировки проопухолевых макрофагов в нормальный фенотип.

## Исследование туморогенного потенциала клеток линии H1299, сверхэкспрессирующих убиквитинлигазу PIRH2

В.О. Меркулов, А.А. Дакс, О.А. Федорова, О.Ю. Шувалов, Е.А. Васильева, Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

**Введение.** Убиквитинзависимая система протеолиза участвует в различных физиологических процессах, включая движение клетки по клеточному циклу, апоптоз, ответ на повреждение ДНК и репарацию. E3-лигазы как наиболее специфические ферменты системы убиквитинирования представляют особый интерес в качестве мишеней для лекарственных препаратов из-за их высокоспецифичной способности регулировать стабильность и функции белков. Белок Pirh2 — продукт гена *RCHY1* человека — относится к семейству RING-домен, содержащих E3-убиквитинлигаз. Pirh2 способен убиквитинировать ряд ключевых

факторов, задействованных в регуляции клеточного цикла, пролиферации, ответа на повреждение ДНК, таких как p53, p73, p63, p27 и c-Myc.

**Задачи исследования.** Для того чтобы приблизиться к пониманию роли белка Pirh2 в процессе опухолеобразования, мы создали клеточные линии, сверхэкспрессирующие белок Pirh2, на основе раковой клеточной линии человека H1299 (немелкоклеточный рак легкого человека).

**Материалы и методы.** В ходе выполнения работы были использованы следующие методы: молекулярное клонирование, трансформация *Escherichia coli*, лентивирусная трансдукция, вестерн-блоттинг, тест на застывание раны, динамический мониторинг клеточной пролиферации в режиме реального времени.

**Результаты.** Результаты экспериментов показывают, что клетки, сверхэкспрессирующие белок Pirh2, обладают повышенным потенциалом миграции, а также большей скоростью пролиферации по сравнению с контрольными клетками без сверхэкспрессии Pirh2.

**Выводы.** Полученные данные имеют важное значение не только с точки зрения фундаментального научного знания, но также вносят вклад в такие актуальные области медицинской науки, как молекулярная онкология и фармакология. Как было сказано выше, перспективно рассматривать E3-убиквитинлигазы в качестве потенциальных мишеней для противоопухолевой терапии, но для этого необходимо выяснить все молекулярные аспекты функциональности данных белков.

## Мутации в гене *TP53* – значимый фактор прогноза высокоагрессивной В-клеточной лимфомы

А.Е. Мисюрина<sup>1,2</sup>, В.А. Мисюрин<sup>2,3</sup>, А.В. Мисюрин<sup>2,3</sup>,  
А.М. Ковригина<sup>1</sup>, С.К. Кравченко<sup>1</sup>, Е.А. Барях<sup>4</sup>,  
А.У. Магомедова<sup>1</sup>, Е.Н. Пушкова<sup>2,3</sup>, Ю.П. Финашутина<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Гематологический научный центр»

Минздрава России, Москва;

<sup>2</sup>ООО «ГеноТехнология», Москва;

<sup>3</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва;

<sup>4</sup>ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница № 52  
Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

**Введение.** Мутации в гене *TP53* приводят к блокированию апоптоза в клетках и возникновению в них дополнительных онкогенных событий, способствующих опухолевой прогрессии.

**Задачи исследования.** Оценка роли мутаций в гене *TP53* у больных высокоагрессивной В-клеточной лимфомой.

**Материалы и методы.** За период наблюдения (медиана наблюдения 29,1 (6,3–99,8) мес) в ГНЦ получали лечение 23 пациента с диагнозом высокоагрессивной

В-клеточной лимфомы; соотношение мужчин и женщин – 1,0:2,3. Медиана возраста – 49 (30–76) лет. Реаранжировка гена *c-MYC* (*c-MYC-R*) выявлена у 16 (70 %) больных, у 7 больных – double-hit лимфома (DHL); у 5 – *MYC*+/*BCL2*+, у 2 – *MYC*+/*BCL6*+. Double-expressor (DE) лимфому (коэкспрессия белков *MYC*  $\geq 40$  % и *BCL2*  $\geq 50$  %) имели 11 (48 %) из 23 пациентов. К группе высокого и промежуточно высокого риска относились 19 (82 %) больных согласно международному прогностическому индексу. Лечение по протоколу ЛБ-М-04+R проходили 16 больных, R-(DA)–ЕРОСН – 5, R-СНОР-21 – 2. В 5 случаях была выполнена трансплантация аутологичных стволовых кроветворных клеток (аутоТСКК).

Для выявления мутаций в экзонах 5–8, кодирующих ДНК-связывающий домен гена *TP53*, выполнено секвенирование по Сэнгеру на материале ДНК, выделенной из парафиновых блоков биоптатов опухоли (Extra DNA kit, ООО «ГеноТехнология», Россия). Праймеры к гену *TP53* были синтезированы в компании Евроген на основании данных о нуклеотидных последовательностях, доступных онлайн (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для оценки влияния на общую выживаемость (ОВ) и время до прогрессирования заболевания таких факторов, как наличие мутации в гене *TP53* (*MUT-TP53*), *c-MYC-R*, DHL, DE-лимфома, пол, вариант терапии проведен однофакторный и многофакторный Кокс-регрессионные анализы (Statistica 10).

**Результаты.** *MUT-TP53* выявлены в 8 (35 %) случаях: с.535C>T – 45,6 % p.H179Y, с.524G>C – 15,6 % p.R175P, с.743G>A – 75,6 % p.R247Q, с.487T>A – 25,2 % p.Y163N, с.824G>A – 75 % p.C275Y, с.713G>A – 87,7 % p.C238Y, с.745A>G – 31,9 % p.R249G, с.639A>G – 41,8 % p.R213R. Группы больных с *WT-TP53* и *MUT-TP53* были сопоставимы по основным клиническим характеристикам, за исключением возраста. Так, медиана возраста у пациентов с *MUT-TP53* составила 40 (30–50) лет, у пациентов с *WT-TP53* – 58 (33–74) лет ( $p = 0,067$ ). По результатам однофакторного анализа больные с *MUT-TP53* имели худшие показатели ОВ и более высокую вероятность раннего прогрессирования заболевания. Так, медиана ОВ больных с *MUT-TP53* составила 6,2 (0,7–9,5) мес против 29,1 (0,6–99,8) мес у пациентов с *WT-TP53* ( $p = 0,004$ ). Медиана времени до прогрессирования заболевания у больных с *MUT-TP53* составила 3,5 (0,7–9,5) мес против 26,8 (0,6–99,8) мес у пациентов с *WT-TP53* ( $p = 0,004$ ).

При проведении многофакторного анализа наличие мутации *TP53* явилось независимым прогностическим фактором в отношении ОВ и времени до прогрессирования заболевания.

**Выводы.** Определение мутаций в ДНК-связывающем домене гена *TP53* является важным и необходимым этапом диагностики высоко агрессивных В-клеточных лимфом наряду с определением реаранжировок генов *c-MYC*, *BCL2*, *BCL6*. Мутации в гене *TP53* – значимый фактор прогноза у больных высоко агрессив-

ными В-клеточными лимфомами, оказывающий негативное влияние на ОВ и увеличивающий вероятность раннего прогрессирования заболевания.

## Хитиназоподобный белок YKL39 стимулирует миграцию моноцитов *ex vivo* и негативно коррелирует с лимфогенным и гематогенным метастазированием при раке молочной железы

И.В. Митрофанова<sup>1-3</sup>, М.В. Завьялова<sup>2,3</sup>, Н.В. Литвяков<sup>1,2</sup>,  
Н.В. Чердынцева<sup>1,2</sup>, Ю.Г. Кжышковска<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

<sup>2</sup>НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

**Введение.** Хитиназоподобные белки являются секреторируемыми факторами с лектиновыми свойствами. YKL39 — уникальный представитель этого семейства, так как он присутствует только у человека и как на генном, так и на белковом уровне отсутствует у мышей. Однако его биологическая активность и ассоциация с опухолевой прогрессией до настоящего времени остались неизвестными.

**Задачи исследования.** Установить новые функции человеческого белка YKL39, секреторируемого альтернативно-активированными макрофагами.

