

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА»
МИНЗДРАВА РОССИИ

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



МАТЕРИАЛЫ

*II Всероссийской конференции
по молекулярной онкологии*

6–8 декабря 2016 г., Москва

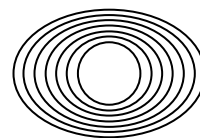
ТОМ 3 № 4
2016



С 2014 г. журнал «Успехи молекулярной онкологии» включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор.
С 2015 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «РОНЦ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА» МИНЗДРАВА РОССИИ

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Российский онкологический
научный центр им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Зборовская Ирина Борисовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Якубовская Марианна Геннадиевна, д.м.н., заведующая отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Гудкова Маргарита Владимировна, к.б.н., ученый секретарь НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

4 ^{ТОМ 3}
'16

Учредители:

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»,
Минздрава России;
ООО «ИД «АБВ-пресс»

Адрес редакции:

115478, Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Статьи направлять по адресу:
adv.mol.onc@ronc.ru

Выпускающий редактор **Н.В. Жукова**
Корректор **В.А. Наумкина, В.Е. Ефремова**
Дизайн **Е.В. Степанова**
Верстка **О.В. Гончарук**
Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Руководитель проекта
Р.А. Кузнецов, +7 (499) 929-96-19,
kuznetsov@abvpress.ru

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору

в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(ПИ № ФС77-57560 от 08.04.2014 г.)

При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Успехи молекулярной
онкологии» обязательна.
Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.
В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)

Успехи молекулярной онкологии.
2016. Том 3. № 4. 1–138

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2016

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 93562
Отпечатано в типографии

ООО «Медиакопир»
Тираж 1000 экз.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Белицкий Геннадий Альтерович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории методов скрининга канцерогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Берштейн Лев Михайлович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории онкоэндокринологии ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Боженко Владимир Константинович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии отдела патоморфологии и лабораторной диагностики ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России, заслуженный врач РФ (Москва, Россия)

Глушанкова Наталья Александровна, д.б.н., заведующая лабораторией механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Гуревич Владимир Эдуардович, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Имянитов Евгений Наумович, д.м.н., профессор, руководитель отдела опухолевого роста ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Казанский Дмитрий Борисович, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Карпунин Александр Васильевич, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (Москва, Россия)

Кжышковска Юлия Георгиевна, д.б.н., профессор, руководитель отдела врожденного иммунитета и толерантности Института трансфузионной медицины и иммунологии медицинского факультета Мангейм университета Гейдельберга (Гейдельберг, Германия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующая отделением научного планирования и подготовки кадров ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лазаревич Наталья Леонидовна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией механизмов прогрессии эпителиальных опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лихтенштейн Анатолий Владимирович, д.б.н., заведующий лабораторией биохимии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Мазуренко Наталья Николаевна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией онкогеномики НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Миркин Сергей Моисеевич, именной профессор биологии Университета Тафтса (Медфорд, Орегон, США)

Сергеева Наталья Сергеевна, д.б.н., профессор, руководитель отделения прогноза Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена Минздрава России — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр», заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., заместитель начальника Управления по взаимодействию с РАН, ответственный секретарь Научно-координационного совета Федерального агентства научных организаций России (Москва, Россия)

Тюляндин Сергей Алексеевич, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, заместитель директора по научной работе НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Чевкина Елена Максимовна, д.б.н., заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Чердынцева Надежда Викторовна, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии ФГБНУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии» (Томск, Россия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Васильев Юрий Маркович, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, вице-президент Общества клеточной биологии РАН (Москва, Россия)

Гудков Андрей Владимирович, д.б.н., профессор, старший вице-президент по фундаментальной науке и заведующий отделом биологии клеточного стресса Института онкологии им. Розвелла Парка (Баффало, Нью-Йорк, США)

Давыдов Михаил Иванович, д.м.н., профессор, академик РАН, член президиума РАН, директор ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, главный онколог Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Заридзе Давид Георгиевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

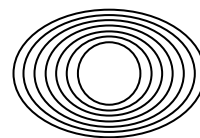
Копнин Борис Павлович, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Since 2014, the journal "Advances in Molecular Oncology" was included in the Research Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor.

In 2015, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

RESEARCH INSTITUTE OF CARCINOGENESIS, N.N. BLOKHIN RUSSIAN CANCER RESEARCH CENTER, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



**N. N. Blokhin Russian
Cancer Research Center,
Ministry of Health of Russia**

Online version of the journal
is available at:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov Mikhail A., PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of the Laboratory of Molecular Endocrinology (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Zborovskaya Irina B., PhD, Leading Researcher of the Laboratory of Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Yakubovskaya Marianna G., PhD, DSc, Head of the Department of Chemical Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Gudkova Margarita V., PhD, Scientific Secretary of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2014

4 Vol. 3
'16

Founders:

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; PH "ABV-press"

Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Build. 15
Kashirskoe Shosse, Moscow
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19,
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Articles should be sent to e-mail:
adv.mol.onc@ronc.ru

Managing editor **N.V. Zhukova**
Proofreader **V.A. Naumkina, V.E. Efremova**
Designer **E.V. Stepanova**
Maker-up **O.V. Goncharuk**
Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru

Project Manager **R.A. Kuznetsov**,
+7 (499) 929-96-19,
kuznetsov@abvpress.ru

The journal was registered
at the Federal Service for Surveillance
of Communications, Information

Technologies, and Mass Media
(III No. ФС77-57560
dated 08 April 2014).

If materials are reprinted in whole
or in part, reference must necessarily
be made to the journal "Uspekhi
molekulyarnoy onkologii".

The editorial board is not responsible
for advertising content.

The authors, point of view given
in the articles may not coincide with
the opinion of the editorial board.

ISSN: 2313-805X (Print)
ISSN: 2413-3787 (Online)

Uspekhi molekulyarnoy
onkologii. 2016. Vol. 3.
No. 4. 1–138

© PH "ABV-Press", 2016

Pressa Rossii catalogue index:
93562

Printed at Mediacolor LLC

1,000 copies

EDITORIAL BOARD

- Belitsky Gennady A.**, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Chemical Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Berstein Lev M.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Oncoendocrinology of the N.N. Petrov Cancer Research Institute of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)
- Bozhenko Vladimir K.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of the Department of Pathomorphology and the Laboratory Diagnostics of the Russian Radiology Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Doctor of the Russian Federation (Moscow, Russia)
- Gloushankova Natalia A.**, PhD, DSc, Head of the Laboratory of Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Gurtsevitch Vladimir E.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)
- Imyanitov Eugeny N.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Tumor Growth of the N.N. Petrov Cancer Research Institute of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)
- Kazansky Dmitry B.**, PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Laboratory of Immune Regulation Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Karpukhin Aleksander V.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Complex Inherited Diseases of the Medical Genetic Research Center (Moscow, Russia)
- Kzhyskovska Juliya G.**, PhD, DSc, Professor, Head of Department of Innate Immunity and Tolerance, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University (Heidelberg, Germany)
- Kubasova Irina Yu.**, PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Head of the Department of Scientific Planning and Training of Personnel of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Kushlinskii Nikolay E.**, PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Laboratory of Clinical Biochemistry of the Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Lazarevich Natalia L.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Epithelial Tumors Progress Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Lichtenstein Anatoly V.**, PhD, DSc, Head of the Laboratory of Tumors Biochemistry of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Mazurenko Natalia N.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Oncogenomics of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Mirkin Sergey M.**, Professor, White Family Department of Biology, Chair in Biology Tufts University (Medford, Oregon, USA)
- Sergeeva Natalia S.**, PhD, DSc, Professor, Head of the Prognostics Department of the P.A. Herzen Moscow Scientific and Research Cancer Institute of the Ministry of Health of Russia – a branch of National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)
- Stepanova Evgenia V.**, MD, DSc, Deputy Head of the Department for Interaction with the RAS, Secretary in Charge of the Scientific Coordination Council of the Federal Agency of Scientific Organizations of Russia, (Moscow, Russia)
- Tjulandin Sergey A.**, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, Deputy Director for Research Work of the Research Institute of Clinical Oncology of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Tchevkina Elena M.**, PhD, DSc, Head of the Laboratory of the Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)
- Tcherdyntseva Nadezhda V.**, PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Deputy Director for Research Work, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology of the Tomsk Cancer Research Institute (Tomsk, Russia)

EDITORIAL COUNCIL

- Vasiliev Yuri M.**, PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Chief Researcher of Research Institute of Carcinogenesis of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Vice President of the Cell Biology Society of the RAS (Moscow, Russia)
- Gudkov Andrey V.**, PhD, DSc, Professor, Sr. Vice-President for Basic Science and Chair of the Department of Cell Stress Biology of the Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, New York, USA)
- Davydov Mikhail I.**, MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Director of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Chief Oncologist of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)
- Zaridze David G.**, PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Department of Epidemiology and Prevention of Tumors of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)
- Kopin Boris P.**, MD, PhD, DSc, Professor, Chief Research Assistant of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

МАТЕРИАЛЫ II ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

СЕКЦИЯ I. Мемориальные чтения памяти Ф.Л. Киселева	10
СЕКЦИЯ II. Молекулярные механизмы канцерогенеза	13
СЕКЦИЯ III. Геномика и эпигеномика злокачественных новообразований	36
СЕКЦИЯ IV. Сигнальные каскады в опухолевых клетках	53
СЕКЦИЯ V. Биология и метастазирование	60
СЕКЦИЯ VI. Новые подходы к созданию противоопухолевых препаратов	70
СЕКЦИЯ VII. Молекулярная диагностика и терапия опухолей	92

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ	140
-------------------------------------	------------

MATERIALS OF THE 2ND ALL-RUSSIAN CONFERENCE ON MOLECULAR ONCOLOGY

SECTION I. Readings in memory of F.L. Kiselyov	10
SECTION II. Molecular mechanisms of carcinogenesis	13
SECTION III. Genomics and epigenomics of malignant neoplasms	36
SECTION IV. Signaling cascades in tumor cells	53
SECTION V. Biology and metastasis	60
SECTION VI. New approaches to anticancer drug development	70
SECTION VII. Molecular diagnostics and therapy of tumors	92

INFORMATION FOR AUTHORS	140
--------------------------------	------------

МАТЕРИАЛЫ

II Всероссийской конференции по молекулярной онкологии

6–8 декабря 2016 г., Москва

MATERIALS

of the 2nd All-Russian Conference on Molecular Oncology

Moscow, 6–8 December 2016

СЕКЦИЯ I

МЕМОРИАЛЬНЫЕ ЧТЕНИЯ ПАМЯТИ
Ф.Л. КИСЕЛЕВА

Доклады

**Анализ изменения содержания
микроРНК в цитологических
препаратах как метод скрининга
и дифференциальной диагностики
рака шейки матки**

П.А. Архангельская^{1,2}, Е.В. Бахидзе^{1,2}, С.Е. Титов³,
М.К. Иванов³, И.В. Берлев^{1,2}, А.А. Михетько¹,
Р.Б. Самсонов^{1,4}, Н.Н. Колесников⁴, А.В. Малек^{1,4}

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии
им. Н.Н. Петрова», Санкт-Петербург, пос. Песочный;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский
университет им. И.И. Мечникова», Минздрава России,
Санкт-Петербург;

³ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск;

⁴ООО «Онкосистема», Санкт-Петербург

Введение. Рак шейки матки (РШМ) является одним из самых распространенных злокачественных новообразований органов женской репродуктивной системы и занимает лидирующие позиции в статистике онкологической смертности. Основным этиологическим фактором в развитии РШМ считается вирус папилломы человека (ВПЧ). МикроРНК — короткие одноцепочечные молекулы, регулирующие экспрессию большинства генов на посттранскрипционном уровне. Известно, что инфицирование ВПЧ, развитие и прогрессирование дисплазии эпителия шейки матки сопровождаются изменениями профиля экспрессии микроРНК. Оценка этих изменений может иметь диагностическое значение.

Задачи исследования. Оценить возможность использования определения экспрессии микроРНК в диагностике РШМ.

Материалы и методы. На основе анализа данных литературы мы выбрали 18 микроРНК, потенциально вовлеченных в развитие РШМ. В исследовании при-

няли участие пациентки с РШМ ($n = 33$), интраэпителиальной дисплазией различной степени (с высокой степенью поражения (High grade squamous intraepithelial lesion, HSIL), $n = 28$; с низкой степенью (Low grade squamous intraepithelial lesion, LSIL), $n = 34$) и здоровые доноры ($n = 20$). Диагнозы РШМ и HSIL были подтверждены последующим гистологическим исследованием. РНК выделяли оригинальным методом из материала цитологических мазков, высушенных на стеклах. Анализ экспрессии микроРНК выполняли методом полуколичественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Параллельно во всех препаратах проводили выявление 15 типов ВПЧ высокого онкогенного риска, оценку вирусной нагрузки и генотипирование.

Результаты. Показано, что профиль экспрессии микроРНК отражает стадийность процесса прогрессирования злокачественной трансформации цервикального эпителия от незначительной дисплазии до инвазивной карциномы. Для ряда микроРНК выявлены статистически значимые изменения уровня экспрессии в ряду: норма—LSIL— HSIL—РШМ. По полученным результатам разработаны классификаторы, которые на основе оценки экспрессии 4 микроРНК позволяют уверенно дифференцировать РШМ и дисплазию любой степени (площадь под ROC-кривой (area under ROC curve, AUC) 0,876) или отделять группу РШМ + HSIL, предполагающую дальнейшее обследование, от нормы (AUC 0,940). Наблюдаемые изменения экспрессии микроРНК коррелировали с наличием ВПЧ, но не коррелировали с вирусной нагрузкой. Образцы из группы LSIL характеризовались наиболее гетерогенными профилями экспрессии микроРНК, что может указывать на неоднородность этой категории пациенток в отношении риска развития РШМ.

Выводы. Поиск характерных изменений профиля микроРНК открывает возможность разработки новых методов скрининга и дифференциальной диагностики

РШМ. Внедрение новых методов диагностики может повысить эффективность профилактики и лечения РШМ и предраковых состояний.

Эпигенетическая регуляция инфекции вируса папиллом человека 16-го типа

С.В. Винокурова, Н.П. Киселёва, М.Д. Фёдорова,
А.Н. Катаргин, Д.С. Ёлкин, П.М. Абрамов,
А.Э. Миннегалиева, Л.С. Павлова, Ф.Л. Киселёв,
Н.В. Говердовская

ФГБУ «Российский онкологический научный центр
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Инфекция вирусами папиллом человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска является этиологическим фактором развития рака шейки матки, а также опухолей аногенитальной области и ротоглотки. В настоящее время установлено, что процесс трансформации эпителия инициируется повышенной экспрессией вирусных онкогенов *E6* и *E7*. Однако молекулярные механизмы дерегуляции экспрессии вирусных онкогенов остаются недостаточно изученными.

Задачи исследования. Изучение роли некодирующих РНК, а также метилирования генома ВПЧ 16-го типа на экспрессию вирусных онкогенов.

Материалы и методы. Выделение ДНК и малых РНК проводили из клинических образцов карцином шейки матки различных стадий с использованием микродиссекции. Анализ экспрессии микроРНК выполняли методом глубокого секвенирования и количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Эффект метилирования на активность вирусного промотора исследовали путем введения селективного метилирования сайтов связывания транскрипционных факторов и последующего измерения экспрессии генов-репортеров и вирусных онкогенов. Анализ экспрессии вирусных генов в зависимости от экспериментально изменяемой активности исследуемых микроРНК проводили на клеточных линиях рака шейки матки.

Результаты. Установлено, что паттерн метилирования вирусного генома специфически меняется в процессах дифференцировки плоскоклеточного эпителия и трансформации эпителия, особенно в сайтах связывания вирусного белка E2, являющегося ключевым фактором регуляции вирусной транскрипции и репликации. Метилирование одного из сайтов связывания E2 приводит к существенной активации вирусного промотора и увеличению (до 5 раз) экспрессии вирусных онкогенов. Идентифицированы микроРНК, экспрессия которых изменяется на стадиях продуктивной и трансформирующей инфекции ВПЧ 16-го типа. Для ВПЧ 16-го типа показано, что микроРНК miR-106a, -135, -196a и -224 негативно регулируют экспрессию вирусного онкогена *E6*.