**Материалы и методы.** Для функционального теста на миграцию использовали свежeweделенные с помощью системы магнитной сепарации CD14<sup>+</sup> моноциты человека. В исследовании применяли супернатанты клеток НЕК293, стабильно трансфицированные pSNAPtag-YKL39-FLAG и контрольным вектором pSNAPtag. Для теста на эндоцитоз YKL39 был добавлен в культуру макрофагов человека вместе со специфическим лигандом для скавенджер-рецептора стабилина 1 SPARC, меченным FITC. После этого проводили анализ интернализации лиганда с помощью проточной цитофлуориметрии и визуализацию транспорта во внутриклеточные везикулы с применением иммунофлуоресцентной окраски с конфокальной микроскопией. Исследование генной экспрессии YKL39 выполняли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

**Результаты.** С помощью функциональных модельных систем *ex vivo*, основанных на первичных макрофагах, мы проводили оценку влияния YKL39 на миграционную активность макрофагов. Впервые было показано, что как очищенный YKL39, так и YKL39, секреторируемый в кондиционированных супернатантах стабильно трансфицированных клеток, обладает выраженной способностью усиливать миграцию моно-

цитов. Также был осуществлен анализ эффекта влияния YKL39 на функциональную активность стабилина 1 в макрофагах, ассоциированных с опухолью, с помощью теста на эндоцитоз. Было установлено, что эндоцитоз SPARC не нарушается в присутствии YKL39 и внеклеточный YKL39 эндоцитируется альтернативно-активированными макрофагами, положительными к стабину 1, параллельно со SPARC. Проведенное на клинических образцах рака молочной железы исследование генной экспрессии YKL39 показало обратную корреляцию с лимфогенным ( $p = 0,036$ ) и гематогенным ( $p = 0,033$ ) метастазированием. Более того, высокий уровень экспрессии YKL39 был ассоциирован со 100 % безметастатической выживаемостью (74 пациента, период наблюдения около 80 мес;  $p = 0,015$ ).

**Выводы.** Таким образом, мы установили, что маркер опухолеассоциированных макрофагов YKL39 увеличивает миграционную активность моноцитов в культуре, а также обратно коррелирует с метастазированием при раке молочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-15-00350).

## Значение цитогенетических и молекулярно-цитогенетических исследований при множественной миеломе

А.С. Мкртчян<sup>1</sup>, Л.А. Кесаева<sup>2</sup>, И.Н. Солдатов<sup>1</sup>,  
Е.А. Османов<sup>2</sup>, А.В. Мисюрин<sup>2</sup>, Ю.П. Финашутина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ООО «ГеноТехнология», Москва;

<sup>2</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

**Введение.** Множественная миелома (ММ) — злокачественное В-клеточное лимфопролиферативное заболевание с клональной пролиферацией атипичных плазматических клеток в костном мозге, реже в экстрамедуллярных очагах, синтезирующих моноклональные иммуноглобулины или легкие цепи. Заболевание характеризуется выраженной цитогенетической, молекулярной и пролиферативной гетерогенностью.

Для диагностики ММ важными являются результаты цитогенетического и молекулярно-цитогенетического исследований. Кариотипирование при ММ осложняется не только низкой митотической активностью плазматических клеток *in vitro*, но и субмикроскопическими цитогенетическими нарушениями. Для преодоления этих трудностей рекомендуется проводить исследование методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH).

**Задачи исследования.** Исследование метафазных пластинок с помощью стандартного цитогенетического метода G-окраски и FISH-анализа на наличие хромосомных aberrаций и сравнение полученных результатов.

**Материалы и методы.** В нашей работе проведены цитогенетические и молекулярно-цитогенетические исследования образцов костного мозга 50 больных ММ.

**Результаты.** Анализ кариотипов не выявил хромосомных нарушений ни у одного больного. В то время как у 14 (28 %) пациентов методом интерфазного FISH обнаружены различные цитогенетические нарушения: у 6 человек — перестройка гена *IGH*, у 3 — трисомия участка хромосомы 11q12-q23, у 2 — трисомия участка 1q21, у 2 — делеция гена *IGH*, у 1 — трисомия участка 8q24.1, у 2 — делеция участка 13q14, у 1 — трисомия гена *IGH*, у 1 — делеция участка 17p13, у 1 — трисомия участка хромосомы 17 p13 (или трисомия хромосомы 17). При этом FISH-исследования метафазных пластинок у этих же больных показали отсутствие в них соответствующих хромосомных изменений.

**Выводы.** Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что данные цитогенетического исследования методом дифференциального окрашивания хромосом при ММ не отражают реальной картины хромосомных aberrаций. Показано, что FISH-исследование для больных ММ является важным и ключевым звеном для постановки цитогенетического диагноза.

## Фосфатазы CTDSPL/1/2 способны подавлять рост опухолевых клеток посредством регуляции активности белка Rb при раке легкого

Г.А. Пузанов<sup>1</sup>, Е.Е. Егоров<sup>1</sup>, А.А. Дмитриев<sup>1</sup>,  
М.А. Афанасьева<sup>1</sup>, А.Д. Бениаминов<sup>1</sup>, Х.С. Вишнякова<sup>1</sup>,  
Т.Т. Кондратьева<sup>2</sup>, В.И. Кашуба<sup>3</sup>, В.Н. Сенченко<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

<sup>3</sup>Karolinska Institute, Стокгольм

**Введение.** Белки CTDSPL, CTDSP1 и CTDSP2 семейства малых сериновых фосфатаз (SCP) играют регуляторную роль в ряде жизненно важных процессов. В частности, показано, что фосфатаза CTDSPL способна активировать белок Rb — супрессор опухолевого роста, играющий ключевую роль в регуляции фазового перехода G1—S клеточного цикла. Значительное сходство аминокислотных последовательностей (~ 83 %) и трехмерных структур фосфатаз семейства SCP указывает на аналогичные функции этих ферментов.

**Задачи исследования.** В данной работе показана опухолеподавляющая активность всех трех фосфатаз CTDSPL/1/2 в клеточной линии A549 рака легкого.

**Материалы и методы.** Клетки были трансфицированы плазмидами, содержащими последовательность одного из исследуемых генов: *CTDSPL*, *CTDSP1* или *CTDSP2*. Во всех случаях выявлено заметное снижение скорости роста трансфицированных клеток по срав-

нению с исходными. Методом вестерн-блоттинга оценили изменение содержания фосфорилированной по Ser807/811 формы белка Rb по отношению к тотальному Rb в клеточной линии до и после трансфекции.

**Результаты.** Обнаружено снижение уровня фосфорилированной формы Rb более чем в 2 раза для каждой из фосфатаз семейства SCP. Для оценки процессов, происходящих в первичных опухолях легкого, определили экспрессию генов *CTDSPL*, *CTDSP1* и *CTDSP2* на выборке из 28 парных образцов немелкоклеточного рака легкого методом количественной полимеразной цепной реакции. Выявлено значительное (в среднем в 5 раз) снижение уровней матричной РНК генов всех 3 фосфатаз в большинстве исследованных опухолей.

**Выводы.** Полученные данные указывают на способность фосфатаз CTDSPL, CTDSP1 и CTDSP2 подавлять рост опухолевых клеток легкого и увеличивать долю активной дефосфорилированной формы белка Rb. Низкий уровень экспрессии генов фосфатаз в первичных опухолях легкого может привести к снижению содержания активной формы белка Rb и, соответственно, к ослаблению контроля клеточного цикла.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-50-00060).*

## Использование полноэкзомного секвенирования для поиска молекулярно-генетических предикторов рецидива после отмены терапии ингибиторами тирозинкиназ у пациентов с хроническим миелоидным лейкозом

С.А. Смирнихина<sup>1</sup>, А.В. Лавров<sup>1</sup>, Э.П. Адильгереева<sup>1</sup>,  
Е.Ю. Челышева<sup>2</sup>, О.А. Шухов<sup>2</sup>, А.Г. Туркина<sup>2</sup>, С.И. Куцев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва;

<sup>2</sup>ФГБУ «Гематологический научный центр»  
Минздрава России, Москва

**Введение.** Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) — онкогематологическое заболевание, обусловленное образованием химерного гена *BCR/ABL*, обладающего высокой тирозинкиназной активностью. Начиная с 2001 г. ХМЛ эффективно лечится ингибиторами тирозинкиназ (ИТК), длительная терапия позволяет у 80 % пациентов достигнуть глубокой молекулярной ремиссии. Побочные действия и высокая стоимость лечения заставляют искать пути возможной отмены терапии у таких больных. Однако первые исследования показывают, что около 50 % пациентов утрачивают молекулярную ремиссию. Предпринимаемые попытки объяснить и прогнозировать рецидивирование пока безуспешны.

**Задачи исследования.** Поиск молекулярно-генетических вариантов, ассоциированных с вероятностью



сохранения ремиссии или рецидивирования у пациентов с ХМЛ после отмены ИТК, с помощью полноэкзомного секвенирования.

**Материалы и методы.** Полноэкзомное секвенирование проведено в образцах ДНК, выделенных из периферической крови 6 пациентов с ХМЛ, находящихся в глубокой ремиссии и включенных в исследование по отмене ИТК. Больные были разделены на 2 группы: с рецидивом (BCR/ABL > 0,1 % по международной шкале (international score, IS),  $n = 3$ ) и без рецидива (BCR/ABL ≤ 0,1 % по IS,  $n = 3$ ) через 25 мес после отмены ИТК.

**Результаты.** В 1-й группе в генах *CYP1B1*, *ALPK2* и *IRF1* были выявлены генетические варианты, потенциально влияющие на функции кодируемых ими белков. Во 2-й группе обнаружен также потенциально патогенный вариант в гене *PARP9*. Последующая проверка этих предикторов на небольшой группе пациентов с ХМЛ после отмены ИТК показала, что наличие генотипа Т/Т в гене *CYP1B1* (rs1800440), отсутствие делеции в гене *ALPK2* (rs67925233), генотип С/С в гене *IRF1* (rs839), а также наличие аллеля А в гене *PARP9* (rs34006803) обладают высокой чувствительностью (77 %), специфичностью (86 %), положительным (85 %) и отрицательным (79 %) предиктивными значениями.

**Выводы.** Таким образом, мы выявили генетические маркеры в генах *CYP1B1*, *ALPK2*, *IRF1* и *PARP9*, которые могут потенциально прогнозировать исход отмены терапии ИТК.

## Ингибирование сигнальных путей Wnt/ $\beta$ -катенин и AA/Sox-2 как основа антиканцерогенного действия кураксина CBL0137

Т.И. Фетисов<sup>1,2</sup>, Е.А. Лесовая<sup>1,3</sup>, В.В. Татарский<sup>1</sup>,  
А.В. Гудков<sup>4</sup>, К.В. Гурова<sup>4</sup>, М.Г. Якубовская<sup>1</sup>, О.А. Власова<sup>1</sup>,  
Г.А. Белицкий<sup>1</sup>, В.П. Максимова<sup>1</sup>, Ф.И. Турсунова<sup>1,2</sup>,  
К.И. Кирсанов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань;

<sup>4</sup>Институт онкологии им. Розвелла Парка, Баффало

**Введение.** Кураксины представляют собой низкомолекулярные карбазольные производные, способные одновременно активировать р53-зависимый апоптоз и ингибировать сигнальный путь NF- $\kappa$ B. Ранее мы провели исследование *in vivo* антиканцерогенных эффектов кураксинов — соединений, относящихся к классу узкобороздочных лигандов. Кураксин вводили мышам, ранее обработанным и необработанным 1,2-диметилгидразином (ДМГ). Впервые было показано снижение

частоты появления аденоматозных полипов и аденокарцином толстого кишечника у особей обоих полов. В основе инициации и промоции канцерогенеза у мышей при действии ДМГ лежит дерегуляция сигнального пути Wnt за счет индукции мутаций в гене белка  $\beta$ -катенина, активация хронического воспаления через сигнальный путь AA/Sox-2 и метилирование участков ДНК. Мы предположили, что антиканцерогенный эффект кураксинов на молекулярном уровне может быть связан не только с ингибированием провоспалительных каскадов, но и с его влиянием на сигнальный путь Wnt и процессы метилирования ДНК.

**Задачи исследования.** Исследование механизмов действия кураксина на культурах клеток аденокарциномы толстого кишечника человека.

**Материалы и методы.** В работе были использованы клеточные линии аденокарциномы толстого кишечника человека: НСТ-116, НТ-29, СаСо-2, Colo320, Sw480. Уровень экспрессии матричной РНК определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Экспрессию соответствующих белков изучали с помощью вестерн-блоттинга. В целях исследования эпигенетической активности была использована модельная система клеток человека (HeLa), несущих ретровирусный геном с интегрированным в него эпигенетически репрессированным флуоресцентным белком GFP.

**Результаты.** При обработке клеточных линий кураксином CBL0137 в концентрациях 0,25, 0,5 и 0,75 моль/мл мы продемонстрировали увеличение экспрессии онкосупрессоров DKK1, SFRP1, SFRP2, WIF-1, а также уменьшение экспрессии онкогенов *c-Myc*, *Surv*, *CCND1*, *Sox-2*. Размер и величина эффекта напрямую зависели от дозы препарата и времени инкубации. На модельной системе, представляющей собой популяцию клеток HeLa, несущую транскрипционно-молчащий ретровирусный вектор с репортерным геном зеленого флуоресцентного белка (GFP), было показано, что кураксин обладает эпигенетической активностью.

**Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о том, что кураксин CBL0137 является ингибитором сигнального пути Wnt, а также обладает свойствами эпигенетического реактиватора. Более того, способность CBL0137 ингибировать экспрессию Sox-2 позволяет рассматривать данную молекулу в качестве потенциального нестероидного противовоспалительного препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №15-04-09216А).

## Оценка эффективности предшественников этилового эфира N-нитрозосаркозина в качестве индукторов модельного рака пищевода у крыс

А.В. Шубин<sup>1</sup>, Е.А. Лесовая<sup>2</sup>, К.И. Кирсанов<sup>2</sup>, А.А. Комиссаров<sup>1</sup>,  
Л.С. Труханова<sup>2</sup>, Т.Г. Горькова<sup>2</sup>, Е.Е. Антошина<sup>2</sup>,  
М.Г. Якубовская<sup>2</sup>, Г.А. Белицкий<sup>2</sup>, И.В. Демидюк<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН», Москва;

<sup>2</sup>НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»  
Минздрава России, Москва

**Введение.** Рак пищевода (РП) занимает 6-е место среди онкологических заболеваний по числу летальных исходов и является 3-м по распространенности злокачественным новообразованием желудочно-кишечного тракта. Исследование молекулярных механизмов развития РП требует большого количества опухолевого материала, источником которого служат модели с использованием лабораторных животных. Для индукции плоскоклеточного РП наиболее часто применяют N-нитрозосоединения (НС), позволяющие, однако, получать в основном доброкачественные опухоли. Более перспективными могут быть предшественники НС, индуцирующие сравнимое количество папиллом и карцином. Несмотря на это, модели РП с применением предшественников НС не используются с конца 90-х годов прошлого века.

**Задачи исследования.** В данной работе была повторно рассмотрена возможность применения предшественников НС для изучения патогенеза плоскоклеточного РП.

**Материалы и методы.** Каждые 3 дня на протяжении 7 недель самцам крыс линии Wistar с помощью гаважирования вводили предшественники этилового эфира N-нитрозосаркозина: этиловый эфир саркозина (2 г/кг массы тела животного) и нитрит натрия (0,3 г/кг массы тела животного). Через 8, 12, 16, 20 и 24 нед после окончания введения индукторов животных умерщвляли, после чего проводили резекцию пищевода и его исследование на наличие патоморфологических изменений.

**Результаты.** В результате анализа были обнаружены папилломы (3,35 опухолей на животное) и высокодифференцированные плоскоклеточные карциномы с ороговением и без него (1,65 опухолей на животное), локализующиеся преимущественно в нижнем отделе пищевода. Отсутствие существенного увеличения числа опухолей со временем после окончания введения предшественников НС указывало на то, что формирование опухолей происходило, по-видимому, еще до первого вскрытия.