Выводы. Полученные данные позволяют предположить, что метилирование регуляторной области ВПЧ 16-го типа является важным механизмом регуляции экспрессии вирусных генов во время нормального вирусного цикла. Метилирование сайтов связывания вирусного белка E2 может приводить к активации вирусного промотора и повышенной экспрессии вирусных онкогенов. Кроме того, наши данные указывают на возможность регуляции клеточными микроРНК продуктивной и трансформирующей вирусной инфекции ВПЧ.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда (РНФ)
(грант № 15-15-00125).*

Экспрессия эволюционно новых генов в опухолях и возможная роль этого феномена в эволюции

А.П. Козлов

ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого», Санкт-Петербург

Введение. Ранее нами была сформулирована гипотеза эволюционной роли опухолей, одним из нетривиальных предсказаний которой является предположение о специфической экспрессии эволюционно новых генов в опухолях.

Задачи исследования. Изучение опухолеспецифичности экспрессии эволюционно новых генов и эволюционную новизну генов с опухолеспецифической экспрессией.

Материалы и методы. Для определения эволюционной новизны генов мы использовали программы HomoloGene, release 68, ProteinHistorian, BLAST и HMMER. Ортологи изучаемых генов искали в 26 полногеномных последовательностях эу- и прокариот.

Для изучения опухолеспецифичности экспрессии применяли полимеразную цепную реакцию на панелях комплементарной ДНК (кДНК) из нормальных и опухолевых тканей. Использовали также сравнение *in silico* без данных последовательностей кДНК из нормальных и опухолевых тканей.

Результаты. Мы описали несколько единичных генов с двойной специфичностью — эволюционно новых, экспрессирующихся опухолеспецифически или преимущественно в опухолях (*OTF*, *ESRG*, *PVT1*, *ELFN1-AS1*, *HHLA1*, *DCD*, *SPRRIA*, *CLLUI*, *PBOVI* и др.).

Мы также показали эволюционную новизну целых классов генов, экспрессирующихся преимущественно в опухолях, а именно СТ-Х генов и генов, некодирующих опухолеспецифические РНК, описанных в нашей лаборатории.

Мы изучили филогенетическое распределение ортологов генов, экспрессирующихся в опухолях, и по-

казали, что различные функциональные классы генов имеют разную эволюционную новизну, причем некоторые из них обогащены эволюционно новыми генами. Оказалось, что эволюция онкогенов, генов-супрессоров опухолевого роста и дифференцировочных генов происходит параллельно, что подтверждает участие опухолей в происхождении новых клеточных типов. Некоторые гены человека, определяющие прогрессивные признаки, возникают у рыб и впервые экспрессируются в опухолях рыб.

Мы также проанализировали данные литературы об экспрессии эволюционно новых генов, возникших с участием различных молекулярных механизмов. Эти сведения подтверждают тот факт, что гены, произошедшие путем геной дупликации и перестановки экзонов, а также возникшие *de novo* и из последовательностей эндогенных ретровирусов, экспрессируются в опухолях, причем некоторые из них с очень высокой специфичностью.

Выводы. Экспрессия эволюционно новых генов в опухолях может быть новым биологическим феноменом, играющим важную роль в возникновении новых типов клеток, тканей и органов. Целесообразно изучить возможность использования эволюционно новых генов и их продуктов в качестве мишеней для диагностики, терапии и профилактики опухолей.

Involvement of persistent viral infections in the development of autoimmune diseases

M.F. Murovska, S.V. Chapenko, M.A. Cistjakovs,
A.M. Sultanova, S.A. Rasa, Z.E. Nora-Krukke, V.V. Groma

Rīga Stradiņš University, Riga

Background. Viruses and viral infections are considered to be the main risk factors for autoimmune disease development (especially with genetic predisposition).

Objective. This study aims to investigate involvement of persistent human herpesvirus 6 (HHV-6) and parvovirus B19 (B19) infection in rheumatoid arthritis (RA), autoi-

mmune thyroiditis (AIT) and myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS) development.

Materials and methods. 80 RA, 45 AIT and 200 ME/CFS patients, and corresponding controls were enrolled in this study. Viral genomic DNA was detected by PCR, infection activity phase by RT-PCR and real time PCR, HHV-6 variants by restriction analysis, presence of viral antigens by immunohistochemistry.

Results. HHV-6B and B19 genomic sequences were detected in blood DNA of 31 % (25/80) and 27 % (22/80) RA patients, respectively. In 10/25 RA patients active HHV-6 and in 8/22 active B19 infection was detected. Elevated median HHV-6 load was detected in 10/25 RA patients with persistent HHV-6 infection. HHV-6 and/or B19 genomic sequences were detected in all 7 investigated synovial tissue/fluid samples and presence of viral antigens was shown immunohistochemically. In AIT patients the presence of persistent HHV-6 infection was significantly higher than in the control group (98 % vs. 77 % respectively). A significantly higher frequency of HHV-6 activation marker (U79/80 mRNA) was found in patients' thyroid gland tissue samples with AIT (41 % vs. 6 % respectively). The median HHV-6 load was higher in patients with active viral infection than in patients without it. The presence of HHV-6 antigens expression was demonstrated in intrafollicular cellular clusters and immunohistochemistry indicated thyrocytes in the follicle wall. Analysing 200 patients with ME/CFS, persistent HHV-6 infection in latent phase had 80/200 (40 %), whereas in active phase – 26/200 (13 %) patients. HHV-6 U89/90 gene expression was detected in 57 ME/CFS patients and median HHV-6 load was 1634.7 (IQR 7425.6–278.3) copies/10⁶ cells. In addition latent B19 infection had 24/200 (12 %) and active – 34/200 (17 %) patients with ME/CFS. B19 NS1 gene expression was detected in 25 ME/CFS patients and median B19 viral load was 27.4 IQR: 60.3–4.1 copies/μg of DNA.

Conclusions. Presence of HHV-6 and B19 infection markers in RA, AIT and ME/CFS patients, correlation of persistent infection activity phase with clinical course severity allows suggest involvement of these viruses as the etiopathogenic factors/co-factors in the autoimmune diseases development.

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. Вартанян

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

Введение. Долгое время неангиогенез 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, выстланные 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, неконтактное 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^{1,2}, Л. Бикл², Ш.У. О'Брайн², С. Сио³,
С. Литвин², Э.А. Големис², Д.К. Конолли²

¹Научно-исследовательская лаборатория «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний»

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань;

²Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия;

³Университет 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 мышей MISIR-Tag; мышей линии *Nedd9*^{-/-}; мышей 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*^{-/-} 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^{1,2}, О.В. Панкова¹, В.Д. Якушина¹, Т.С. Герашенко^{1,2}, Л.А. Таширева¹, С.А. Тузиков¹, В.М. Перельмутер¹

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

²ФГАОУ 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. Долинная¹, А.М. Оглоблина², Н.Ю. Карпеченко²,
М.Г. Якубовская²

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

²Научно-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_A).

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

О.Л. Кардымон¹, А.В. Снежкина¹, Д.В. Сидоров²,
Г.С. Краснов¹, Кудрявцева^{1,2}

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

²ФГБУ «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 (H₂O₂) в качестве побочного продукта метаболизма полиаминов. Высвобождение H₂O₂ 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. Оценка 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 про-туморогенную 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-про-моторная 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 неoadъювантной химиотерапии новых клонов, несущих амплификации, приводит к метастазированию

М.К. Ибрагимова^{1,2}, М.М. Цыганов^{1,2},
Н.В. Литвяков^{1,2}

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

Задачи исследования. Изучение изменения статуса CNA (Copy Number Aberration) опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной 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 (делеций 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. Иванова¹, Е.В. Моисеенко-Голубовича¹,
В.В. Грома¹, М.Ф. Муровская²

¹Рижский университет им. П. Страдина, Рига;
²Институт 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. Ломакина¹, А. Полесская², А.Ю. Александрова¹,
А. Готро²

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

²Ecole 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. Лушников¹, Н.В. Шилова², Ж.Г. Маркова²,
Ю.О. Козлова², Л.Ф. Морозова¹, А.В. Балбуцкий¹

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

²ФГБНУ «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 аберрациями. 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 макрофагами. 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 ЕЗ-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. Мисюрин^{1,2}, В.А. Мисюрин^{2,3}, А.В. Мисюрин^{2,3},
А.М. Ковригина¹, С.К. Кравченко¹, Е.А. Барях⁴,
А.У. Магомедова¹, Е.Н. Пушкова^{2,3}, Ю.П. Финашутина^{2,3}

¹ФГБУ «Гематологический научный центр»

Минздрава России, Москва;

²ООО «ГеноТехнология», Москва;

³ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва;

⁴ГБУЗ 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* ≥ 40 % и *BCL2* ≥ 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 высокоагрессивных В-клеточных лимфом наряду с определением реаранжировок генов *c-MYC*, *BCL2*, *BCL6*. Мутации в гене *TP53* – значимый фактор прогноза у больных высокоагрессив-

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. Митрофанова¹⁻³, М.В. Завьялова^{2,3}, Н.В. Литвяков^{1,2},
Н.В. Чердынцева^{1,2}, Ю.Г. Кжышковска¹

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

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

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

Введение. Хитиназоподобные белки являются секретрируемыми 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 оставались неизвестными.

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

Материалы и методы. Для функционального теста на миграцию использовали свежeweделенные с помощью системы магнитной сепарации CD14⁺ моноциты человека. В исследовании применяли супернатанты клеток HEK293, 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, секретрируемый 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. Мкртчян¹, Л.А. Кесаева², И.Н. Солдатов¹,
Е.А. Османов², А.В. Мисюрин², Ю.П. Финашутина²

¹ООО «ГеноТехнология», Москва;

²ФГБУ «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 экстрамедулярных 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. Пузанов¹, Е.Е. Егоров¹, А.А. Дмитриев¹,
М.А. Афанасьева¹, А.Д. Бениаминов¹, Х.С. Вишнякова¹,
Т.Т. Кондратьева², В.И. Кашуба³, В.Н. Сенченко¹

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

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

³Karolinska 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. Смирнихина¹, А.В. Лавров¹, Э.П. Адильгереева¹,
Е.Ю. Чельшева², О.А. Шухов², А.Г. Туркина², С.И. Купев¹

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

²ФГБУ «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 ($BCR/ABL \leq 0,1\%$ 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/ β -катенин и AA/Sox-2 как основа антиканцерогенного действия кураксина CBL0137

Т.И. Фетисов^{1,2}, Е.А. Лесовая^{1,3}, В.В. Татарский¹,
А.В. Гудков⁴, К.В. Гурова⁴, М.Г. Якубовская¹, О.А. Власова¹,
Г.А. Белицкий¹, В.П. Максимова¹, Ф.И. Турсунова^{1,2},
К.И. Кирсанов¹

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

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

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

⁴Институт онкологии им. Розвелла Парка, Баффало

Введение. Кураксины представляют собой низкомолекулярные карбазольные производные, способные одновременно активировать р53-зависимый апоптоз и ингибировать сигнальный путь NF- κ 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 β -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: HCT-116, HT-29, CaCo-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. Шубин¹, Е.А. Лесовая², К.И. Кирсанов², А.А. Комиссаров¹,
Л.С. Труханова², Т.Г. Горькова², Е.Е. Антошина²,
М.Г. Якубовская², Г.А. Белицкий², И.В. Демидюк¹

¹ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН», Москва;

²НИИ 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 РФФ (грант № 14-14-00526).

Роль опухолеассоциированной эозинофилии в патогенезе рака желудка

К.И. Янкович^{1,2}, А.И. Дмитриева^{1,2}, Ю.В. Колобовникова¹,
О.И. Уразова¹, И.Л. Пурлик^{1,2}, В.В. Новицкий¹

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

²ОГАУЗ «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. Опухлеассоциированная 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^{1,2}, Л.П. Сычева²

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

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» 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. Гильдиева¹, А.А. Абдувалиев², М.С. Сайдалиева³, М.Б. Хидирова³

¹Республиканский онкологический научный центр Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент;

²Ташкентская медицинская академия, Ташкент;

³Центр 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 иницирующих, 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. Исламов¹, М.С. Гильдиева¹, А.А. Абдувалиев²,
Р.Х. Усманов¹, Б.Ю. Юсупов¹

¹РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент;

²Ташкентская 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 бактериоидов 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 бактериоидам, 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. Кутилин¹, О.И. Кит¹, Д.И. Водолажский¹, Л.В. Харин¹,
М.А. Кожушко¹, П.В. Золотухин²

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

²Научно-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 g. У 10 пациентов выборки, представленной женщинами в возрасте 43–81 год, обнаружено увеличение экспрессии только Phospho-Ta и PKC g. У 10 пациентов-мужчин в возрасте 50–76 лет наблюдалось достоверное увеличение экспрессии 5 белков: c-Мус, NGFR p75, FAK, PKC b, Phospho-Pyk2. У пациентов обоих полов после 60 лет отмечено достоверное увеличение экспрессии белков c-Мус, Cytoke-ratin per 4, Glutamate receptor NMDAR 2a, NGFR p75, PKC g 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. Богущ, 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 α - 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 α и регулируемые им сигнальные пути, опосредующие ангиогенез, метаболизм глюкозы, клеточную пролиферацию. HIF-1 α в ядре образует комплекс с белком ARNT, ядерным переносчиком арил-гидрокарбонового рецептора (AhR), который может конкурировать за ARNT с HIF-1 α . 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 α - 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 α 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 α* , *AhR*, *ARNT*, гена-мишени AhR (*CYP1B1*) и генов-мишеней

HIF-1 α (*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 α 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 α , 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 G₁ было 59 больных, G₂—50, G₃—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. Полатова¹, М.С. Гильдиева¹, А.А. Абдувалиев²

¹РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент;

²Ташкентская 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 mtrp53-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 высокодигрентными 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 глутамина 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*, отличающимися 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_a, 15-34-70031_мол_a_мос).

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

Ш.У. Турдикулова¹, О.Н. Вагина²

¹Центр высоких технологий Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент;

²Калифорнийский 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).

СЕКЦИЯ III

ГЕНОМИКА И ЭПИГЕНОМИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ
НОВООБРАЗОВАНИЙ

Доклады

Гиперметилированные гены микроРНК
как потенциальные маркеры
при светлоклеточном раке почки

Е.В. Береснева¹, В.И. Логинов², Д.С. Ходырев³,
И.В. Пронина^{2, 4}, Т.П. Казубская⁵, Н.Е. Кушлинский⁵,
А.В. Карпунин⁴, Э.А. Брага^{2, 4}

¹ФГУП «Государственный научно-исследовательский
институт генетики и селекции промышленных
микроорганизмов», Москва;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей
патологии и патофизиологии», Москва;

³ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр
специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий» Федерального медико-биологиче-
ского агентства, Москва;

⁴ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва;

⁵ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. В России наблюдается высокий уровень смертности от светлоклеточного почечно-клеточного рака (скПКР), что связано с поздним выявлением этого заболевания. Для ранней диагностики рака, в частности скПКР, перспективно применение биомаркеров, к которым относятся профили экспрессии и метилирования микроРНК.

Задачи исследования. Поиск генов микроРНК, гиперметилирование которых в опухолях может служить эффективным маркером для диагностики и прогноза скПКР.

Материалы и методы. Профиль метилирования 7 генов микроРНК (miR-9-1/3, miR-34b/c, miR-124a-1/2/3 и miR-129-2) исследовали в образцах ДНК опухолевой и гистологически неизменной тканей 50 больных скПКР методами бисульфитной конверсии ДНК с последующей метилспецифичной полимеразной цепной реакцией.

Для количественной оценки отобранных маркеров и систем маркеров применяли метод ROC-анализа.