**Выводы.** Сравнение результатов эксперимента с данными по другим моделям показывает, что предшест-

венники НС наиболее эффективны как индукторы РП. Таким образом, исследованная модель может быть рекомендована для получения большего числа плоскоклеточных карцином пищевода у крыс.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-14-00526).*

## Роль опухолеассоциированной эозинофилии в патогенезе рака желудка

К.И. Янкович<sup>1,2</sup>, А.И. Дмитриева<sup>1,2</sup>, Ю.В. Колобовникова<sup>1</sup>,  
О.И. Уразова<sup>1</sup>, И.Л. Пурлик<sup>1,2</sup>, В.В. Новицкий<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск;

<sup>2</sup>ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер»,  
Томск

**Введение.** При злокачественных новообразованиях желудка в ткани опухоли часто обнаруживаются эозинофильные гранулоциты — опухолеассоциированная тканевая эозинофилия.

**Задачи исследования.** Оценка экспрессии рецепторов факторов ангиогенеза VEGFR и EGFR, а также мутантного белка p53 в опухолевой ткани у больных раком желудка с опухолеассоциированной эозинофилией.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 15 больных раком желудка, сопровождающимся тканевой эозинофилией (средний возраст  $66,8 \pm 2,3$  года) и 18 пациентов без эозинофилии (средний возраст  $63,2 \pm 3,5$  года). Все образцы тканей получены при биопсии или операционном вмешательстве до начала проведения специфической лучевой и цитостатической терапии. Эозинофильную инфильтрацию в строме опухолевого узла оценивали полуколичественным способом, присутствие 10 и более эозинофилов в поле зрения расценивали как тканевую эозинофилию. Исследование экспрессии VEGFR, EGFR и p53 в опухолевой ткани выполняли иммуногистохимическим методом. При оценке результатов учитывали процент положительно окрашенных опухолевых клеток в участках максимальной экспрессии маркера («горячих точках»).

**Результаты.** Высокий уровень экспрессии VEGFR регистрировался у 27 % больных раком желудка с эозинофилией и у 17 % пациентов без нее, при этом различия не достигали статистически значимого уровня. Высокая экспрессия EGFR была отмечена лишь в 33 % случаев рака желудка с тканевой эозинофилией, что оказалось достоверно ниже аналогичного показателя у пациентов без нее (72 %,  $p < 0,05$ ). Экспрессия мутантного белка p53 достоверно ( $p < 0,05$ ) различалась у больных раком желудка с эозинофильной инфильтрацией и без нее (в 20 и 61 % случаев соответственно).

**Выводы.** Гиперэкспрессия опухолевыми клетками EGFR и мутантного белка p53 — показателя зло-

качественности опухолевого процесса — ассоциируется с поздними стадиями болезни, метастазированием опухоли и плохим прогнозом заболевания. Выявленная нами достоверная ассоциация опухолеассоциированной тканевой эозинофилии с низкой экспрессией EGFR и p53 в опухолевой ткани при раке желудка позволяет предполагать скорее положительную роль эозино-

фильных гранулоцитов в механизмах канцерогенеза. Опухолеассоциированная тканевая эозинофилия может рассматриваться в качестве прогностического критерия течения болезни и прогрессии опухоли при раке желудка.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ (НШ-7906.2016.7).*

## Тезисы

### Оценка цитогенетического статуса пациентов со злокачественными новообразованиями различной локализации

М.М. Бяхова<sup>1,2</sup>, Л.П. Сычева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва;

<sup>2</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сытина» Минздрава России, Москва

**Задачи исследования.** Определение цитогенетического статуса в клетках слизистой оболочки ротовой полости у пациентов со злокачественными новообразованиями различной локализации.

**Материалы и методы.** Обследованы группы больных раком желудочно-кишечного тракта (РЖКТ) ( $n = 31$ ), раком молочной железы (РМЖ) ( $n = 20$ ) и раком легкого (РЛ) ( $n = 30$ ). Средний возраст пациентов составил 51,7 года. В группу контроля вошли 30 условно здоровых лиц (15 мужчин и 15 женщин), средний возраст 53,4 года. На момент обследования они не имели острой или хронической патологии. Цитогенетический статус обследуемых оценивали с помощью неинвазивного цитогенетического анализа буккального эпителия (учета частоты клеток с микроядрами и протрузиями).

**Результаты.** В буккальном эпителии больных РЖКТ выявлено статистически достоверное ( $p < 0,01$ ) увеличение частоты цитогенетических нарушений: доли клеток с микроядрами в 9 раз ( $5,5 \pm 0,63 \%$ ), протрузиями в 3,3 раза ( $2,5 \pm 0,54 \%$ ) по сравнению с группой контроля ( $0,6 \pm 0,18 \%$ ,  $0,75 \pm 0,3 \%$  соответственно). Также показано увеличение частоты цитогенетических нарушений при РМЖ: доля клеток с микроядрами была в 5,6 раза ( $3,33 \pm 0,84 \%$ ) выше по сравнению с группой контроля ( $0,6 \pm 0,18 \%$ ). В буккальных эпителиоцитах у пациентов с РЛ отмечается та же тенденция — увеличение частоты нарушений по отношению к здоровым лицам. Так, доля клеток с микроядрами у этих пациентов больше в 2,8 раза ( $1,7 \pm 2,5 \%$ ), доля клеток с протрузиями больше в 2 раза ( $1,5 \pm 2,0 \%$ ) по сравнению с этими же показателями в группе контроля ( $0,60 \pm 1,05 \%$ ,  $0,75 \pm 1,49 \%$  соответственно).

**Выводы.** Показано достоверное увеличение доли клеток с цитогенетическими нарушениями в буккальном эпителии у больных РЖКТ, РМЖ и РЛ по сравнению со здоровыми лицами. Следует подчеркнуть, что выявленные цитогенетические нарушения носили одинаковый характер как у мужчин, так и у женщин.

Полученные результаты свидетельствуют о системном характере изменений.

### Молекулярно-генетические механизмы возникновения онкопатологий

М.С. Гильдиева<sup>1</sup>, А.А. Абдувалиев<sup>2</sup>, М.С. Сайдалиева<sup>3</sup>, М.Б. Хидирова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Республиканский онкологический научный центр Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент;

<sup>2</sup>Ташкентская медицинская академия, Ташкент;

<sup>3</sup>Центр разработки программных продуктов и аппаратно-программных комплексов Ташкентского университета информационных технологий, Ташкент

**Введение.** Актуальной областью современных биологических и количественных исследований является изучение условий реализации молекулярно-генетических систем в ходе возникновения злокачественных новообразований. Как известно, на ранних этапах развития организм получает продукты материнской молекулярно-генетической системы. Хотя соответствующая система генов существует всегда в геноме вследствие ее функции, обеспечивающей автономное размножение клеток (в норме необходимой только для зародыша в раннем развитии), используются только их копии в виде информационных РНК, запасенных как информсомы. Запись и организация хранения генетической информации об автономном развитии происходит в ходе развития половых клеток (на этапе lampbrush) в специально организованных, исключительно особых условиях. Модельные исследования показали, что система генов рассматриваемых функций состоит из иницилирующих, структурных, организующих хранение и блокирующих групп генов. Однако следует допустить, что в некоторых исключительных условиях данная система генов может стать функционирующей.

**Задачи исследования.** В настоящее время известны несколько десятков белков-ферментов (онкобелков) и генов (онкогенов), принимающих участие в регуляции процессов в ходе неконтролируемого размножения клеток. Цель работы — создание программного продукта на основе моделирования регуляторики молекулярно-генетических систем для выявления возможных путей диагностики, профилактики и лечения раковых заболеваний.

**Материалы и методы.** Количественное исследование регуляторики молекулярно-генетических систем осуществляли на основе метода математического мо-



делирования регуляторных механизмов живых систем и уравнений регуляторики клеточных сообществ многоклеточных организмов с использованием понятия функциональной единицы клеточных сообществ.

**Результаты.** Наши исследования показывают возможность на основе моделирования регуляторики молекулярно-генетических систем выявлять возможные пути диагностики (на базе анализа закономерностей синтеза продуктов иницирующих систем генов), профилактики и лечения (на базе изучения закономерностей функционирования генов, блокирующих активность системы генов автономного развития) раковых заболеваний.

**Выводы.** Результаты количественного анализа разработанных уравнений показывают возможность существования хаотичного поведения (возникновение различных видов хромосомных aberrаций), эффекта срыва решений к тривиальному аттрактору – эффекта «черной дыры» (метастаза).

## Иммуногенетический и молекулярно-генетический анализ генотипов и фенотипов больных ретинобластомой детей

З.С. Исламов<sup>1</sup>, М.С. Гильдиева<sup>1</sup>, А.А. Абдувалиев<sup>2</sup>,  
Р.Х. Усманов<sup>1</sup>, Б.Ю. Юсупов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент;

<sup>2</sup>Ташкентская медицинская академия, Ташкент

**Задачи исследования.** Усовершенствование патогенетически ориентированных методов диагностики, лечения и реабилитации больных ретинобластомой (РБ) на основании изучения молекулярно-генетических и иммуногенетических параметров органа зрения.

**Результаты.** По данным иммуногистохимического анализа опухолевых клеток РБ у 76 % больных была выявлена положительная реакция на наличие мутантного гена *p53* (*mtp53*). Ядерный белок гена *p53* является одним из регуляторов клеточного цикла, а мутантная форма приводит к выключению апоптоза. У 44 % больных РБ обнаружена положительная экспрессия гена *Bcl2*, который ингибирует апоптоз, положительная реакция на экспрессию Ki-67 была выявлена в 92 % опухолевых образцов. Все больные РБ с данным фенотипом опухолевых клеток имели высокий уровень хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови.

Был проведен анализ на наличие ассоциаций выбранных полиморфизмов гена *RB1* с РБ. Полимеразные цепные реакции с праймерами по экзонам 20, 22 и 25 были поставлены на 50 образцах крови из группы больных и на 30 образцах из группы здоровых испытуемых. Проведенный молекулярно-генетический анализ свидетельствует о том, что эти аллельные вариан-

ты гена *RB1* не имеют достоверного сцепления с РБ, так как при оценке не было выявлено достоверной разницы в частоте встречаемости данных полиморфизмов в группе детей, больных РБ, и в контрольной группе. Продукты полимеразной цепной реакции с праймерами по экзону 13 и промотору гена *RB1* не были детектированы в ходе неоднократных реакций. Возможно, отсутствие аллелей по экзону 13 и промоторного гена *RB1* детерминируют инактивацию гена *RB1* в условиях нашего этноса.

Иммуногенетические исследования HLA-фенотипов позволили установить 11 фенотипов, наиболее часто встречающихся и характерных для больных РБ в узбекском этносе, а также 17 гаплотипов, которые обладают более индивидуальной характеристикой предрасположенности пациентов к РБ. Самые высокие показатели относительного риска ассоциированы с антигенами A25 (риск развития РБ (RR) = 23,1), A28 (RR = 6,9), Bw (RR = 8,1), A10 (RR = 2,2). Сочетание этих антигенов повышает риск возникновения РБ у лиц с данным HLA-фенотипом более чем в 20 раз.

Следовательно, механизм наследования РБ и предрасположенность к ней соответствуют модели полигенного наследования с присутствием главных и аддитивных HLA-генов.

**Выводы.** Использование выявленных нами иммуногенетических и цитогенетических маркеров предрасположенности к РБ позволяет определить риск развития этого заболевания еще в доклинический период.

## Инфекционная составляющая канцерогенеза при раке желудка

О.И. Кит, Т.А. Зыкова, Ю.А. Геворкян,  
В.М. Легостаев, О.А. Богомолова

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

**Введение.** Одним из важнейших факторов риска канцерогенеза при раке желудка считается хроническое носительство *Helicobacter pylori*. В то же время роль вирусного инфицирования и изменений микробиоценоза слизистой оболочки желудка (СОЖ) в опухолевой трансформации до конца не изучена.

**Задачи исследования.** Провести сравнительное изучение состава вирусной и бактериальной микрофлоры при раке желудка и гастритах.

**Материалы и методы.** Были исследованы образцы опухолевой и здоровой ткани желудка, биоптаты СОЖ при гастритах. Методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени определяли ДНК цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), вируса герпеса человека (ВГЧ) 6-го типа, семейства энтеробактерий, стафилококков, стрептококков, бактероидов. Обследованы 30 больных раком желудка и 49 пациентов с гастритом.

**Результаты.** ДНК ЦМВ была обнаружена в 43,3 % образцов опухолевой и в 24,1 % здоровой ткани. Вирусная нагрузка составила 296 копий ДНК из 105 клеток в опухолевой и 14 копий ДНК из 105 клеток в здоровой ткани. Для ВЭБ частота выявления ДНК составила 86,7 % в опухолевой и здоровой ткани, вирусная нагрузка — 724 472 и 41 083 копий ДНК из 105 клеток соответственно. ДНК ВГЧ 6-го типа была обнаружена в 63,3 % образцов опухолевой и 82,8 % здоровой ткани, вирусная нагрузка составила 199 и 109 копий ДНК из 105 клеток соответственно. При гастритах частота выявления ДНК ЦМВ составила 2,0 %, ВЭБ — 55,0 %, ВГЧ 6-го типа — 10,2 %. Во всех случаях были обнаружены единичные копии ДНК вируса.

В опухолевой и здоровой тканях ДНК бактероидов была выявлена у 80,0 % больных, при гастритах — ни у одного. Во всех образцах ткани опухоли была обнаружена ДНК *Bacteroides fragilis*, в том числе в 8,3 % *B. fragilis* toxin (BFT). Среднее количество энтеробактерий в опухолевой ткани составило  $6,7 \times 105,0$  ГЭ/мл, в здоровой —  $7,0 \times 105,0$  ГЭ/мл, при гастритах —  $4,0 \times 102,0$  ГЭ/мл; стафилококков —  $3,4 \times 102,0$  ГЭ/мл,  $2,6 \times 102,0$  ГЭ/мл и  $8,7 \times 101,0$  ГЭ/мл; стрептококков —  $9,1 \times 105,0$  ГЭ/мл,  $1,3 \times 105,0$  ГЭ/мл и  $5,1 \times 103,0$  ГЭ/мл соответственно. Таким образом, количество энтеробактерий в ткани опухоли при раке желудка превышало тот же показатель при гастритах в 1675 раз, стафилококков — в 3,9 раза, энтерококков — в 178 раз.

**Выводы.** Частота инфицирования СОЖ вирусами группы герпеса, в особенности ВЭБ, а также уровень вирусной нагрузки при раке желудка превышает эти показатели при гастритах. Среди микрофлоры, колонизирующей СОЖ при раке желудка, наибольший удельный вес принадлежит энтеробактериям, стрептококкам и бактероидам, в большинстве случаев находящимся в ассоциации. Установленные различия микробиоценоза СОЖ при раке желудка по сравнению с гастритами свидетельствуют о возможном участии вирусной и бактериальной микрофлоры в процессах опухолевой трансформации.

## Изменение копийности генетических локусов – потенциальный маркер аденокарциномы легкого

Д.С. Кутилин, Я.С. Енин, Д.И. Водолажский

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

**Введение.** Ежегодно в мире регистрируют более 1,5 млн летальных исходов вследствие заболевания раком легкого, что делает эту патологию наиболее распространенной причиной смерти. В настоящее время проблема ранней диагностики рака легкого остается нерешенной, а изученные на сегодняшний день молекулярные маркеры не показывают достоверной спе-

цифичности. Исследование копийности генов может расширить представление о молекулярных механизмах, лежащих в основе малигнизации тканей легкого, и обеспечить данными, необходимыми для формирования панели новых высокоспецифичных онкомаркеров.