Результаты. При скПКР обнаружен высокий уровень метилирования 7 генов (miR-9-1/3, miR-34b/c, miR-124a-1/2/3, miR-129-2) и показана корреляция гиперметилирования 5 генов микроРНК с клиническими характеристиками скПКР, такими как стадия, размер опухоли, степень дифференцировки и метастазирование. Высокие значения чувствительности (88 %), специфичности (94 %) и площади под ROC-кривой (area under ROC curve, AUC) (0,83–0,84) были получены для диагностических систем из 4 маркеров. Среди изученных генов микроРНК ген *miR-129-2* оказался эффективным маркером прогноза прогрессии, включая метастазирование скПКР (чувствительность – 75 %; специфичность – 79 %; AUC – 0,77).

Выводы. Ряд генов микроРНК предложены как эффективные биомаркеры для ранней диагностики и прогноза скПКР.

Переключение экспрессии изоформ
субъединицы РНФ10
ремоделирующего хроматин
комплекса РВAF в процессе
дифференцировки клеток крови

Г.М. Вирясова¹, Н.В. Сошникова², Ю.П. Симонов²,
Г.Ф. Судьина¹, С.Г. Георгиева²

¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва

Введение. Дифференцировка нейтрофилов происходит из гематopoэтических стволовых клеток по ми-

елоидному пути. В ходе дифференцировки возникают изменения в экспрессии генов, которые приводят к значительной специализации клеток и изменению морфологии. При нарушениях и сбоях процессов дифференцировки промиелоцитов возникает промиелоцитарная лейкемия. Ремоделирующий хроматин комплекс PBAF (SWI/SNF) — один из наиболее важных мультибелковых комплексов, контролирующих транскрипцию генов и влияющих на дифференцировку клеток. Предполагается, что именно специфические субъединицы комплекса определяют паттерны экспрессирующихся генов в разных типах клеток. Альтернативные субъединицы PBAF комплекса могут являться не только различными белками, но и изоформами одного белка, которые имеют способность функционально отличаться.

Задачи исследования. Изучение роли замены субъединиц комплекса PBAF в процессе дифференцировки промиелоцитов человека в нейтрофилы.

Материалы и методы. Модельной системой являлись раковая линия HL-60, дифференцированные из нее 2 мкМ транс-ретиноевой кислотой миелоциты и нейтрофилы, выделенные из крови здоровых доноров. Для подтверждения дифференцировки применяли микроскопию и полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией. Уровень экспрессии субъединиц определяли с использованием проточной цитометрии, вестерн-блоттинга и иммунопреципитации.

Результаты. На 3-й и 6-й день дифференцировки наблюдали изменения в структуре ядра клеток, увеличение экспрессии специфических маркеров CD66 (a и b) и падение экспрессии генов клеточного цикла CyclinD1 и P21, которые сравнивали с нейтрофилами. Было выявлено, что в ходе дифференцировки в ряду недифференцированные HL-60—дифференцированные HL-60—нейтрофилы происходит уменьшение экспрессии субъединиц комплекса, например, Brg1 и Baf200.

Было проанализировано содержание различных изоформ субъединицы PNF10 на разных этапах дифференцировки. Субъединица PNF10 имеет 4 изоформы (Pl, Ps, Sl и Ss), отличающиеся наличием или отсутствием N-концевого и PND-доменов. В ходе дифференцировки клеток по миелоидному пути происходит замена изоформы PNF10-Pl на PNF10-Ss. В дальнейшем планируется изучить влияние PBAF-комплекса на экспрессию специфических генов в ходе дифференцировки промиелоцитов.

Выводы. На основании полученных данных можно сделать следующие выводы:

- при дифференцировке клеток крови по миелоидному пути снижается экспрессия субъединиц PBAF-комплекса;
- происходят качественные изменения состава комплекса как минимум в 1 из субъединиц: изоформа PNF10-Pl заменяется на изоформу PNF10-Ss.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-34-00531_мол_а).

Выявление потенциально драйверных соматических мутаций в опухолевых тканях на основании данных полнотранскриптомного секвенирования

Н.Л. Лазаревич^{1,2}, Е.Р. Набиева², Д.В. Виноградов²⁻⁴,
Н.С. Мюге^{2,4}, М.Д. Логачева^{2,3}, А.А. Пенни^{2,3},
М.А. Пятницкий^{4,5}, Д.А. Шавочкина¹, И.Ф. Кустова¹,
А.С. Макарова^{1,2}, О.М. Кривцова^{1,2}, Н.Е. Кудашкин¹,
Ю.И. Патютко¹, Е.А. Котельникова^{3,4}

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

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³ФГБУН «Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН», Москва;

⁴ЗАО «Персональная Биомедицина», Москва;

⁵ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», Москва

Развитие технологий массового параллельного секвенирования (NGS) открывает значительные перспективы в идентификации фундаментальных механизмов злокачественной трансформации и разработке подходов к выбору индивидуализированной тактики лечения онкологических заболеваний. Главная проблема такого подхода — отсутствие устоявшихся алгоритмов анализа огромного массива данных NGS. Важной представляется разработка методов, позволяющих среди значительного количества геномных нарушений идентифицировать «драйверные мутации», являющиеся непосредственной причиной возникновения и прогрессии опухолей.

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГК) — наиболее распространенная форма злокачественных опухолей печени, характеризующаяся поздними сроками выявления, высокой агрессивностью, отсутствием эффективных схем лечения и значительной гетерогенностью вызывающих ее генетических изменений. Мы разработали подход для выявления «драйверных» мутаций на основе комплексного анализа генетических нарушений по результатам секвенирования экзона и транскриптома нормальной и опухолевой ткани. Апробация предложенного метода показала, что среди нескольких сотен значащих соматических мутаций, выявляемых при полноэкзомном секвенировании, в опухолевой ткани экспрессируются лишь 10–20. Среди транскрибируемых мутаций значительную долю составляют мутации в генах, нарушение функции которых с высокой вероятностью определяет формирование злокачественного фенотипа ГК.

Помимо соматических мутаций, анализ данных полнотранскриптомного секвенирования позволил выявить характерные для опухолевой ткани слитные белки (например, химерный белок с онкогенными свойствами DNAB1-PRKACA, определяющий развитие отдельного подкласса фиброламмеллярной ГК и рас-

смаатривающийся как потенциальная терапевтическая мишень).

*Работа частично поддержана субсидией
Минобрнауки России (соглашение 14.607.21.0049,
RFMEFI60714X0049).*

Эпигенетические маркеры рака молочной железы, полученные по результатам секвенирования метиломов

А.С. Танас¹, Т.В. Кекеева¹, Е.Б. Кузнецова²,
Е.В. Поддубская³, Р.А. Керимов³, И.Д. Троценко⁴,
В.В. Руденко¹, Д.В. Залетаев², В.В. Стрельников¹

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

²ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»

Минздрава России, Москва;

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

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Введение. Идентификация отдельных подтипов злокачественных новообразований, предполагающих различные подходы к их лечению, — актуальная проблема онкологии. Для рака молочной железы (РМЖ) уже предложена классификация подтипов, основанная на различиях экспрессии генов. Однако определение уровня экспрессии в клиническом образце осложняется наличием примеси нормальной ткани и низким качеством РНК, получаемой из архивных материалов. В качестве альтернативы рассматривается возможность использования для классификации подтипов РМЖ профилей метилирования ДНК геномов опухолей.

Задачи исследования. Разработать метод широкогеномного секвенирования ДНК, позволяющий определять состояние метилирования тысяч генов в больших выборках образцов клинического материала. Проанализировать не менее 100 образцов РМЖ и выделить эпигенетические подтипы заболевания. Определить маркеры метилирования ДНК, ассоциированные с клинико-морфологическими свойствами опухолей и ответом на неоадьювантную химиотерапию.

Материалы и методы. Были исследованы 6 образцов клеточных линий РМЖ, 10 образцов нормальной ткани молочной железы и 110 операционных образцов РМЖ. Исследование метиломов проводили с использованием собственной модификации метода бисульфитного секвенирования ограниченных выборок локусов HmaI-RRBS.

Результаты. Проанализированы эпигеномные различия нормальных и опухолевых тканей молочной железы. Выявлены группы генов, аномальное метилирование которых характерно для эпигенетических подтипов РМЖ. Впервые показано, что по уровню метилирования ДНК нормальная ткань в наибольшей степени отличается от РМЖ в области промотора гена транскрипционного фактора ZIC4 (частота аномаль-

ного метилирования в гетерогенной выборке образцов РМЖ, стратифицированной по иммуногистохимическим подтипам, составила 96 %; в нормальных тканях молочной железы метилирование отсутствует). Определено 114 генов, частоты дифференциального метилирования которых достоверно отличают 2 эпигенетических подтипа РМЖ верхнего уровня: гиперметилированный и умеренно метилированный. Предложена система маркеров метилирования ДНК для диагностики эффективности неоадьювантной терапии РМЖ с использованием антрациклинов.

Выводы. Разработанная авторами технология широкогеномного скрининга метилирования ДНК позволяет сформировать независимую эпигеномную классификацию РМЖ. Выявленные маркеры могут использоваться для разработки систем диагностики эффективности противоопухолевой терапии.

Изучение связи генетического полиморфизма с экспрессией ABC-транспортёров в опухоли молочной железы при химиотерапии

М.М. Цыганов^{1,2}, И.В. Дерюшева^{1,3}, М.К. Ибрагимова^{1,2},
Е.М. Слонимская^{1,3}, Н.В. Литвяков^{1,2}

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

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

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

Введение. Основной причиной неэффективности неоадьювантной химиотерапии (НХТ) опухоли считают формирование под действием лекарственных средств фенотипа адаптивной множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), который обусловлен повышением экспрессии генов ABC-транспортёров [N.V. Litviakov et al., 2013]. Механизмы регуляции экспрессии генов ABC, которые связаны с индивидуальными генетическими особенностями опухоли, определяемыми однонуклеотидным полиморфизмом (single nucleotide polymorphism, SNP), не изучены.

Задачи исследования. Широкогеномное исследование ассоциации SNP и экспрессии генов ABC-транспортёров в опухоли молочной железы при проведении НХТ.

Материалы и методы. Обследованы 84 больных раком молочной железы (IIA–IIIB). Пациенты получали 2–4 курса НХТ. Оценку экспрессии генов ABC выполняли в 84 парных образцах до лечения и после НХТ (количественная полимеразная цепная реакция). ДНК из биоптата использовали для микроматричного анализа на чипе CytoScan HD Array (Affymetrix, США) и получения данных по 750 000 SNP. Связь экспрессии генов ABC с SNP оценивали с помощью программы R version 3.0.2.

Результаты. Идентифицированы 4 из 136 изученных SNP в генах ABC-транспортёров, которые связаны с их экспрессией. Кроме этого, доказано наличие в опухоли молочной железы функционального экспрессионного кластера 4 генов ABC (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2*), который сопряжен с формированием адаптивной МЛУ и прогнозом заболевания. На основании полученных данных была построена ассоциативная сеть из 25 генов, участвующих в регуляции кластера ABC. Идентифицирована и валидирована панель 19 полиморфизмов, у которых дикий и мутантный генотипы в опухоли до лечения сопряжены со снижением либо повышением экспрессии кластера генов ABC и ответом на НХТ.

Выводы. Показана важная роль SNP в регуляции экспрессии генов ABC-транспортёров. Выявлено, что формирование адаптивной МЛУ сопряжено с работой группы генов ABC. На основе результатов исследования сформирована и клинически валидирована генетическая панель из 19 полиморфизмов для прогнозирования направления изменения экспрессии кластера генов ABC в опухоли молочной железы при химиотерапии.

Investigation of EGFR polymorphisms in Non small cell lung cancer

V. Jurisic

University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Kragujevac

Background. Epidermal growth factor receptor (EGFR) was usually over expressed in many epithelial cancers

including lung cancer. Regulation of EGFR expression is under investigation and it is not completely elucidated, so it is under the influence of different factors. The polymorphisms are described as 2 or more different forms of the same gene (allele) that are settled in the same genetic locus. Still it is unclear relation between those EGFR mutations and their polymorphisms (SNPs), but they were connected with enhanced promoter activity, with increased gene and protein expression, and some side effects of therapy for NSCLC.

Objective. Aims of this study was to shown distribution of EGFR polymorphisms in Serbian population after standardisation of methods and compared obtained data with results from different ethnic populations.

Material and methods. Here we optimized methods for investigation PCR reaction including standardization of different additives, temperature and other conditions for amplification promoter regulators of EGFR, including -216G>T, -191C>A and 181946 C>T (SNPs). This study involved 47 NSCLC patients and 43 health persons for SNPs investigation.

Results. Results showed that the most frequent haplotypes in both NSCLC patients and healthy subjects in Serbia were CG (54.96 %), CT (27.36 %), while AG (16.38 %) and AT where present at 1.30 %. Caucasians and Afro-Americans had more frequent -216G/T than Asians, but -191C/A was present only in Caucasians. SNPs -216G>T and -191C>A discussed here, were present with different frequency in great ethnic groups.

Conclusions. According to those considerations, it could be noticed that investigation of SNPs could be of benefit as potential pharmacogenetic biomarker for efficacy and safety of therapy for NSCLC.

Постеры

Изменение копийности генов у пациентов с диагнозом рака желудка

Д.И. Водолажский, М.З. Татимов, А.А. Маслов,
Н.Н. Тимошкина

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

Введение. Рак желудка (РЖ) — гетерогенное заболевание, характеризующееся различными гистологическими, анатомическими и молекулярными особенностями. Одним из ключевых механизмов онкогенеза служит изменение копийности генов, так как результатом этого генетического полиморфизма может стать снижение или повышение экспрессии онкоассоциированных генов.

Задачи исследования. В настоящем исследовании была изучена относительная копийность (RCQ) 16 ядерных генов — участников ключевых сигнальных путей, регулирующих рост клетки, выживание, метастазирование и устойчивость к химиотерапии (*APC*, *AURKA*, *CCND1*, *c-MYC*, *GKN1*, *GSTP1*, *HER2*, *IRX1*, *MDM2*, *MET*, *NFKB*, *OCT1*, *P53*, *PIK3CA*, *POU5F1B* и *S6K2*), — и некодирующего локуса HV2 митохондриальной ДНК (мтДНК), потеря копийности которого является распространенным событием в различных неоплазиях.

Материалы и методы. RCQ определяли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в операционных образцах РЖ и соответствующих им условно здоровых тканей желудка. Копийность считали измененной, если отношение $RCQ_{опухоль}/RCQ_{норма}$ было $> 1,5$ или $< 0,5$. В исследование вошли 34 пациента (22 мужчины и 12 женщин; медиана возраста — 66 лет) с диагнозом: РЖ, G₂₋₃ аденокарцинома, из них 14 опухолей классифицированы как T3—4N0M0, 19 — T3—4N1—2M0.

Результаты. Выявлено увеличение копийности 8 генов (*AURKA*, *CCND1*, *c-MYC*, *HER2*, *NFKB*, *OCT1*, *PIK3CA*, *POU5F1B*), потеря копийности зафиксирована для 2 генов-онкосупрессоров (*IRX1* и *P53*). Отметим, что амплификация *POU5F1B* сопровождалась увеличением копийности *c-MYC*; оба эти онкогена локализованы рядом на хромосоме 8q24. Наиболее частым событием стала потеря копийности локуса мтДНК HV2 — в 9 (26 %) случаях, и в 1 случае HV2 был амплифицирован. В образцах опухолей РЖ первичной распространенности отмечена тенденция повышения уровня копийности как по отдельным амплифицированным локусам (например, для гена *c-MYC* медиана RCQ составила 1,53 в группе T3—4N0M0 против 4,57 в группе T3—4N1—2M0), так и по всем локусам (медиана RCQ — 1,62 и 2,26 соответственно в группах без

поражения и с поражением регионарных лимфатических узлов). Кроме этого, индикаторным маркером группы T3—4N1—2M0 стал ген *HER2*, амплификация которого отсутствовала в опухолях без поражений лимфатических узлов. В целом 16 (47 %) образцов неоплазий желудка продемонстрировали амплификацию и/или потерю хотя бы по одному ядерному гену.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о значимой роли изменений копийности исследованных генов в процессах потенциальной онкотрансформации и дальнейшего рецидивирования клеток эпителия желудка, что, очевидно, поможет в разработке биомаркеров РЖ.