**Задачи исследования.** Изучение относительной копийности генетических локусов, ответственных за регуляцию апоптоза (*BAX*, *BCL2*, *C-FLAR*, *P53*, *MDM2*, *BFAR*), пролиферацию (*SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *PIK3* и *MKI67*), окислительное фосфорилирование (*HV2*) и ответ на гипоксию (*HIF1A1*) в опухолевых и нормальных клетках ткани легкого.

**Материалы и методы.** Клиническим материалом для исследования послужили срезы тканей из FFPE-блоков 30 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом рака легкого (аденокарциномой). Срезы фиксировали на предметных стеклах, депарафинизировали и окрашивали гематоксилин-эозином. Из окрашенных препаратов с помощью лазерной микродиссекции (PALM MicroBeam, Carl Zeiss, Германия) выделяли опухолевые и нормальные клетки, из которых фенол-хлороформным методом проводили экстракцию ДНК. Определение относительной копийности 13 генетических локусов (референсный ген *GAPDH*) проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США). Статистический анализ выполняли с использованием критерия Манна–Уитни и коэффициента корреляции Спирмена ( $r$ ).

**Результаты.** Обнаружено снижение копийности гена *BAX* на 18 % ( $p < 0,05$ ) и увеличение копийности генов *HIF1A1* и *MDM2* на 31 ( $p < 0,05$ ) и 189 % ( $p < 0,05$ ) соответственно в клетках аденокарциномы относительно нормальных клеток легкого. В опухолевых клетках ткани легкого выявлено снижение соотношения копийности генов *p53/MDM2* в 3 раза ( $r = 0,784$ ) по сравнению с нормальными клетками ( $r = 0,847$ ) при неизменной положительной корреляции. Соотношение копийности генов *BAX/BCL2* в опухолевых и нормальных клетках практически не отличалось, но в опухолевой ткани изменялась корреляция этих генов (потеря положительной корреляции  $r = -0,162$  против  $r = 0,798$  в норме).

**Выводы.** Изменение копийности генов *BAX*, *MDM2* и *HIF1A1*, соотношения копийности *p53/MDM2* и корреляции *BAX/BCL2* имеют высокий потенциал в качестве молекулярных маркеров для прогнозирования течения и развития рака легкого.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-34-00267\_мол\_а).

## Особенности протеомного паттерна в тканях больных колоректальным раком

Д.С. Кутилин<sup>1</sup>, О.И. Кит<sup>1</sup>, Д.И. Водолажский<sup>1</sup>, Л.В. Харин<sup>1</sup>,  
М.А. Кожушко<sup>1</sup>, П.В. Золотухин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт биологии ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», Ростов-на-Дону

**Введение.** Колоректальный рак относится к наиболее распространенным типам неоплазий в развитых странах. За последние 20 лет, по данным мировой статистики, число летальных случаев от этой патологии в год увеличилось на 31 %, что позволяет ей занимать 2-е место по показателю смертности среди всех онкологических заболеваний. Несмотря на обширные исследования по патогенезу колоректального рака на молекулярно-биологическом уровне, сведений об эффективных белковых биомаркерах малигнизации при данной нозологии представлено немного.

**Задачи исследования.** Проведение скринингового протеомного исследования для поиска новых информативных биомаркеров, которые затем могут быть эффективно использованы в рутинных гистохимических исследованиях.

**Материалы и методы.** Для исследования использовали опухолевые и условно здоровые (контроль) ткани 20 пациентов Юга России с гистологически подтвержденным диагнозом аденокарциномы толстой кишки. Экстракцию белков, маркировку и гибридизацию на слайде проводили с применением набора Panorama Antibody Microarray – Cell Signaling Kit (Sigma, США) в соответствии с инструкцией производителя. Слайды сканировали на сканере для микрочипов GenePix 4100A (Molecular Devices, США). Биоинформационный анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения для анализа изображений GenePixTM Pro 6.0. Нормализацию данных проводили 2 методами: сменой красителя и по референсным белкам.

**Результаты.** В смешанной выборке, состоящей из пациентов разного возраста и пола, обнаружено достоверное увеличение экспрессии 4 белков: NGFR p75 (Nerve Growth Factor Receptor), Phospho-Ta, FAK (Focal Adhesion Kinase) и PKC  $\gamma$ . У 10 пациентов выборки, представленной женщинами в возрасте 43–81 год, обнаружено увеличение экспрессии только Phospho-Ta и PKC  $\gamma$ . У 10 пациентов-мужчин в возрасте 50–76 лет наблюдалось достоверное увеличение экспрессии 5 белков: с-Мус, NGFR p75, FAK, PKC  $\beta$ , Phospho-Pyk2. У пациентов обоих полов после 60 лет отмечено достоверное увеличение экспрессии белков с-Мус, Cytokeratin per 4, Glutamate receptor NMDAR 2a, NGFR p75, PKC  $\gamma$  и Phospho-Pyk2.

**Выводы.** В рамках данного исследования определена эффективная панель протеомных биомаркеров для диагностики колоректального рака, установлены возрастные и половые различия в изменении экспрессии белков у пациентов с этой патологией.

## Различия в экспрессии белка микротрубочек TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной ткани легкого

И.А. Мамичев, Т.А. Богуш, А.Н. Гришанина,  
Б.Е. Полоцкий, М.М. Давыдов

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

**Введение.** Бета 3 тубулин (TUBB3) — изоформа белка микротрубочек бета-тубулина. Экспрессия TUBB3 в норме тканеспецифична для нейронов и клеток Сертоли, но не для эпителиальных тканей. В то же время TUBB3 часто экспрессируется в клетках эпителиальных опухолей различной локализации, в том числе немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ).

**Задачи исследования.** Мы предположили, что у больных НМРЛ вследствие инфильтрирующего роста опухоли или наличия множественных фокусов трансформированных клеток за пределами первичного опухолевого узла может существовать популяция клеток, экспрессирующих TUBB3. Была поставлена задача охарактеризовать группу пациентов по экспрессии TUBB3 как в опухоли, так и в морфологически нормальной ткани легкого.

**Материалы и методы.** Для каждого больного исследовали 2 хирургических биопсийных образца: опухоль и морфологически нормальную ткань. Суммарно было проанализировано 90 образцов тканей 45 пациентов с НМРЛ. Образцы переводили в одноклеточную суспензию, инкубировали с первичными (ab7751) антителами в течение ночи и затем 1,5 ч с вторичными (ab98729) антителами, конъюгированными с флуорохромом DyLight650. Анализ флуоресценции проводили методом проточной цитофлуориметрии. Количественную обработку данных выполняли с помощью программы FlowJo. Уровень экспрессии TUBB3 вычисляли как количество специфически окрашенных клеток в опытном образце относительно контрольного образца.

**Результаты.** Показано, что у всех исследованных больных экспрессия TUBB3 в ткани НМРЛ выше, чем в окружающей морфологически нормальной ткани легкого. Экспрессия TUBB3, превышающая пороговый уровень, выявлена в 87 % опухолей (среднее значение  $34,2 \pm 12,3$  %). В морфологически нормальной окружающей ткани легкого экспрессия TUBB3 обнаружена только в 60 % опухолей при меньшем среднем значении показателя ( $24,9 \pm 6,1$  % против  $34,2 \pm 12,3$  %).

**Выводы.** Впервые выявлена экспрессия TUBB3 в морфологически нормальной ткани легкого, окружающей первичный опухолевый очаг. Этот факт может служить обоснованием радикализма хирургических вмешательств по поводу НМРЛ даже на начальных стадиях заболевания и считаться доводом в пользу проведения адъювантной терапии.

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

## Экспрессия HIF-1 $\alpha$ - и AhR-зависимых генов в первичной культуре глиобластомы человека под действием хлорида кобальта и бензо(а)пирена

М.Л. Перепечеева, Е.В. Воронцова, С.М. Пятов,  
А.Ю. Гришанова

ФГБНУ «НИИ молекулярной биологии и биофизики»,  
Новосибирск

**Введение.** В механизмах развития злокачественных новообразований существенную роль играет гипоксия, которая, с одной стороны, может стимулировать апоптоз клеток опухоли, с другой — определяет многие аспекты ее развития, способствуя прогрессии опухоли. Центральную роль в механизме развития гипоксии играет индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор HIF-1 $\alpha$  и регулируемые им сигнальные пути, опосредующие ангиогенез, метаболизм глюкозы, клеточную пролиферацию. HIF-1 $\alpha$  в ядре образует комплекс с белком ARNT, ядерным переносчиком арил-гидрокарбонового рецептора (AhR), который может конкурировать за ARNT с HIF-1 $\alpha$ . В свою очередь, AhR известен как активатор цитохромов P450 1 (CYP1) и участник молекулярных каскадов, которые приводят к торможению пролиферации, дифференцировки и апоптоза.