Оценка молекулярного профиля микроРНК при раке молочной железы

Е.А. Гутковская

ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», агрогородок Лесной, Минский район

Введение. В структуре онкологических заболеваний у женщин рак молочной железы (РМЖ) является одной из наиболее агрессивных и относительно часто встречающихся форм злокачественных новообразований. В настоящее время предполагается, что молекулярно-генетические нарушения в системе микроРНК играют важную роль в развитии и прогрессировании РМЖ.

Задачи исследования. Оценить уровень экспрессии панели микроРНК (miR-145, miR-34a, miR-155, miR-182, miR-125b, let-7c, miR-30c, miR-10b, miR-200c, miR-221) при РМЖ.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили 128 образцов опухолевой ткани, заключенной в парафиновые блоки, пациенток с РМЖ II—III стадии. Молекулярно-генетическое исследование выполняли с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Оценку уровня экспрессии микроРНК осуществляли методом 2-ΔΔCt. В качестве референсного гена использовали малые ядерные РНК RNU1.

Результаты. В анализируемой группе пациенток наиболее частым морфологическим вариантом опухоли была протоковая аденокарцинома (77,3 %) с умеренной степенью дифференцировки (78,9 %) люминального В-подтипа (36,7 %).

При проведении молекулярно-генетического тестирования изменения в уровне экспрессии miR-125b детектированы у 40,6 % пациенток, miR-145 — у 54,2 %, miR-34a — у 21,1 %, miR-155 — у 53,1 %, let-7c —

у 34,4 %, miR-30c — у 32,8 %, miR-10b — у 61,7 %, miR-200c — у 52,4 % и miR-221 — у 27,3 %. Характер экспрессии miR-125b, let-7c, miR-30c, miR-145, miR-34a, miR-10b соответствовал низкому уровню, miR-155, miR-200c и miR-221 — высокому.

Установлено, что aberrантная экспрессия исследуемых микроРНК наиболее характерна для умеренно дифференцированной протоковой аденокарциномы люминального В-подтипа при отсутствии статистически значимых различий между спектром эпигенетических нарушений и клинико-морфологическими характеристиками РМЖ.

Изучение прогностической роли микроРНК при прогрессировании заболевания ($n = 59$) также не выявило значимых различий в спектре нарушений в экспрессии исследуемых микроРНК по сравнению с пациентками без прогрессирования РМЖ ($n = 69$).

Выводы. РМЖ характеризуется наличием выраженных нарушений в системе микроРНК, однако статистически значимой связи между нарушением в экспрессии исследуемых микроРНК и клинико-морфологическими характеристиками РМЖ, прогнозом течения заболевания не установлено.

Частота и распределение различных типов мутации гена *VHL* в светлоклеточных карциномах почек

Т.А. Жинжило¹, Д.С. Михайленко², А.В. Колпаков³,
Т.В. Кекеева⁴, Н.Е. Кушлинский⁵, М.В. Немцова⁶

¹ФГАУ «Лечебно-реабилитационный центр»
Минздрава России, Москва;

²ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, Москва;

³ГБУЗ «Тамбовская областная клиническая больница
им. В.Д. Бабенко», Тамбов;

⁴ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва;

⁵ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

⁶ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России, Москва

Введение. Рак почки — 2-е по частоте встречаемости онкологическое заболевание мочеполовой системы, 75 % случаев которого представлены светлоклеточной карциномой (СКК). Среди молекулярно-генетических нарушений при развитии СКК наиболее распространенной является инактивация гена *VHL* вследствие мутаций. Ген-супрессор *VHL* локализован в области 3p25, содержит 3 экзона и кодирует белок, ответственный за убиквитин-зависимый протеолиз индуцируемого гипоксией фактора (hypoxia-inducible factor, HIF) — положительного регулятора клеточной пролиферации. Соматические мутации в гене *VHL* встречаются во всех экзонах, в то время как герминальные мутации при синдроме Хиппеля—Линдау имеют локальные максимумы встречаемости.

Задачи исследования. Поиск соматических мутаций и характеристика особенностей их локализаций в кодирующей последовательности гена *VHL*.

Материалы и методы. Исследовали 60 замороженных образцов опухолевой ткани СКК. Геномную ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Мутации в гене *VHL* выявляли с помощью полимеразной цепной реакции экзонами 1–3 и последующего секвенирования по Сэнгеру на капиллярном генетическом анализаторе 3500 × 1.

Результаты. Мутации гена *VHL* были определены в 31 (51,6 %) из 60 образцов СКК. Из них 13 (41,9 %) мутаций представлены однонуклеотидными заменами, 10 (32,3 %) — делециями, 5 (16,1 %) — инсерциями, остальные 2 (6,4 %) приходятся на комплексные мутации. В 19 (61,3 %) из 31 случая мутации привели к сдвигу рамки считывания и формированию новых стоп-кодонов. Среди однонуклеотидных замен выявлены 2 (15,4 %) нонсенс-мутации и 1 (6,6 %) мутация сайта сплайсинга. В 1-м экзоне обнаружено 54,8 % (17/31) мутаций, во 2-м — 29 % (9/31), и 16,1 % (5/31) мутаций приходилось на 3-й экзон гена *VHL*. Показано, что 11 (84,6 %) из 13 выявленных случаев миссенс-мутаций локализованы в области β-домена, играющего ключевую роль в выживании опухолевой клетки в условиях гипоксии, среди них 3 (27,2 %) — в области связывания с HIF и 2 (18,2 %) — в районах связывания с протеинкиназами нескольких типов.

Выводы. Анализ локализации и характера соматических мутаций *VHL* позволяет расширить наши представления о механизмах инактивации этого гена в канцерогенезе СКК. Накопление сведений о новых мутациях *VHL* позволяет дополнять соответствующие базы данных, что имеет прикладное значение при интерпретации выявленных мутаций у пациентов с подозрением на наследственную форму СКК — синдром Хиппеля—Линдау.

Оверэкспрессия семейства микроРНК miR-83, -96, -182 может вносить вклад в одновременную инактивацию потенциальных генов-супрессоров *CTDSPL1/2* при немелкоклеточном раке легкого

Г.С. Краснов¹, Г.А. Пузанов¹, А.Д. Бениаминов¹,
А.А. Дмитриев¹, Т.Т. Кондратьева², В.Н. Сенченко¹

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

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

Введение. Семейство С-концевых малых сериновых фосфатаз (SCP) — *CTDSP1*, *CTDSP2* и *CTDSPL* — играет регуляторную роль в ряде важных клеточных про-

цессов и сигнальных путей. В частности, показано, что CTDSPL может активировать опухолевый супрессор Rb, ключевой регулятор клеточного цикла, за счет дефосфорилирования сериновых остатков. Несмотря на то, что вопрос о дефосфорилировании Rb другими членами семейства (CTDSP1 и CTDSP2) остается открытым, высокая степень гомологии последовательностей и сходства третичной структуры всех членов семейства указывает на близость их функций.

Задачи исследования. Биоинформатический поиск возможных общих микроРНК-регуляторов для фосфатаз CTDSP1, CTDSP2 и CTDSPL. Подтверждение предсказанных микроРНК количественным методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени.

Материалы и методы. Специально разработана оригинальная программа CrossHub [Krasnov G.S. et. al. CrossHub: a tool for multi-way analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) in the context of gene expression regulation mechanisms. *Nucleic Acids Res* 2016;44 (7):e62] для осуществления комплексного поиска возможных микроРНК-регуляторов генов семейства SCP-CTDSPL/1/2 и Rb1 — в случае немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ). Поиск основан на совместном анализе ко-экспрессии генов и микроРНК, а также возможных сайтов посадки микроРНК в 3'-UTR матричной РНК (мРНК). Для этого использовали 5 различных алгоритмов предсказания: TargetScan, DIANA microT, miSVR (miRanda), PicTar и базу данных экспериментально валидированных микроРНК-мишеней miRTaRBase. Для каждой базы рассчитан коэффициент информативности (на основе согласованности с данными по ко-экспрессии всех мРНК и микроРНК). Подтверждение предсказанных микроРНК осуществляли методом ПЦР в реальном времени на 28 парных образцах рака легкого.

Результаты. С помощью программы CrossHub предсказано участие кластера онкогенных микроРНК miR-183, -96, -182 в подавлении экспрессии генов CTDSPL/1/2. С помощью количественной ПЦР получено убедительное подтверждение предсказанного одновременного повышения уровней экспрессии всех 3 микроРНК в большинстве (82 %) образцов НМРЛ, наряду с падением экспрессии генов CTDSPL/1/2, и найдена их значимая отрицательная корреляция.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют об участии кластера miR-183, -96, -182 в регуляции активности белка Rb посредством инактивации всех 3 генов CTDSPL/1/2 при НМРЛ.

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

Анализ аллель-специфической экспрессии генов при гепатоцеллюлярной карциноме на основе данных экзомного и транскриптомного секвенирования

О.М. Кривцова^{1,2}, Е.Р. Набиева², Д.В. Виноградов^{2,3}, М.Д. Логачева^{2,3}, А.А. Пенин^{2,3}, Н.Л. Лазаревич^{1,2}

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

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

³ФГБУН «Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН», Москва

Введение. Аллель-специфическую экспрессию (АСЭ) генов связывают с развитием некоторых наследственных заболеваний, включая наследственные формы опухолей толстого кишечника, однако вопрос о механизмах АСЭ в опухолях и вкладе конкретных однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNP) в развитие опухолевого фенотипа недостаточно изучен. В литературе роль АСЭ в гепатоканцерогенезе практически не описана.

Задачи исследования. На основании данных экзомного и транскриптомного секвенирования парных образцов нормальной ткани и гепатоцеллюлярной карциномы (ГК) выявить гены, аллель-специфически экспрессирующиеся в опухолях (АСЭ-гены), и функционально значимые герминативные варианты.

Материалы и методы. Проведены идентификация SNP в данных экзомного и транскриптомного секвенирования 5 пациентов, аннотация АСЭ-генов и SNP на основе информации из открытых баз данных.

Результаты. Выявлены 582 уникальных дифференциально экспрессирующихся аллелей в 486 генах, включая аллели, характеризующиеся наличием общего паттерна экспрессии у нескольких пациентов, а также 56 предположительно патогенных редких SNP, встречающихся менее чем у 5 % особей в популяции. Среди АСЭ-генов широко представлены гены, относящиеся к категории GeneOntology "DNA binding", к сигнальному каскаду IGF-1 и являющиеся мишенями участвующих в канцерогенезе транскрипционных факторов TCF3/E47, MYC, MAZ и FOXO4, которые активированы в исследованных образцах ГК. Выявлена неравномерность распределения АСЭ-генов, существенная часть которых сконцентрирована в нескольких участках хромосом 1, 6, 16 и 19. Эта тенденция наиболее выражена в образцах ГК с внутрисеченочным метастазированием. Паттерн АСЭ в метастазах частично изменяется по сравнению с первичной опухолью, при этом его отличие от паттерна АСЭ в нормальной ткани сохраняется.

Выводы. Мы предполагаем, что АСЭ некоторых функционально значимых SNP может способствовать

формированию злокачественного фенотипа ГК. Анализ паттернов АСЭ в ГК позволяет предположить, что в основе процесса лежат эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов.

Работа частично поддержана субсидией Минобрнауки России (соглашение 14.607.21.0049, RFMEFI60714X0049).

Маркеры аномального метилирования ДНК при остром миелоидном лейкозе у детей

В.В. Руденко¹, С.А. Казакова², А.С. Танас¹,
В.С. Немировченко³, А.В. Попа³, Е.Б. Кузнецова²,
Д.В. Залетаев², В.В. Стрельников¹

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

²ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России, Москва;

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

Введение. Злокачественные новообразования характеризуются выраженной молекулярно-генетической гетерогенностью. Мажорные мутации или геномные перестройки описаны далеко не для всех типов опухолей, что затрудняет разработку диагностических и прогностических клинических тестов. В то же время существует класс молекулярно-генетических изменений, присущий всем злокачественным опухолям — аномальное метилирование геномной ДНК.

Задачи исследования. Разработка системы маркеров метилирования ДНК при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) у детей. Диагностический потенциал aberrантного метилирования может быть использован для идентификации подтипов ОМЛ, имеющих различную чувствительность к используемым терапевтическим режимам.

Материалы и методы. Наше исследование включает 53 образца костного мозга пациентов до лечения и после курсов химиотерапии, проведенных совместно с курсом деметилирующей терапии. Первичную идентификацию aberrантного метилирования ДНК осуществляли методом непредвзятого скрининга дифференциального метилирования генов, разработанным в рамках настоящего исследования. Частоту метилирования маркеров оценивали с использованием системы мультиплексных метилчувствительных полимеразных цепных реакций с внутренними контролями.

Результаты. Для оценки аномального метилирования была предложена система, состоящая из маркеров, принадлежащих промоторным участкам генов *CLDN7*, *CXCL14*, *DLK2*, *GSG1L*, *KHSRP*, *SOX8*, *TMEM176A/176B*. Маркеры метилирования определяли на участках рестрикции фермента BstHNI, поскольку наличие многих сайтов рестрикции данного фермента в пределах изучаемых локусов позволяет определить однородность метилирования CpG по всему региону. Частота мети-

лирования (в %) отобранных маркеров (частота метилирования маркера до лечения/после 1–2 курсов химиотерапии/после 4–5 курсов химиотерапии): *CLDN7* (32,0/56,5/0), *CXCL14* (96,0/90,9/0), *DLK2* (11,3/0/0), *EGFLAM* (20,0/13,6/0), *GSG1L* (8,0/4,6/0), *SOX8* (57,9/7,7/0), *TMEM176A/176B* (60,0/50,0/0). В работе была показана статистически значимая ассоциация между статусом метилирования гена *TMEM176A/176B* и вовлечением центральной нервной системы в патологический процесс у больных ОМЛ до лечения ($p = 0,0183$).

Выводы. Дифференциальное метилирование генов в образцах до и после лечения может свидетельствовать о клональной эволюции злокачественной трансформации. Исследование предоставляет технические возможности при профилировании эпигенетических изменений конкретного пациента, что может быть использовано для развития индивидуализированных подходов в терапии ОМЛ.

Микросателлитная нестабильность и потеря гетерозиготности в клетках увеальной меланомы

С.В. Саакян¹, А.Ю. Цыганков¹, А.Г. Амирян¹,
В.И. Логинов², А.М. Бурденный²

¹ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, Москва;

²ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»,
Москва

Введение. Увеальная меланома (УМ) — наиболее распространенная первичная внутриглазная опухоль у взрослого населения. Она характеризуется повышенной метастатической активностью в печень, что является фактором неблагоприятного исхода у 95 % пациентов вне зависимости от метода проведенного лечения. В различных международных исследованиях показана критическая роль в образовании геномной нестабильности и метастатической активности из-за потери гетерозиготности хромосом 1, 3 и 8, где роль моносомии хромосомы 3 наиболее значима.

Задачи исследования. Изучение потери гетерозиготности на хромосомах 1, 3 и 8 при УМ и их взаимосвязи с клинико-морфологическими характеристиками опухоли.

Материалы и методы. Анализ потерь гетерозиготности на хромосомах 1, 3 и 8 проводили на выборке из 38 гистологических препаратов, полученных от больных Центрального региона России. Все опухоли были гистологически подтверждены.

Результаты. При анализе потерь гетерозиготности на хромосоме 3 мы обнаружили полную моносомию в 8 (21 %) из 38 случаев. Кроме того, нами было показано, что потеря гетерозиготности выявляется также хотя бы в 1 из 11 исследованных локусов хромосомы 3 в 22 (57,9 %) из 38 случаев, в том числе в 5 (22,7 %) из 38 случаев.

случаях из 22 только в области FHIT (D3S4103-D3S1481, 3p14.2). Частота потерь гетерозиготности в локусе 1p36.22 составила 28,9 % (11/38), в локусах 8p12–p22 – 21 % (8/38). В 9 из 11 случаев с потерей гетерозиготности в локусе 1p36.21–22 мы также наблюдали потерю гетерозиготности на хромосоме 3 ($p = 0,03$). Также все случаи с потерей гетерозиготности на хромосоме 8 сопровождались аллельными потерями и на хромосоме 3 ($p = 0,018$). Выявлена высокая частота неблагоприятных клеточных типов УМ (смешанноклеточный и эпителиоидноклеточный) в образцах с полной моносомией хромосомы 3 по сравнению с образцами без потери гетерозиготности на хромосоме 3 (7/8 против 1/8; $p < 0,01$). Для группы пациентов с полной или частичной моносомией хромосомы 3 характерна значимо большая частота УМ цилиохориоидальной и иридоцилохориоидальной локализации (13/22 против 1/8; $p = 0,039$).

Выводы. Изучены частоты аллельных делеций в хромосомах 1, 3 и 8 в образцах УМ. Показана критическая роль изученных хромосомных aberrаций при УМ, что может быть использовано для определения прогноза течения заболевания у группы больных с УМ.

Роль метилирования CpG-островков генов-супрессоров опухолевого роста *RASSF1A* и *SEMA3B* при увеальной меланоме

С.В. Саакян¹, А.Ю. Цыганков¹, А.Г. Амирян¹,
В.И. Логинов², А.М. Бурденный²

¹ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, Москва;

²ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва

Введение. Увеальная меланома (УМ) — опухоль нейроэктодермального происхождения, развивающаяся из меланоцитов увеального тракта. УМ характеризуется повышенным метастазированием в печень, что сильно снижает эффективность лечения. В связи с этим возникает необходимость поиска молекулярно-генетических факторов риска развития УМ. Одним из таких факторов может быть аномальное метилирование генов-супрессоров опухолевого роста *RASSF1A* и *SEMA3B*.

Задачи исследования. Анализ частоты метилирования промоторных областей генов *RASSF1A* и *SEMA3B* и его связь с прогрессией УМ.

Материалы и методы. В исследование были включены 30 пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом УМ. Во всех случаях проведена энуклеация пораженного глаза. Метилирование промоторных регионов генов *RASSF1A* и *SEMA3B* исследовали методом метил-чувствительного рестрикционного анализа.

Результаты. Высокая частота метилирования промоторного CpG-островка гена *RASSF1A* в образцах

опухоли по сравнению с интактной тканью хориоидеи, статистически значима (26,7 % против 3,3 %; $p = 0,026$). Показана статистически значимая ассоциация метилирования промоторного района гена *RASSF1A* с развитием наиболее благоприятного, веретенноклеточного гистологического типа УМ ($p = 0,049$), меньшей высотой опухоли ($p = 0,018$) и снижением акустической плотности в области верхушки опухоли по данным ультразвукового дуплексного сканирования ($p = 0,05$). Метилирование промоторного района гена *SEMA3B* ни в одном из исследуемых образцов не выявлено.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о важной роли метилирования промоторного района гена *RASSF1A* как фактора благоприятного прогноза развития УМ. Роль метилирования промоторного района гена *SEMA3B* в развитии УМ не подтверждена.

Молекулярные маркеры прогрессирования рака мочевого пузыря

М.П. Смаль¹, А.И. Ролевич², Т.И. Набебина²,
С.А. Красный², Р.И. Гончарова¹

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», агрогородок Лесной, Минский район

Введение. Рак мочевого пузыря (РМП) занимает лидирующее место среди онкологических заболеваний мочевыводящего тракта. На момент постановки диагноза у большинства (75–85 %) пациентов выявляются немышечно-инвазивные опухоли, составляющие гетерогенную группу злокачественных новообразований с различным риском рецидивирования и прогрессирования. Необходимым условием для выбора оптимальной тактики лечения является использование адекватных показателей для точного определения вероятности прогрессирования уротелиальной карциномы в мышечно-инвазивную форму. С этой целью в настоящей работе осуществлен поиск молекулярных маркеров, обладающих прогностической ценностью в отношении прогрессирования заболевания.

Материалы и методы. В исследование были включены 148 пациентов с раком мочевого пузыря без мышечной инвазии, на опухолевом материале которых проводили анализ мутационной изменчивости генов *FGFR3*, *HRAS*, *KRAS*, *TP53* и статуса метилирования промоторных областей генов *RUNX3* и *TBX4*.

Результаты. Установлена статистически значимая ассоциация мутаций генов *FGFR3* и *HRAS* с высокодифференцированными уротелиальными карциномами небольших размеров, тогда как молекулярные изменения генов *TP53*, *RUNX3* и *TBX4* были связаны с агрессивным опухолевым фенотипом. Моновариантный регрессионный анализ пропорциональных рисков

Кокса выявил потенциально значимые факторы прогноза ($p < 0,1$) для включения их в мультивариантный анализ. В многомерной модели с пошаговым исключением выявлены 3 показателя, независимо влияющие на риск прогрессирования опухоли: присутствие мутации гена *TP53* (отношение рисков (ОР) 15,88; 95 % доверительный интервал (ДИ) 3,12–80,84; $p = 0,001$), гиперметилирование генов *RUNX3* и *TBX4* (ОР 10,17; 95 % ДИ 1,93–53,59; $p = 0,006$), наличие предшествующих рецидивов (ОР 8,79; 95 % ДИ 1,98–38,92; $p = 0,004$). В случае молекулярных нарушений всех 3 генов 3-летняя выживаемость до прогрессирования составила 40 %, при их отсутствии – 97,7 % ($p < 0,001$). Показатель ОР при совместном наличии 3 неблагоприятных молекулярных показателей достиг 199,9 (95 % ДИ 20,02–1995,86; $p < 0,001$).

Выводы. Таким образом, анализ мутационной изменчивости гена *TP53* и эпигенетической изменчивости генов *RUNX3* и *TBX4* позволяет выделить группу пациентов с высоким риском прогрессирования заболевания, для которых рекомендуется выполнение ранней цистэктомии.

Гиперметилированные гены микроРНК в злокачественных опухолях яичников

Е.А. Филиппова¹, В.И. Логинов¹, А.М. Бурденный¹,
И.В. Пронина^{1,2}, А.В. Карпунин², Т.П. Казубская³,
Н.Е. Кушлинский³, Э.А. Брага^{1,2}

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

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва;

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

Введение. Метилирование промоторных CpG-островков генов микроРНК наблюдается чаще, чем метилирование белоккодирующих генов, и принципиально влияет на регуляцию экспрессии как самих генов микроРНК, так и их генов-мишеней, и процессов, в которых они участвуют.

Задачи исследования. Определить частоты метилирования генов микроРНК при раке яичников, идентифицировать новые гиперметилированные при раке яичников гены микроРНК.

Материалы и методы. Изучено метилирование 20 опухолеассоциированных генов микроРНК на представительной выборке парных (опухоль/условная норма) образцов рака яичников (62 случая) методом бисульфитной конверсии ДНК с последующей метил-специфичной полимеразной цепной реакцией. Изучено изменение уровней экспрессии группы гиперметилированных генов микроРНК в 20 образцах рака яичников методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием лицензионных наборов Applied Biosystems (США).

Результаты. Для ряда генов (например *MIR-129-2*, *MIR-193a* и *MIR-125b-1*) изменение уровня метилирования показано впервые. Наибольшая частота (42–58 %) метилирования установлена для генов: *MIR-34b/c*, *MIR-9-1*, *MIR-129-2*, *MIR-124-3*, *MIR-125b-1*, *MIR-193a*. Показана связь гиперметилирования генов микроРНК с понижением их экспрессии и прогрессированием рака.

Выводы. Гены микроРНК, гиперметилированные в опухолях с высокой частотой, можно использовать как диагностические и прогностические маркеры опухолей яичников и перспективное противоопухолевое средство для подавления генов-мишеней с онкогенными свойствами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-15-00654).

Исследование экзосомальных микроРНК в плазме крови у пациентов с меланомой, в том числе находящихся в стойкой ремиссии

Д.К. Чебанов¹, А.А. Абрамов², И.Н. Михайлова³

¹Медицинский институт ФГАОУ ВО

«Российский университет дружбы народов», Москва;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва;

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

Введение. Экзосомы – частицы размером 30–100 нм, состоящие из билипидной оболочки и содержащие матричную РНК, микроРНК и белки, которые выполняют, таким образом, функции информационного межклеточного взаимодействия с плазматическими мембранами других клеток. При онкологическом заболевании имеет место значительное увеличение количества экзосом в крови. Поэтому микроРНК, переносимые экзосомами, могут оказаться значительно более специфичными применительно к исследованию закономерностей онкологических заболеваний. Из литературы были подобраны следующие 10 микроРНК: let-7a, let-7b, miR-19a, -106a, -149, -155, -199a, -214, -221 и -222, специфичные для меланом.

Задачи исследования. Поиск эпигенетических маркеров, предназначенных для раннего выявления меланомы, определения риска инвазии, мониторинга эффекта проводимой терапии в целях подбора оптимальной схемы лечения. Исследовали профили микроРНК, содержащихся в экзосомах, выделенных из плазмы крови. В работу взяли 25 образцов крови: 13 – от пациентов с меланомой, 12 – от больных, у которых в результате проводимого лечения исчезли признаки заболевания, что подтверждается в течение периода наблюдения 5–15 лет.

Материалы и методы. Кровь брали в объеме 1 мл в пробирку с ЭДТА, и проводили центрифугирование

при 5000 оборотах в течение 5 мин на центрифуге Eppendorf MiniSpin. Выделение экзосом из плазмы проводили по стандартному протоколу на наборе miRCURY Exosome Isolation Kit – Serum and Plasma, выделяли микроРНК на наборе miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids, выделенную тотальную микроРНК сразу же подвергали обратной транскрипции на наборе Universal cDNA Synthesis Kit II. Полученный материал замораживали до температуры -20°C или брали для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени на наборе ExiLent SYBR Green Master Mix Kit с праймерами на специфические микроРНК.

Результаты. Обнаружены значимые различия уровней микроРНК let-7a, let-7b, miR-106a и -199a в 2 сравниваемых группах. Средние значения уровней микроРНК для больных были 323, 873, 750 и 84 тыс. копий/мкл соответственно, для выздоровевших – 422, 1544, 1176 и 14 тыс. копий/мкл соответственно.

Выводы. Суммарный показатель по 4 микроРНК позволяет дифференцировать пациентов с меланомой от выздоровевших с 70 % чувствительностью и 90 % специфичностью, что может быть использовано для оценки эффективности лечения.

Молекулярно-генетические нарушения генов MAP-киназного каскада и ангиогенез немелкоклеточного рака легкого

А.Н. Шаяк¹, М.Н. Шепетько², Э.В. Крупнова¹,
Е.П. Михаленко¹, Н.В. Чеботарёва¹

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск;

²УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск

Введение. Важным процессом при развитии любых злокачественных новообразований, в том числе немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), является ангиогенез. Ключевую роль в регуляции ангиогенеза НМРЛ играют мутации в генах, кодирующих основные компоненты тирозинкиназных путей (EGFR, KRAS), полиморфизмы генов фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) и его рецептора VEGFR-2 (KDR), а также матриксных металло-

протеиназ (MMP2, MMP9). Поэтому целью данного исследования стало выявление ассоциаций мутаций генов *EGFR*, *KRAS* и полиморфизмов генов *VEGF*, *KDR*, *MMP2*, *MMP9* с размером первичной опухоли, регионарным метастазированием и стадией заболевания.

Материалы и методы. В исследование были включены 220 пациентов с диагнозом плоскоклеточного рака легкого (ПКРЛ) ($n = 124$) и аденокарциномы (АК) ($n = 96$). Исследованы мутации экзонов 19 и 21 гена *EGFR*, экзона 2 гена *KRAS* и полиморфизмы генов *VEGF* (rs699947, rs2010963, rs3025039), *KDR* (rs1870377), *MMP2* (rs2285053, rs243866), *MMP9* (rs17576). Статистическую обработку материала проводили с использованием онлайн-программы SNPStats.

Результаты. Размер первичной опухоли и агрессивность течения НМРЛ зависят от конкретного полиморфного варианта гена *VEGF* (rs699947) и пола пациента. Среди женщин генотип -634GC гена *VEGF* (rs2010963) в 6 раз достоверно чаще встречается у пациенток с АК, чем с ПКРЛ.

Влияние полиморфизма rs1870377 гена *KDR* на развитие НМРЛ не выявлено, но при рассмотрении этого полиморфизма в комбинации с полиморфными вариантами гена *VEGF* было показано, что комбинация генотипов -2578CAVEGF/1719TTKDR достоверно чаще встречается у пациентов с меньшим размером первичной опухоли (относительный риск (ОР) 0,32; 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,16–0,63; $p = 0,0015$), а комбинация -2578CAVEGF/1719TAKDR достоверно в 3 раза чаще встречается у пациентов с ПКРЛ, чем с АК (отношение шансов (odds ratio, OR) 3,49; 95 % ДИ 1,13–10,74; $p = 0,039$).

В развитии АК важную роль играет сигнальный путь RAS/RAF/MAPK. У 22,4 % пациентов с АК данный путь гиперактивирован вследствие мутаций в экзонах 19 и 21 гена *EGFR* или в экзоне 2 гена *KRAS*, при этом мутации гена *EGFR* выявлены только у женщин, а мутации гена *KRAS* – только у мужчин.

Анализ ассоциации полиморфных вариантов гена *MMP2* (rs243866) со стадией заболевания показал, что у носителей генотипа -1575GG достоверно реже наблюдается IV стадия (ОР 0,23; 95 % ДИ 0,07–0,83; $p = 0,039$), а аллель А достоверно чаще встречается у пациентов со II (ОР 2,28; 95 % ДИ 1,03–5,03; $p = 0,04$) и IV (ОР 4,27; 95 % ДИ 1,21–15,12; $p = 0,018$) стадиями.

Тезисы

Популяционные особенности аденокарциномы легкого. Начальный этап исследования

А.Н. Абдихакимов, Е.А. Ли, А.А. Холиков, У.К. Косимов

Ташкентский областной онкологический диспансер, Ташкент

Введение. По данным российских исследований, аденокарцинома легкого встречается у 30–35 % европейского населения и у 70–75 % азиатского. Среди гистологических форм немелкоклеточного рака легкого в Республике Узбекистан лидирует плоскоклеточный рак, что несомненно связано с курением. В последние годы отмечается постепенное увеличение числа случаев аденокарциномы (до 1999 г. на 10 случаев плоскоклеточного рака приходился 1 случай аденокарциномы, к 2015 г. — 3 случая). Новые случаи аденокарциномы легких наблюдаются среди женщин.

Задачи исследования. Изучение генетических характеристик аденокарциномы легкого регионов Республики Узбекистан.

Материалы и методы. За основу были взяты следующие критерии: пол, возраст, расовая принадлежность, стадия заболевания на момент обращения больного к врачу-онкологу, метод лечебного воздействия, связь с курением, условия проживания. В период с 2010 по 2015 г. удалось собрать базу данных на 100 пациентов.

Результаты. При применении различных схем химиотерапии на больных аденокарциномой легких III–IV стадии при использовании схемы доцетаксел + карбоплатин получен более высокий ответ на лечение, а также увеличение показателя общей выживаемости.

Выводы. Полученные результаты начального этапа популяционного исследования аденокарциномы легкого показали клиническую агрессивность этой разновидности немелкоклеточного рака легкого. Основная часть больных при первичном обращении имеют запущенную или распространенную стадию заболевания. Шансы на выживаемость у этих больных очень низкие. Ответ на стандартную химиотерапию оставляет желать лучшего. Возможно, для повышения выживаемости необходимо в будущем проведение более глубоких молекулярно-генетических исследований с последующим применением «целевых» лекарственных препаратов.