**Задачи исследования.** Целью работы стало исследование в первичной культуре глиобластомы человека HIF-1 $\alpha$ - и AhR-зависимых сигнальных путей для выявления молекулярных основ развития глиобластомы.

**Материалы и методы.** Работа проведена с использованием кобальтовой модели гипоксии. При концентрации 200 мкМ хлорида кобальта в культуральной среде наблюдалось повышение уровня матричной РНК (мРНК) HIF-1 $\alpha$  и активируемых им фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) и транспортера глюкозы 1-го типа (glucose transporter 1, GLUT1). Клетки обрабатывали хлоридом кобальта, либо 1 и 2 мкМ бензо(а)пиреном (лигандом AhR и активатором CYP1), либо хлоридом кобальта в сочетании с бензо(а)пиреном. Уровень мРНК генов *HIF-1 $\alpha$* , *AhR*, *ARNT*, гена-мишени AhR (*CYP1B1*) и генов-мишеней

HIF-1 $\alpha$  (*VEGF-A* и *GLUT1*) оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

**Результаты.** Бензо(а)пирен (2 мкМ) уменьшил до контрольного уровня вызванное гипоксией повышение уровня мРНК GLUT1 и VEGF (HIF-1 $\alpha$  на уровне тенденции). При этом хлорид кобальта (миметик гипоксии) отменил неблагоприятный эффект 1 и 2 мкМ бензо(а)пирена в виде повышения уровня мРНК AhR и CYP1B1, который метаболизирует бензо(а)пирен до токсичных продуктов.

**Выводы.** Таким образом, активация сигнального пути AhR бензо(а)пиреном снижает активацию сигнального пути HIF-1 $\alpha$ , а неблагоприятные побочные эффекты активации сигнального пути AhR нивелируются вызывающим гипоксию хлоридом кобальта.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-04-00754).*

## Экспрессия MMP-9 в плоскоклеточном раке гортани

С.В. Петров

ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет», Казань

**Введение.** Матриксные металлопротеиназы (ММП) играют важную роль в прогрессии злокачественных новообразований, участвуя в разрушении экстрацеллюлярного матрикса, ангиогенезе опухоли, взаимодействуют с факторами роста и молекулами межклеточного взаимодействия.

**Задачи исследования.** Цель нашей работы — исследовать экспрессию MMP-9 (одного из представителя семейства ММП) в плоскоклеточном раке гортани и изучить ее связь с некоторыми клинико-морфологическими показателями и прогнозом заболевания.

**Материалы и методы.** Были использованы парафиновые блоки архивного материала, полученного от 186 больных за период с 2000 по 2008 г., с дальнейшим изготовлением 8 ТМА-мультиблоков (технология tissue microarray) и оцифровкой микропрепаратов на сканере Mirax MIDI (Carl Zeiss, Германия). Для иммуногистохимического исследования использовали анти-тело против MMP-9 (92 кДа Collagenase IV, разведение 1:35, LabVision Corp.). Для визуализации применяли систему детекции UltraVision с DAB Plus хромогеном (LabVision Corp., США).

**Результаты.** Распределение по клиническим стадиям следующее: I стадия — 8 случаев, II — 43, III — 84 и IV — 51. Со степенью дифференцировки G<sub>1</sub> было 59 больных, G<sub>2</sub>—50, G<sub>3</sub>—77. Метастазы в регионарные лимфатические узлы отмечены в 40 (21,5 %) случаях. В исследуемой группе 5-летняя выживаемость составила 46,2 % (86 случаев), а рецидивы обнаружены в 8,6 % (16 случаев). Цитоплазматическая экспрессия исследуемого маркера выявлена в 35,0 % (65 случаев).



В низкодифференцированных опухолях ( $G_3$ ) наблюдается достоверное снижение экспрессии исследуемого маркера по сравнению с высокодифференцированными ( $G_1$ ) ( $p < 0,001$ ). Мы обнаружили, что в группе больных с метастазами, рецидивами, IV клинической стадией и T4-стадией экспрессия ММР-9 была ниже, но без статистических различий ( $p > 0,05$ ). Мы не выявили связи между 5-летней выживаемостью, локализацией опухоли в гортани, возрастом больных и экспрессией изучаемого маркера.

**Выводы.** Таким образом, при прогрессировании плоскоклеточного рака гортани наблюдается снижение уровня экспрессии ММР-9.

## Лечение остеосаркомы и роль молекулярно-генетических маркеров апоптоза и пролиферации

Д.Ш. Полатова<sup>1</sup>, М.С. Гильдиева<sup>1</sup>, А.А. Абдувалиев<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент;

<sup>2</sup>Ташкентская медицинская академия, Ташкент

**Введение.** Выявление биологических характеристик первичных сарком костей и основных факторов прогноза при планировании и проведении терапии рассматривается в качестве важного потенциала повышения эффективности комбинированного лечения.

**Задачи исследования.** Изучение изменения молекулярно-биологических и генетических маркеров, характеризующих механизм опухолевой прогрессии при остеосаркоме, а также их роль в лечении этой патологии.

**Результаты.** Мы провели сравнительную оценку эффективности лечения пациентов в зависимости от вида терапии и фенотипа опухолевых клеток. В 1-й группе ( $n = 131$ ) пациентов, получивших системную химиотерапию, полный эффект наблюдался у 13 % больных. С отрицательной и слабopоложительной иммуногистохимическими реакциями на мутантные гены *p53* и *Ki-67* среди них были 70,6 % пациентов, а с умеренной и высокой экспрессией *Bcl2* — 80 %. Частичный эффект от лечения имели больные с фенотипом опухолевых клеток, имеющих отрицательную или слабopоложительную иммуногистохимические реакции на мутантный ген *p53* (58,5 % больных), слабopоложительную экспрессию *Ki-67* (70,6 % больных), высокую экспрессию *Bcl2* (46,4 % больных). У 37,4 % пациентов из этой группы эффект терапии был отрицательным, среди них большинство имели опухолевые клетки с высокой экспрессией мутантных генов *p53* и *Ki-67*, отсутствие экспрессии *Bcl2*.

Во 2-й группе (ДВАРХ-53) полный и частичный эффекты от проведенной терапии были отмечены у 73,6 % больных, среди них у 66,7 % пациентов опухолевые клетки были *mtp53*-отрицательными, со средней и низкой экспрессией гена *Ki-67* и с умеренной и высокой реакцией на *Bcl2*. У 35,8 % больных после

проведения данной терапии эффект был отрицательным, среди них у 73,7 % фенотип опухолевых клеток имел комбинацию, состоящую из клеток с высокой экспрессией мутантных генов *p53* и *Ki-67*, а также низкую экспрессию гена *Bcl2*.

В 3-й группе ( $n = 42$ ) пациентов, которым проведена лучевая терапия, положительный эффект отмечен у 56,0 % больных, среди них со слабой экспрессией и ее отсутствием мутантного гена *p53* было 75,0 % и только у 12,5 % была выявлена умеренная экспрессия этого белка. Экспрессия гена *Ki-67* также была слабой или отсутствовала у большинства (88,8 %) пациентов, а экспрессия *Bcl2* у больных с положительным эффектом от лечения в этой группе была высокой и умеренной.

**Выводы.** Установлено, что критериями неблагоприятного прогноза остеосаркомы являются характеристика лечебного патоморфоза (выявление I–II степени), экспрессия мутантного гена *p53*, отсутствие экспрессии *Bcl2*, экспрессия *Ki-67* и низкая дифференцировка опухолевых клеток.