Поиск ассоциации полиморфных локусов *XRCC1*, *XPA*, *XPB*, *VCAM1*, *PECAM1*, *ICAM1* с риском развития мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря

С.М. Измайлова

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа

Введение. Значительную роль в патогенезе злокачественных новообразований играют специфические факторы роста клеток и гены системы репарации ДНК.

Задачи исследования. Провести анализ ассоциации полиморфных локусов генов *XRCC1* (rs25489 и rs25487), *XPA* (rs1800975), *XPB* (rs13181), *VCAM1* (rs3917010), *PECAM1* (rs281865545), *ICAM1* (rs5498) с риском развития мышечно-неинвазивного рака мочевого пузыря (МНРМП).

Материалы и методы. Проведен молекулярно-генетический анализ образцов ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической венозной крови 128 больных МНРМП. Контрольную группу составили 286 человек без хронических заболеваний мочеполовой системы в анамнезе. Полиморфные локусы генов анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с полиморфизмом длины рестрикционных фрагментов и аллель-специфичной ПЦР. Математическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов статистических программ SNPStats.

Результаты. При анализе выборки больных МНРМП была показана ассоциация rs3917010 гена *VCAM1* с риском развития опухоли в модели сверхдоминирования (отношение шансов (odds ratio, OR) 1,72; $p = 0,04$). Выявлена ассоциация с МНРМП (OR 2,91; $p < 0,0001$) в доминантной модели локуса rs5498 гена *ICAM1*. Полиморфизм rs25489 гена *XRCC1* вносит вклад в развитие МНРМП, статистически значимые результаты были получены для аддитивной модели (OR 2,01; 95 % доверительный интервал 1,29–3,13; $p = 0,0024$).

Статистически значимых ассоциаций развития МНРМП с полиморфными локусами генов *PECAM1* (rs281865545), *XRCC1* (rs25487), *XPA* (rs1800975), *XPB* (rs13181) не выявлено.

Выводы. Таким образом, можно предположить, что присутствие выявленных полиморфных маркеров повышает риск развития МНРМП.

Генетические аспекты прогнозирования течения почечно-клеточного рака

М.И. Коган¹, З.М. Ахохов¹, А.А. Гусев¹, Д.Г. Пасечник²

¹Кафедра урологии и репродуктивного здоровья человека с курсом детской урологии-андрологии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет», Ростов-на-Дону;

²отделение патологической анатомии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Артериальная гипертензия — один из факторов риска развития рака почки (РП). Кроме этого, способствуя прогрессированию хронической болезни почек, артериальная гипертензия снижает общую выживаемость у больных. Гуморальные факторы (ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС), оксид азота (NO)), участвующие в регуляции артериального давления, также могут влиять на ряд ключевых свойств опухоли (пролиферация, ангиогенез, инвазия), обеспечивая ее прогрессию.

Задачи исследования. Определение эффектов однонуклеотидных полиморфизмов (single-nucleotide polymorphism, SNP) в 9 генах, участвующих в регуляции сосудистого тонуса и артериального давления, на развитие и клинико-патологические особенности РП.

Материалы и методы. Из образцов крови 97 пациентов, перенесших нефрэктомия по поводу РП, была выделена ДНК с последующей идентификацией SNPs rs699 и rs4762 в гене *AGT*, rs5186 в гене *AGTR1*, rs1403543 в гене *AGTR2*, rs179998 в гене *CYP11B2*, rs4961 в гене *ADD1*, rs5443 в гене *GNB3*, rs1799983 и rs2070744 в гене *NOS3* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. В качестве контроля частоты распространения вариантов аллелей в популяции использовали global minor allele frequency (MAF) из базы проекта HapMap. Оценку значимости различий проводили с помощью отношения шансов (odds ratio, OR), χ^2 -Пирсона, при количестве наблюдений < 5 — точного критерия Фишера.

Результаты. Установлено, что у больных РП чаще выявлялись SNPs AGT_rs699, AGTR1_rs5186, NOS3_rs1799983. Значимая связь между РП в сочетании с артериальной гипертензией отмечена при AGTR1_rs5186 ($p = 0,026$), GNB3_rs5443 ($p = 0,04$) и NOS3_rs2070744 ($p = 0,019$). Отмечены ассоциации между степенью дифференцировки и SNP AGTR2_rs1403543 ($p = 0,041$), наличием очагов коагуляционного некроза и саркоматоидной трансформации и SNP AGTR2_rs1403543 ($p = 0,014$), AGT_rs699 ($p = 0,041$). Метастатические формы РП ассоциировались с GNB3_rs5443 ($p = 0,03$). Наиболее часто (70,6 %) у пациентов с РП встречалось сочетание от 4 до 6 SNP. При анализе сочетаний SNPs обнаружено, что при метастатическом РП и у пациен-

тов с показателями скорости клубочковой фильтрации < 90 мл/мин/1,73 м² чаще встречались комбинации AGTR1_rs5186 и ADD1_rs4961 (OR 5,00; 95 % доверительный интервал (ДИ) 4,22–5,78; $p = 0,04$ и OR 5,64; 95 % ДИ 4,78–6,59; $p = 0,046$ соответственно), GNB3_rs5443 и AGTR2_rs1403543 (OR 5,02; 95 % ДИ 4,43–5,62; $p = 0,007$ и OR 7,4; 95 % ДИ 6,55–8,25; $p = 0,022$ соответственно).

Выводы. Наши результаты подтверждают, что компоненты РААС и NO могут влиять на развитие и прогрессирование РП. Выявление SNP генов, участвующих в регуляции артериального давления, может использоваться в оценке прогноза течения РП и рисков развития и прогрессирования хронической болезни почек у этой категории больных.

Полиморфизмы генов *TNF-238G>A* и *HER2* Ile655Val повышают риск заболевания раком молочной железы

Т.Ф. Маливанова, Н.Н. Мазуренко

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

Введение. В канцерогенезе эпителия молочной железы важную роль играют воспаление, гормональные и ростовые факторы. Фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF), воспалительный медиатор иммунного ответа, также способен индуцировать как апоптоз, так и пролиферацию опухолевых клеток. К факторам, вызывающим пролиферацию, относят рецепторы эстрогенов и HER2, экспрессионный профиль которых лежит в основе молекулярной классификации рака молочной железы (РМЖ). Гены *TNF*, *ESR1* и *HER2* имеют сайты однонуклеотидных замен, приводящих к функциональному изменению уровня транскрипции или активности их белковых продуктов. Эти гены являются низкопенетрантными, и до сих пор не вполне понятно, каким образом они влияют на предрасположенность к РМЖ.

Задачи исследования. Оценка влияния функциональных полиморфизмов генов *TNF*, *HER2* и *ESR1* на риск развития РМЖ.

Материалы и методы. Исследовали геномную ДНК от 166 первичных больных РМЖ и 134 женщин контрольной группы. Методами сайт-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР с рестрикцией амплифицированного фрагмента определяли полиморфизмы генов *TNF-238G>A* и -308G>A, *HER2* Ile655Val и *ESR1* 397C>T. Для оценки риска РМЖ рассчитывали отношение шансов (odds ratio, OR [99 % доверительный интервал (ДИ)]).

Результаты. В общей группе не выявлено индивидуального влияния изученных полиморфизмов на риск

развития РМЖ (для -238*TNF* OR = 0,68 [0,29; 1,62]; для -308*TNF* OR = 1,23 [0,84; 1,81]; для П6655Val *HER2* OR = 1,29 [0,79; 2,11]; для 397*ESR1* OR = 1,94 [0,89; 4,26]). При анализе комбинированного действия полиморфизмов было обнаружено, что для носителей аллеля А -238*TNF* полиморфизм *HER2* П6655Val значительно увеличивал риск развития РМЖ ($p < 0,01$; OR = 6,44 [1,15; 36,04]). Следует отметить, что в исследованной группе больных РМЖ полиморфизм *TNF* -238G>А ассоциировался с низким уровнем *TNF* в сыворотке крови. Для комбинации полиморфизмов *TNF* -308G>А и *ESR1* 397C>Т отмечена тенденция к повышению риска развития РМЖ (OR = 2,5 [0,99; 6,33]), что требует дальнейшего изучения.

Выводы. Впервые обнаружено комбинированное действие *TNF* -238G>А и *HER2* П6655Val на риск развития РМЖ. По-видимому, полиморфизмы гена *TNF* способны создавать определенный физиологический контекст, в условиях которого функциональные полиморфизмы других генов могут проявлять свой канцерогенный потенциал.

Экспрессия генов, ответственных за индукцию внешнего пути апоптоза, в клетках крови больных хроническим лимфоидным лейкозом

В.А. Мисюрин¹, С.Г. Захаров², Т.А. Митина²,
Е.В. Катаева², Ю.П. Финашутин¹, Л.А. Кесаева¹,
Н.А. Лыжко¹, Ю.П. Финашутин¹, В.В. Тихонова¹,
А.К. Голенков², А.В. Мисюрин¹

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

²ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва

Введение. Самым известным лекарственным моноклональным антителом для терапии хронического лимфоидного лейкоза (ХЛЛ) является ритуксимаб. Часто его применяют совместно с другими химиопрепаратами. Мы предполагаем, что для успешной терапии данного заболевания к известной комбинации ритуксимаб + химиопрепараты можно добавить терапевтические антитела-агонисты основных рецепторов внешнего пути апоптоза.

Задачи исследования. Сравнение уровней экспрессии генов внешнего пути апоптоза *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2* и *TRAIL* у больных В-клеточным ХЛЛ до начала лечения и во время проведения терапии по схеме ритуксимаб + химиопрепараты.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 33 пациента (28 мужчин, 5 женщин). Медиана возраста составила 60 лет. Пациенты с первично выявленной формой В-клеточным ХЛЛ получали курсы полихимиотерапии RFC (ритуксимаб + флударабин + циклофосфамид), пациенты с резистентной и реци-

дивной формами В-клеточного ХЛЛ – RB (ритуксимаб + бендамустин). Уровни экспрессии основных проапоптотических генов *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2* и *TRAIL* определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Количественную оценку экспрессии проводили относительно экспрессии гена *ABL*. Анализ данных выполняли в программе Statistica 10. Для исследования динамики экспрессии генов применяли кокс-регрессионный анализ.

Результаты. Уровень экспрессии генов внешнего пути апоптоза не зависел от стадии заболевания. Медиана уровня экспрессии генов у пациентов всех групп в начале заболевания составляла для *DR3* – 25 %, *DR4/5* – 246 %, *FAS* – 746 %, *TNFR2* – 1020 % и *TRAIL* – 1020 %. Вне зависимости от проводимого курса химиотерапии в целом происходило повышение уровня экспрессии генов до следующих значений медианы: *DR3* – 27 %, *DR4/5* – 258 %, *FAS* – 801 %, *TNFR2* – 984 % и *TRAIL* – 1056 %.

Выводы. Наши результаты свидетельствуют о том, что применение моноклональных антител-агонистов рецепторов внешнего пути апоптоза при В-клеточного ХЛЛ возможно, так как уровень экспрессии генов, кодирующих эти рецепторы, во время проведения химиотерапии увеличивается.

Сравнительный анализ эпигенетических нарушений генов *AURKA* и *TP53* у больных солитарным раком желудка и пациентов с первично-множественными злокачественными образованиями

Г.Ф. Михайлова, В.В. Цепенко, Т.Г. Шкаврова,
Г.О. Рухадзе, В.Ю. Скоропад

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

Введение. Репликация ДНК является жестко регулируемым процессом, синхронизированным для большей части гомологичных локусов в геноме. В нормальных клетках этот процесс очень стабилен, в то время как опухолевые клетки характеризуются асинхронной репликацией тех локусов, которые в нормальном состоянии реплицируются синхронно. Это, в свою очередь, приводит к дестабилизации генома и нарушению экспрессии генов. Отметим, что в случае солидных опухолей нарушение синхронности репликации может наблюдаться не только в клетках опухолевой ткани, но и в нормальных клетках, например в лимфоцитах периферической крови.

Задачи исследования. Сравнительный анализ частоты лимфоцитов с асинхронной репликацией генов *AURKA* и *TP53* у больных солитарным раком желудка

(СРЖ) и пациентов с первично-множественными злокачественными образованиями (ПМЗО).

Материалы и методы. Работу проводили на образцах ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови методом интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH). Группа с ПМЗО была сформирована из больных, имевших в анамнезе вторые опухоли наряду с раком желудка. В группах больных СРЖ и пациентов с ПМЗО были обследованы по 19 лиц соответственно. В контрольную группу ($n = 10$) вошли здоровые доноры, не имеющие опухолевой патологии. В работе использовали коммерческие молекулярные ДНК-зонды для генов *AURKA* и *TP53* (Vysis, США и Kreatech Diagnostic, Нидерланды).

Результаты. Частота встречаемости лимфоцитов с асинхронной репликацией (ЛАР) в контрольной группе составила $18,0 \pm 1,0$ % для гена *AURKA* и $15,6 \pm 0,9$ % для гена *TP53*. В группе больных СРЖ частота ЛАР составила $29,3 \pm 1,7$ % для гена *AURKA* и $27,8 \pm 1,6$ % для гена *TP53*, в группе больных с ПМЗО — $40,0 \pm 1,1$ и $32,2 \pm 1,1$ % для генов *AURKA* и *TP53* соответственно. Установлено, что группы пациентов с СРЖ и ПМЗО имели достоверно повышенный уровень ЛАР по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$) по обоим исследованным генам. Кроме этого, наблюдались достоверные различия по частоте ЛАР по обоим генам между группами СРЖ и ПМЗО. Группа больных с ПМЗО имела более высокую частоту ЛАР по сравнению с группой больных СРЖ ($p < 0,05$).

Выводы. Таким образом, можно предположить о том, что увеличение частоты ЛАР у онкологических больных по сравнению с группой контроля свидетельствует о повышенной геномной нестабильности, а более высокая частота ЛАР в группе пациентов с ПМЗО по сравнению с больными СРЖ может быть показателем и возможным предиктором второй опухоли.

Типы мутаций гена *BRCA1* как фактор развития рака молочной железы у женщин репродуктивного возраста

Т.Т. Мукаддас

Ташкентский областной онкологический диспансер,
Ташкент

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) является на сегодняшний день одним из наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований у женщин, занимая 1-е место в структуре онкологической заболеваемости Республики Узбекистан.

Задачи исследования. Изучение риска развития РМЖ при генетических мутациях генов *BRCA1* или *BRCA2* у женщин узбекской популяции. Определение вклада и места мутаций генов *BRCA1* или *BRCA2* в развитии ранних и семейных форм РМЖ в Республике Узбекистан.

Материалы и методы. В нашем исследовании принимали участие 100 женщин с гистологически верифицированным РМЖ. Из них 59 женщин репродуктивного возраста, которым с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием SYBR Green I проводили анализ ДНК крови. Все пациентки имели раннюю, семейную либо первично-множественную форму РМЖ с наличием мутаций 5382Ins_C, 4153del_A, 185del_AG в гене *BRCA1*, а также 6174del_T в гене *BRCA2*.

Результаты. Из 59 пациенток 3 (5,08 %) оказались носителями гетерозиготной мутации 5382Ins_C. Представленные данные подтверждают вклад мутации 5382Ins_C гена *BRCA1* в развитии РМЖ у женщин узбекской популяции.

Выводы. С учетом высокого риска заболевания РМЖ у носительниц мутации гена *BRCA1* является целесообразным включение тестирования мутации 5382Ins_C в скрининговые программы по выявлению ранних форм и профилактики РМЖ в Республике Узбекистан.