## Полиморфизм вариантов онкогена *LMP1* вируса Эпштейна–Барр у жителей Дальнего Востока России

К.В. Смирнова, С.В. Дидук, В.Э. Гурцевич

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

**Введение.** Расшифровка молекулярных механизмов опухолевой трансформации клетки, вызываемой онкогенными вирусами человека, — актуальная проблема современных исследований. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) в этом плане представляет особый интерес, поскольку, являясь убиквитарным герпес-вирусом человека, он ассоциирован с широким спектром доброкачественных и злокачественных новообразований лимфоидного и эпителиального происхождения. В патогенезе ВЭБ-ассоциированных патологий важную роль играет вирусный онкоген *LMP1*.

**Задачи исследования.** С учетом отсутствия данных о штаммах ВЭБ, персистирующих среди населения Дальневосточного региона России, целью данной работы стало изучение изолятов ВЭБ и образцов онкогена *LMP1* среди коренного населения (нанайцев) и переселенцев Хабаровского края, предствителей славянских народов.

**Результаты.** Транслированные аминокислотные последовательности образцов *LMP1*, амплифицированные и секвенированные из ДНК обследуемых лиц, были повернуты филогенетическому анализу. При этом не выявлено доминирования определенного варианта *LMP1*, все изученные образцы были равномерно распределены между известными низко- и высокодигергентными вариантами *LMP1*: B95-8/A, Med+, Med–, China1 и NC. Кроме этого, также не обнаружена вы-

сокотуморогенная Сао-подобная делеция 30 пар нуклеотидов. В то же время все исследованные образцы *LMP1* содержали в своей последовательности аминокислотную замену в 366-м (S366T) положении, характерную для его высокотуморогенных вариантов. В ряде образцов *LMP1* из обеих анализируемых групп удалось выявить дополнительные Сао-специфические мутации, например, замену глутамин на аргинин в 334-й (Q334R) позиции. Вместо типичной для Сао-варианта *LMP1* ВЭБ замены в 328-м положении глутаминовой кислоты на аланин (E328A) в изученных нами образцах *LMP1* мы обнаружили модифицированную замену в том же положении глутаминовой кислоты на глутамин (E328Q).

**Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о персистенции на территории Дальнего Востока специфических штаммов ВЭБ с последовательностями онкогена *LMP1*, отличающими его от образцов на территории Центральной Европейской части России и ближайшего эндемичного региона Юго-Восточной Азии. Выявленные отдельные мутации, характерные для высокотуморогенных вариантов *LMP1*, при воздействии дополнительных факторов окружающей среды могут, вероятно, явиться важным фактором, стимулирующим ВЭБ-ассоциированный канцерогенез.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научно-исследовательских проектов (гранты № 14-04-01810\_а, 15-34-70031\_мол\_а\_мос).*

## Повышенный уровень рецепторов ErbB2/HER-2 в опухолевых клетках желудка связан с септиновой структурой клеток

Ш.У. Турдикулова<sup>1</sup>, О.Н. Вагина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Центр высоких технологий Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент;

<sup>2</sup>Калифорнийский Университет Лос-Анджелеса, Лос-Анджелес

**Введение.** Ген *HER-2*, известный также как *ErbB-2* или *HER-2/neu*, кодирует трансмембранный гликопротеин *HER-2*, который является представителем семейства рецепторов эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR). Все представители (*HER-1*, *HER-2*, *HER-3*, *HER-4*) семейства EGFR играют важную роль в нормальном развитии и дифференцировке клеток. Стимуляция этого рецептора приводит к запуску транскрипционных механизмов, что ускоряет пролиферацию и рост клеток. У человека рецептор *HER-2* выявляется в нормальных тканях, однако его гиперэкспрессия характерна только для опухолевых клеток. Гиперэкспрессия *HER-2* обнаруживается в 25–30 % случаев рака желудка, причем в 90–95 % случаев гиперэкспрессия *HER-2* является прямым

результатом амплификации гена *c-HER-2*. В доклинических и клинических исследованиях показано, что амплификация и/или гиперэкспрессия *HER-2* имеет ключевое значение в онкотрансформации и туморогенезе рака желудка и рака молочной железы. Механизм удержания белка *ErbB-2* на плазматической мембране раковых клеток остается неизвестным, и несомненно изучение факторов стабилизации белка *ErbB-2* на плазматической мембране имеет важное клиническое значение.

**Задачи исследования.** Изучение механизма удержания рецептора *ErbB-2* (*HER-2*) на клеточной мембране, роли септинов и их ингибирования в стабилизации *ErbB-2*-рецептора на плазматической мембране раковых клеток, а также влияния септин-2-ингибитора форхлорфенурина и si-RNA-нокдауна на уровень *ErbB-2* в *HER-2*-положительных раковых клетках

**Результаты.** Изучено взаимодействие септинов с *ErbB-2*-рецептором на плазматической мембране и выявлено, что оно является важным механизмом для поддержания высокого уровня этого онкогена в *HER-2*-положительных раковых клетках. В раковых клетках желудка наблюдалась высокая экспрессия септинов и *ErbB-2*-рецептора. Иммунопреципитация с последующей масс-спектрометрией идентифицировали *ErbB-2* в качестве септинсвязанного белка. si-РНК-нокдаун гена *септин 2* и обработка клеток веществом форхлорфенурон, ингибитором септиновой олигомеризации, уменьшали количество белка *ErbB-2* как на плазматической мембране, так и в целом в клетках, в то время как уровень другого плазматического рецептора из того же семейства EGFR не изменялся ни в том, ни в другом случае, что подтверждало специфичность данного процесса.

Ингибиторы септиновой организации, такие как FCF, могут рассматриваться в качестве таргетных препаратов против *HER-2*-положительных вариантов опухолей. Разработанная нами методика может быть эффективно использована для поиска и тестирования препаратов таргетного действия.

## Отличия внутриклеточной локализации p53 дикого типа и мутантного p53 R175H в клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231 после теплового шока

М.А. Шкляева, А.В. Петухов, Н.А. Барлев, А.А. Дакс  
ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

**Введение.** Важнейший онкосупрессор p53 дикого типа (p53wt) активируется в ответ на разные формы стресса, включая тепловой шок. Мутации в ДНК-связывающем домене белка (в частности R175H) превра-

щают его в онкоген. Функция p53, как онкосупрессора, регулируется за счет ядерного экспорта и импорта белка. В норме p53wt присутствует в малых количествах в ядре. После стрессового воздействия часть p53wt экспортируется из ядра в цитоплазму на протеасомную деградацию. Однако мутантные формы p53 в опухолях стабильны и ведут к хеморезистентности. Так, p53 R175H после экспорта в цитоплазму не деградирует, а стабилизируется за счет образования многокомпонентных агрегатов. Управление деградацией мутантных форм p53 с помощью малых молекул является одним из перспективных направлений таргетной противораковой терапии.

**Задачи исследования.** Мы исследовали динамику внутриклеточной локализации p53 R175H и p53wt в разных временных точках после теплового шока.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на линии MDA-MB-231, трансдуцированной лентивирусными векторами, экспрессирующими p53mut и p53wt, сшитыми с зеленым флуоресцентным белком. Тепловой шок проводили при 42 °C в течение 45 мин.

Детектировали сигнал методом флуоресцентной микроскопии.

**Результаты.** Мы показали, что локализация p53wt отличается от локализации p53 R175H. При фиксации сразу после обработки тепловым шоком p53wt локализуется в ядре. При этом p53 R175H сразу после теплового шока наблюдается в цитоплазме. При фиксации клеток через 4 ч p53wt обнаруживается и в ядре, и в цитоплазме, а p53 R175H — преимущественно в ядре. Ранее описанные агрегаты p53 R175H мы не выявили.

**Выводы.** Таким образом, мы впервые показали, что поведение p53 R175H в ответ на тепловой шок противоположно p53wt. Ранний выход p53 R175H из ядра может объясняться его взаимодействием с убиквитинлигазой Mdm2, в отличие от p53wt, который связан с ДНК. Импорт мутантного белка в ядро через 4 ч может быть опосредован Hsp70, который селективно взаимодействует с p53mut, но не с p53wt. Для выяснения механизмов необходимы дальнейшие исследования.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 14-50-00068).*