Характеристика соматических генетических изменений аденокарциномы легкого в процессе ее прогрессии от стадии *in situ* до инвазивного рака

А.Ф. Мукерия, В.А. Драудин-Крыленко, М.В. Гаас,
Н.Д. Плытник, Д.Г. Заридзе

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

Изучение различных соматических генетических изменений и клональной эволюции в зависимости от степени злокачественности опухоли, как возможных маркеров степени ее прогрессии, проводилось на основании полноэкзомного секвенирования 19 парных образцов (ткань + кровь), полученных от пациентов с диагнозом бронхоальвеолярного рака, находившихся на лечении в нескольких крупных московских клиниках. Согласно новой международной классификации аденокарцином легкого, разработанной в 2011 г. (IASLC/ATS/ERS, 2011), аденокарцинома, ранее определяемая как бронхоальвеолярный рак, в настоящее время подразделяется на: преинвазивную аденокарциному *in situ*, минимально инвазивную аденокарциному, инвазивную немущинозную аденокарциному и инвазивную муцинозную аденокарциному. С учетом данной классификации был выявлен ряд новых соматических мутаций, ранее не указанных в Атласе генома злокачественных опухолей (The cancer genome atlas, TCGA). Отмечена более высокая частота встречаемости опухолей с мутацией, вызванной активностью белков APOBEC (73 % против 58 % TCGA), в то время как му-

тации KRAS в исследованных образцах встречались гораздо реже по сравнению с данными TCGA (5 % против 32 % TCGA), а частота мутаций сплайсинговых РНК генов, RBM10 и U2AF1, была гораздо выше, чем в TCGA (37 % против 11 % TCGA). Каких-либо мутагенных или соматических признаков, специфичных для аденокарциномы *in situ* и минимально инвазивной аденокарциномы, не обнаружено. Инвазивные типы аденокарцином отличаются от *in situ* и минимально инвазивного типа только частотой клонов и их разнообразием. Таким образом, единственным отличием между инвазивными типами аденокарцином и *in situ* и минимально инвазивными опухолями является клонная эволюция, т. е. более высокая частота клонов и их высокая вариабельность. Огромное разнообразие субклонов свидетельствует об активации процессов клональной эволюции в процессе прогрессии опухоли. В дальнейшем необходимо более подробно изучить различные клональные варианты опухоли на разных стадиях ее прогрессии. Эта информация может лечь в основу разработки прогностических маркеров, а впоследствии и выбора индивидуализированной терапии.

Анализ ассоциации метилирования генов APC, MLH1 и RASSF1A с риском развития колоректального рака

А.В. Перфильева¹, К.Б. Джантаева¹, О.А. Иксан¹,
С.А. Касимуратова¹, Е.Б. Кузовлева¹, Г.С. Жунусовна¹,
Э.М. Хусаинова¹, Б.О. Бекманов¹, Г.А. Афонин²,
Л.Б. Джансугурова¹

¹Институт общей генетики и цитологии КН МОН РК, Алматы;

²Казахский национальный медицинский университет
им. С.Д. Асфендиярова, Алматинский онкологический центр,
Алматы

Введение. В Республике Казахстан колоректальный рак (КРР) занимает 4-е место в структуре заболеваемости среди всех онкопатологий и 3-е место в структуре смертности. Важнейшим условием успешного лечения КРР является обнаружение опухолевого процесса на ранних стадиях. Диагностическое и прогностическое значение в решении этой проблемы может иметь эпигенетическое метилирование ключевых генов колоректального канцерогенеза.

Задачи исследования. Изучение ассоциации статуса метилирования генов APC, MLH1 и участвующих в регуляции клеточного цикла и апоптозе клеток с риском развития КРР.

Материалы и методы. Всего для исследования было собрано 50 образцов опухолевой ткани больных спорадическим КРР, из них у 16 пациентов одновременно с биопсией опухолевой ткани взяты образцы периферической непораженной ткани кишечника и у 26 — периферическая кровь. Для контрольной группы были отобраны образцы периферической крови

30 условно здоровых лиц. ДНК из клинического материала выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Для определения метилирования промоторной области генов был использован метод метилчувствительной и метилспецифичной полимеразной цепной реакции.

Результаты. Частота метилирования промотора 1A генов APC и RASSF1A в образцах опухолевых тканей больных КРР составила 4 и 10 % соответственно. В образцах непораженных тканей кишечника от онкологических больных, в периферической крови от онкологических больных и от условно здоровых лиц контрольной группы метилирование данных генов не обнаружено. Частота метилирования гена MLH1 в образцах опухолевой ткани больных КРР составила 30,0 %, в образцах гистологически нормальной периферической ткани кишки — 12,5 %, в периферической крови больных КРР — 4,0 %.

Выводы. Диагностические характеристики теста на метилирование промоторной последовательности генов APC и RASSF1A в ткани кишечника для выявления КРР следующие: чувствительность — 4 и 10 % соответственно, специфичность — 100 % для обоих генов. Чувствительность теста на метилирование промоторной последовательности гена MLH1 в ткани кишечника и периферической крови для диагностики КРР составила 30,00 и 3,85 %, специфичность — 87,5 и 100 % соответственно. Предварительные результаты говорят о высокой специфичности тестов на метилирование генов APC и RASSF1A в ткани кишечника, гена MLH1 — в ткани кишечника и периферической крови для диагностики КРР. Предполагается дальнейший сбор клинического материала и увеличение объема выборок для продолжения исследования роли эпигенетических нарушений данных генов в развитии КРР.

Гиперметилированные гены микроРНК и их новые потенциальные мишени при раке молочной железы

И.В. Пронина^{1,2}, А.М. Бурденный¹, В.И. Логинов¹,
Е.А. Филиппова¹, Т.П. Казубская³, Н.Е. Кушлинский³,
А.В. Карпунин², Э.А. Брага^{1,2}

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

²ФГБУ «Медико-генетический научный центр», Москва;
³ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Метилирование промоторных CpG-островков и взаимодействие микроРНК с матричной РНК (мРНК) относятся к важнейшим эпигенетическим механизмам регуляции генов и сигнальных путей в опухолях.

Задачи исследования. Анализ роли метилирования в регуляции экспрессии 13 генов микроРНК (MIR-124-1, -125b-1, -127, -132, -137, -148a, -191, -193a, -203, -212, -34b, -75, -9-3) и поиск их новых мишеней.

Материалы и методы. Применены методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и метил-специфичная ПЦР. Использована выборка из 58 парных образцов рака молочной железы (РМЖ).

Результаты. Впервые показана высокая частота гиперметилирования 5 генов микроРНК *MIR-124-1*, *-125b-1*, *-127*, *-132*, *-193a* и гипометилирование *MIR-191* при РМЖ. Для 12 генов микроРНК (за исключением *MIR-212*) выявлена значимая корреляция уровней экспрессии и метилирования. В целях изучения новых функций микроРНК проведен корреляционный анализ между уровнями экспрессии 13 микроРНК и 5 опухолеассоциированных генов (*RASSF1(A)*, *CHL1*, *APAF1*, *DAPK1*, *BCL2*), которые были предсказаны в качестве мишеней с помощью алгоритмов miRWalk 2.0. Значимая отрицательная корреляция показана для следующих пар микроРНК—мРНК: miR-127-5p и *DAPK1*, miR-375 и *RASSF1(A)*, miR-124-3p и *BCL2*. Кроме этого, впервые показана ассоциация гиперметилирования генов *MIR-127* и *MIR-125b-1* с прогрессией РМЖ, включая метастазирование.

Выводы. Таким образом, наши результаты установили значение метилирования в дерегуляции 12 генов микроРНК при РМЖ, позволили предположить новые функциональные пары микроРНК—мРНК и гиперметилирование генов *MIR-127* и *MIR-125b-1* в качестве потенциальных биомаркеров метастазирования РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-15-00654).

Влияние чувствительности к андрогену на профили экспрессии микроРНК в клетках рака предстательной железы

Д.А. Чеботарев, М.Г. Тютякина

ФГБУН «Институт аридных зон Южного научного центра РАН», Ростов-на-Дону

Введение. Рак предстательной железы остается одним из самых распространенных типов онкологических заболеваний в мире. Снижение уровня андрогенов на ранних стадиях развития опухоли приводит к по-

давлению роста и развития простатных клеток, в том числе и опухолевых. К сожалению, часто в раковых клетках повышается активность и нарушается специфичность андрогенового рецептора, что приводит к выходу клеточных линий из-под гормонального контроля и обеспечивает прогрессию заболевания.

Задачи исследования. Для определения взаимосвязи регулирования жизнедеятельности простатных клеток на гормональном уровне и на уровне регуляции экспрессии посредством микроРНК был проведен анализ различий профилей экспрессии микроРНК в клетках гормоночувствительной (LNCaP) и гормононезависимой (DU-145) линий рака предстательной железы.

Материалы и методы. Культивирование клеток с последующим определением профилей экспрессии микроРНК выполняли дважды, с интервалом 1 год. При культивировании гормональное стимулирование не проводили, и в клетках гормоночувствительной линии регуляторная активность андрогенового рецептора была сильно снижена, в то время как в клетках гормоннезависимой линии его активность оставалась высокой. Сравнение уровней экспрессии проводили в программе EdgeR.

Результаты. Из 326 проанализированных зрелых микроРНК 44 продемонстрировали повышенную экспрессию в клетках DU-145, а 21 — в клетках LNCaP.

Выводы. В литературе описаны микроРНК, транскрипционно регулируемые андрогеновым рецептором. В нашей работе были выявлены микроРНК с таким типом регуляции экспрессии. Так, в клетках гормоннезависимой линии повышена копияность микроРНК miR-21, -29a, -222 и микроРНК кластера miR-23a/27a/24-2, а снижение копияности наблюдается для микроРНК miR-34a, -148a, а также микроРНК кластера 99a/let-7c/125b-2. Однако для таких микроРНК как miR-10a, -34c, -100 не наблюдается описанного в литературе снижения экспрессии, а регистрируется ее увеличение. Вместе с тем отличия в экспрессии отмечены и для микроРНК, влияющих на продукцию и функциональную активность андрогенового рецептора. В нашем сравнении повышенной активности андрогенового рецептора сопутствует снижение экспрессии микроРНК let-7c, miR-34a и -148a и повышение экспрессии микроРНК семейства miR-181.

СЕКЦИЯ IV

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Доклады

Система инсулиноподобных факторов роста в диагностике, прогнозе и молекулярно- направленной терапии опухолей

Е. С. Герштейн

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

Введение. Сигнальная система инсулиноподобных факторов роста (ИФР), включающая ИФР-I и -II, их трансмембранные рецепторы, а также ИФР-связывающие белки (ИФРСБ) крови, играет важную роль в возникновении и прогрессии различных злокачественных опухолей, поскольку она задействована в качестве ауто-/паракринного регулятора на всех этапах опухолевого процесса.

Задачи исследования. Оценка возможностей использования компонентов сигнальной системы ИФР в качестве мишеней молекулярно-направленной противоопухолевой терапии, а также для диагностики и прогноза течения различных злокачественных опухолей.

Материалы и методы. Анализ данных литературы по базе PubMed (таргетная терапия) и обобщение результатов собственных исследований ИФР и ИФРСБ в сыворотке крови, включающих результаты обследования 455 пациентов с различными опухолями и 94 здоровых доноров.

Результаты. Основным направлением анти-ИФР-терапии является подавление активности рецепторов ИФР с помощью моноклональных антител к внешнему домену или низкомолекулярных ингибиторов их внутренней тирозинкиназы; возможно также снижение уровня циркулирующих ИФР, использование антисмысловых технологий и антидиабетического препарата метформина. К настоящему времени кли-

нические испытания проходили 8 моноклональных антител к рецептору ИФР и 6 ингибиторов тирозинкиназы. Для некоторых из них продемонстрирован значимый эффект в I–II фазе при немелкоклеточном раке легкого, колоректальном раке, метастатическом раке молочной железы, саркоме Юинга и некоторых других онкологических патологиях. В то же время более 50 зарегистрированных программ клинических испытаний выявили значительные проблемы в использовании этих препаратов: одной из важнейших считается отсутствие надежных молекулярных маркеров для предсказания их эффекта и адресного использования. По данным наших исследований, ИФР-I и некоторые ИФРСБ являются значимыми диагностическими и прогностическими маркерами таких заболеваний, как рак яичников, рак толстой кишки, саркомы костей.

Выводы. Противоречивость и неоднозначность результатов исследования роли компонентов сигнальной системы ИФР в патогенезе и клиническом течении опухолей человека отражают сложность взаимоотношений между различными механизмами регуляции нормального роста клеток и канцерогенеза. Однако очевидно, что участие ИФР, их рецепторов и ИФРСБ в процессах опухолевой трансформации, роста и метастазирования делают их перспективными мишенями молекулярно-направленной противоопухолевой терапии, а также биологически значимыми маркерами для прогнозирования течения, диагностики и мониторинга различных онкологических заболеваний.

Роль транскрипционного фактора Brn-3alpha в развитии рака предстательной железы, связь с особенностями гормональной рецепции и уровнем активации АКТ/М-TOR-сигнального пути

А. К. Горбунов¹, Л. В. Спирина^{1,2}, Е. А. Усынин¹,
Е. М. Слонимская^{1,2}, И. В. Кондакова¹

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

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

Введение. Транскрипционные факторы POU — POU4F1, также известные как нейрогенные brain-specific homeobox/POU domain protein 3A (Brn-3alpha), играют важную роль в механизмах гормонального канцерогенеза. Известна их связь с особенностями регуляции андрогеновых (androgen receptor, AR) и эстрогеновых (estrogen receptor, ER) рецепторов, что определяет развитие и прогрессирование рака предстательной железы. Ключевым сигнальным каскадом, обеспечивающим регуляцию процессов пролиферации и апоптоза, является АКТ/m-TOR.

Задачи исследования. Изучение экспрессии транскрипционных факторов Brn-3alpha, AR, ERalpha в процессах развития рака предстательной железы в связи с уровнем активации АКТ/mTOR-сигнального пути.

Материалы и методы. В исследование были включены 30 больных раком предстательной железы. В ткани больных определяли уровень матричной РНК (мРНК) транскрипционных факторов Brn-3alpha, AR, ERalpha, а также компонентов АКТ/m-TOR-сигнального пути: киназу PDK1, АКТ, c-Raf, GSK-3beta, протеинкиназы m-TOR, ингибитора транскрипции 4EBP1, 70-s6 киназу и фосфатазу PTEN.

Результаты. В результате проведенного исследования показано, что инвазивный рост опухоли с прорастанием в капсулу и семенные пузырьки сопровождался ростом экспрессии AR, ERalpha в 2,8 и 6,7 раза соответственно по сравнению с пациентами без инвазии. Данные изменения протекали на фоне активации протеинкиназы АКТ и фосфатазы PTEN, уровень мРНК которых был в 2,2 и 1,7 раза выше у пациентов с наличием признаков прогрессирования заболевания.

Интересным является факт снижения экспрессии транскрипционного фактора Brn-3alpha в 2,1 раза у больных с кастрационно-рефрактерным раком предстательной железы по сравнению с пациентами без данного осложнения. Изменения данного показателя не сопровождалась модификацией уровня AR и ERalpha, однако в этой группе больных выявлено снижение экспрессии ингибитора транскрипции 4EBP1, который является продуктом активации протеинкиназы m-TOR и АКТ.

Выводы. Показано, что транскрипционный фактор Brn-3alpha связан с процессами развития и прогрессирования рака предстательной железы. Его связь с особенностями гормональной рецепции и активации АКТ/m-TOR-сигнального каскада может определять прогноз заболевания.

Рекомбинантный белок теплового шока 70 кДа как стимулятор противоопухолевого иммунитета: от клеточных моделей до доклинических испытаний

И. В. Гужова¹, М. А. Шевцов¹, Е. Ю. Комарова¹,
С. В. Абкин², Б. А. Маргулис¹

¹ФГБНУ «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;

²ГАОУ ВО ЛО «Ленинградский государственный университет им. А. С. Пушкина», Санкт-Петербург

Введение. Белок теплового шока (heat shock proteins, Hsp70) — существенный компонент микроокружения опухоли, однако его функция вне опухолевой клетки до конца не исследована. Известно, что Hsp70 способен стимулировать противоопухолевый иммунитет — врожденный и адаптивный — в разнообразных моделях рака. Этот эффект обусловлен способностью шаперона проникать в живые опухолевые клетки и выталкивать из них собственный клеточный Hsp70 в микроокружение, и этот бывший клеточный Hsp70 способен запускать цепь событий.

Задачи исследования. Выяснить, каким образом вхождение экзогенного и высвобождение эндогенного Hsp70 может способствовать увеличению чувствительности опухолевых клеток к цитотоксическим лимфоцитам. С использованием модели наиболее злокачественных опухолей — глиобластомы и меланомы — показать терапевтический эффект таргетного введения экзогенного Hsp70.

Материалы и методы. В работе использованы современные методы клеточной биологии и молекулярной иммунологии, хроматографическая очистка Hsp70, методы работы с экспериментальными животными.

Результаты. Мы показали, что при введении экзогенного Hsp70 в культуру опухолевых клеток происходит выход собственного клеточного шаперона, как на поверхность опухолевой клетки, так и в экстраклеточное пространство. Те молекулы, которые задержались на поверхности опухолевой клетки, привлекали клетки врожденного иммунитета, натуральные киллеры, убивающие опухолевые клетки, а тот Hsp70, который выходил в микроокружение, активировал адаптивный иммунный ответ. Внутритропуховое введение чистого Hsp70 имело заметный терапевтический эффект: животные жили дольше, опухоли росли медленнее, происходило заметное увеличение количества CD8+ лимфо-

цитов, специфических к клеткам опухоли. Технология внутриопухолевого введения чистого Hsp70 успешно прошла доклинические испытания и в 2011 г. была использована в ограниченном исследовании на пациентах в Институте нейрохирургии им. Поленова. Исследование показало безопасность технологии, ее пригодность и эффективность для пациентов с опухолями мозга.

Выводы. Наше исследование продемонстрировало, что применение очищенного Hsp70 в качестве препарата, стимулирующего противоопухолевый иммунитет, безопасно и перспективно.

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

Молекулярный анализ цитологических препаратов в диагностике узлов щитовидной железы

Н.Н. Колесников^{1,2}, С.Е. Титов¹⁻³, Е.С. Малахина¹,
Т.Л. Полоз⁴, М.К. Иванов^{1,3}, Л.Г. Ахмерова¹,
Ю.А. Веряскина¹, Д.А. Васильева⁵, В.А. Кушнарв⁵,
С.П. Шевченко⁶, А.В. Малек^{5,7}

¹ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии
СО РАН», Новосибирск;

²ООО «Мирэль», Новосибирск;

³ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск;

⁴НУЗ «Дорожная клиническая больница на станции
Новосибирск — Главный ОАО «РЖД», Новосибирск;

⁵ФГБУ «НИИ им. Н.Н. Петрова», Санкт-Петербург,
пос. Песочный;

⁶ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 1»,
Новосибирск;

⁷ООО «Онкосистема», Санкт-Петербург

Проблема. Узловые патологии щитовидной железы затрагивают 20–40 % населения России. Основной метод диагностики — тонкоигольная аспирационная биопсия под контролем ультразвукового наведения с последующим цитологическим анализом. В 30 % возникают случаи неопределенности дооперационной диагностики.

Решение. Предлагается уникальная для России технология молекулярно-генетического анализа (МГА) с уже имеющихся цитологических препаратов (с заключением врача). Молекулярно-генетический анализ дает дополнительную количественную и качественную информацию о характере новообразований щитовидной железы, что позволит избежать неоправданных операций на доброкачественных узлах, или наоборот, установить злокачественность и, таким образом, повысить точность дооперационной диагностики, выбрать правильную тактику дальнейшего лечения. Создан прототип тест-системы Тироид-Инфо на основе анализа более 800 цитологических препаратов и более 200 образцов операционного материала.

Результаты. В материале цитологических препаратов высокий уровень экспрессии микроРНК miR-146b и -221 позволяет дискриминировать доброкачественные и злокачественные узловые новообразования и в основном ассоциирован с классическим вариантом папиллярной карциномы. Наличие мутации *BRAF V600E* в исследованном материале увеличивает точность диагностической классификации папиллярной карциномы до 100 %. Кроме этого, Американская ассоциация по щитовидной железе в 2015 г. рекомендовала проводить генетическое исследование на наличие этой мутации для всех случаев папиллярной карциномы, так как это определяет более агрессивный курс лечения. miR-375 является классификатором медуллярной карциномы как на цитологических препаратах, так и на операционном материале. Анализ случаев неопределенной диагностики категории III ($n = 15$) и категории IV, фолликулярные неоплазии ($n = 156$) (Bethesda, 2010) позволил соответственно в 20 и 32 % случаев выявить злокачественные образования, включая наличие 12 мутаций по гену *BRAF V600E*. Также были выявлены 15 признаков злокачественности в 392 образцах, классифицированных как доброкачественные образования. В разработанном комбинированном алгоритме теста Тироид-Инфо специфичность и чувствительность для категорий III и IV (Bethesda) составили 77 и 98 % соответственно, предсказательная ценность отрицательного результата — 97 %, предсказательная ценность положительного результата — 89 %.

Выводы. Предложен алгоритм молекулярного тестирования (Тироид-Инфо) цитологических препаратов из узловых новообразований щитовидной железы, основанный на количественных оценках микроРНК и выявлении мутации V600E в гене *BRAF V600E*. Этот алгоритм может быть положен в основу диагностического решения, не замещающего цитологический анализ, но позволяющего уточнить его результаты и исключить грубые ошибки. Молекулярно-генетический анализ должен стать важной частью молекулярной цитологии и клинической онкологии в ближайшем будущем.

*Работа поддержана грантами
по Программе фундаментальных исследований
Президиума РАН «Фундаментальные исследования
для разработки биомедицинских технологий»
ФИМТ-2014-094 и «Фундаментальные науки
медицине» ФНМ-08.*

Ингибиторы молекулярных шаперонов усиливают эффект традиционных противоопухолевых лекарств в клеточных и животных моделях рака

Б.А. Маргулис, В.Ф. Лазарев, Д.В. Сверчинский,
Е.С. Чухно, И.В. Гужова

ФГБУН «Институт цитологии РАН»,
Санкт-Петербург

Введение. Одним из свойств шаперона белка теплового шока 70 (БТШ70) является защита раковых клеток от действия противоопухолевых средств. Поэтому для повышения эффективности традиционных препаратов имеет смысл применять их в комбинации с ингибиторами БТШ70. Шаперонный цикл включает захват поврежденного белка молекулой БТШ70 и придание субстрату активной формы. Эти реакции стали основой для разработки специальных тест-систем. Выявленное в процессе тестирования соединение показало свою противоопухолевую активность в сочетании с известным препаратом доксорубицин.

Задачи исследования. Сконструировать тест-системы для поиска ингибиторов шаперона БТШ70, проанализировать библиотеку малых молекул и определить активность выявленных соединений в клеточных и животных моделях рака.

Материалы и методы. Для поиска ингибиторов БТШ70 были разработаны 2 системы скрининга и использовалась библиотека компании InterBioScreen. Одна из систем основана на узнавании денатуриро-

ванного белка очищенным БТШ70; узнавание снижается, если в смеси с БТШ70 присутствует ингибитор. Другая система (рефолдинг-тест) основана на способности БТШ70 восстанавливать активность денатурированной люциферазы; ингибитор должен снижать скорость восстановления фермента. Эффекты выбранных веществ, в монорежиме и в комбинации с доксорубицином на клетки глиомы крысы С6 и меланомы мыши В16 оценивали с помощью методов окраски МТТ, акридиновым оранжевым, технологий CytoTox96 и xCELLigence.

Результаты. В ходе тестирования субстратсвязывающей и рефолдинг-активности БТШ70 выявлено активное вещество АЕАС, производное колхицина. Далее мы показали, что АЕАС способен проходить в живые раковые клетки и подавлять в них оба вида шаперонной активности БТШ70. В экспериментах с клетками меланомы мыши В16 и глиомы крысы С6 установлено, что АЕАС нетоксичен и увеличивает эффект доксорубицина как в плане подавления роста клеток, так и индукции апоптоза. Усиление противоопухолевого действия доксорубицина было продемонстрировано на животных, получавших АЕАС: рост опухоли замедлялся и срок гибели отдалялся на 10–15 дней.

Выводы. Нами впервые разработаны и применены тест-системы для анализа ингибиторов шаперона БТШ70. Найдено вещество, подавляющее шаперонную активность БТШ70 в клетках меланомы мыши и глиомы крысы. Это вещество, производное колхицина, усиливало действие доксорубицина на клетки указанных линий, а также в животных моделях рака.

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

Постеры

Паттерны экспрессии внутриклеточных сигнальных молекул как инструмент дифференциальной диагностики CD5+ В-клеточных лимфом

Д.М. Поташникова, А.А. Гладких, И.А. Воробьев

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

Введение. Субклассификация В-клеточных лимфом — незаконченный процесс, требующий детальных исследований молекулярных паттернов экспрессии, характерных для В-лимфоцитов. На сегодняшний день по морфологии, иммунофенотипу В-клеток и данным об экспрессии ряда внутриклеточных сигнальных эффекторов можно достоверно разделить В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) и лимфому из клеток мантийной зоны (ЛКМЗ), несмотря на их схожесть, в частности на наличие поверхностного маркера CD5. Однако ряд вопросов сохраняется из-за существования промежуточных форм между ними. В гематоонкологии группы таких промежуточных форм между 2 нозологиями объединяются относительно новым термином «серая зона».

В настоящей работе группа лимфом «серой зоны» между В-ХЛЛ и ЛКМЗ, выделенная в соответствии с современными критериями Всемирной организации здравоохранения, сравнивается с «классическими» вариантами этих нозологий. Критериями сравнения являются уровни экспрессии матричных РНК (мРНК) передающих и эффекторных сигнальных белков каскада В-клеточного рецептора, по которым разделение «классических» В-ХЛЛ и ЛКМЗ не вызывает сложностей: CD79A, CD79B, SYK, LYN, ZAP70, CCND1.

Задачи исследования. Достоверное разделение различных вариантов CD5+ В-клеточных лимфом по профилям экспрессии мРНК сигнальных белков сигнального каскада от В-клеточного рецептора.

Материалы и методы. Подробный иммунофенотип В-клеточных лимфом был описан методом многоцветной проточной цитофлуориметрии (FACS). Из исследованных проб была выделена РНК, транскрибирована комплементарная ДНК и проведена полимеразная цепная реакция в реальном времени с использованием SYBR Green I.

Результаты. В выборке «классических» В-ХЛЛ наблюдается характерное разделение на 2 подгруппы по уровню мРНК гена ZAP70 (подгруппы ZAP70high и ZAP70low с собственным профилем экспрессии

мРНК), не распространяющееся на группы ЛКМЗ и лимфом «серой зоны». В выборке лимфом «серой зоны» разброс значений относительных нормализованных уровней экспрессии исследованных мРНК сопоставим с разбросом в группе ЛКМЗ. При этом группы достоверно отличаются по уровням экспрессии мРНК SHP1 (медианы 7,80 в группе ЛКМЗ против 1,73 в группе «серой зоны») и CD79A (медианы 0,67 в группе ЛКМЗ против 0,93 в группе «серой зоны»).

Выводы. На основании транскрипционного профиля сигнальных молекул возможна субклассификация CD5+ В-клеточных лимфом человека. Полученные данные могут свидетельствовать о разном функциональном состоянии В-клеточного рецептора и его сигнального каскада в описанных нозологиях и использоваться как в дифференциальной диагностике, так и при выборе потенциальных терапевтических мишеней.

Механизм развития резистентности к метформину в клетках рака молочной железы: экзосомы и горизонтальный путь передачи резистентности

С.Е. Семина, М.А. Красильников

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

Введение. Метформин — антидиабетический препарат из группы бигуанидов, применяющийся для лечения диабета 2-го типа. Целый ряд исследований показал, что этот препарат существенно снижает риск развития онкологических заболеваний и проявляет высокую противоопухолевую активность.

Задачи исследования. Изучение чувствительности клеток MCF-7 к антипролиферативному действию метформина и исследование механизма развития резистентности к метформину при длительном его воздействии на клетки.

Материалы и методы. Проводили иммуноблоттинг, репортерный анализ, МТТ-тест.

Результаты. Мы показали, что добавление метформина к клеткам MCF-7 приводит к выраженному торможению роста клеток, которое сопровождается подавлением активности рецептора эстрогенов α (estrogen receptor α , ER α). С учетом способности метформина подавлять активность ER — мы изучили влияние длительного воздействия препарата на рост и гормональную зависимость клеток MCF-7. Как оказалось, полученная

после длительного культивирования с метформином линия клеток MCF-7/М приобрела относительную устойчивость к антипролиферативному действию метформина и одновременно к действию тамоксифена. Проведенный анализ содержания и транскрипционной активности ER α продемонстрировал существенное снижение этих показателей в клетках MCF-7/М по сравнению с клетками MCF-7. Далее была изучена возможность горизонтального пути развития резистентности к метформину при совместном культивировании резистентных и родительских клеток. Для этого была выведена стабильная GFP-продуцирующая резистентная сублиния MCF-7/М GFP, что позволяло отличить эти клетки от родительских при их совместном культивировании. Мы обнаружили, что кокультивирование этих 2 линий приводит к развитию частичной резистентности к метформину у клеток MCF-7.

Из родительских клеток MCF-7 и резистентных MCF-7/М мы получили препараты экзосом и проанализировали их влияние на чувствительность клеток MCF-7 к метформину. Оказалось, что регулярное добавление к клеткам MCF-7 экзосом, полученных от резистентных клеток MCF-7/М, приводит к развитию частичной резистентности клеток MCF-7 к метформину.

Выводы. Впервые на экспериментальных моделях показано, что кокультивирование чувствительных и метформин-резистентных клеток рака молочной железы приводит к развитию резистентности к метформину родительских клеток. Решающим фактором в подобном пути передачи устойчивости являются межклеточные взаимодействия, реализуемые также с участием экзосом резистентных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-34-01031).

Тезисы

Роль серин-треониновой протеинкиназы PAK1 в поддержании автономного роста и выживаемости клеток рака молочной железы

В.А. Шатская, О.Е. Андреева

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

Введение. На сегодняшний день основным критерием определения чувствительности к гормональным противоопухолевым препаратам является содержание рецепторов эстрогенов (estrogen receptor, ER). Однако гормональная резистентность может развиваться и при сохранении ER в результате дисбаланса белков-регуляторов, лиганд-независимой активации ER, стимуляции сигнальных путей, независимых от ER. Цель работы — изучение роли серин-треониновой протеинкиназы PAK1 (p21-activated kinase 1) в развитии и поддержании эстроген-независимого роста клеток рака молочной железы.

Задачи исследования. Исследование молекулярного механизма протективного и ростстимулирующего действия PAK1 в клетках рака молочной железы.

Материалы и методы. Проводили иммуноблоттинг, репортерный анализ, МТТ-тест.

Результаты. Продемонстрировано участие серин-треониновой протеинкиназы PAK1 в поддержании эстроген-независимого роста опухолевых клеток. Мы установили, что подобные митогенные эффекты PAK1 ассоциированы со стимуляцией ключевых сигнальных путей опухолевой клетки: MAPK/AP-1-каскада, WNT- β -катенинового пути, Snail1-сигнального пути. Показано, что для реализации действия PAK1 ключевым фактором является фосфорилирование α -Pix, коактиватора PAK1, по серину в положении 488. Продемонстрировано значение PAK1-сигнальной системы в регуляции выживаемости опухолевых клеток, в том числе в условиях гипоксии. В целом полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования PAK1 в качестве маркера развития гормональной резистентности рака молочной железы и потенциально-го объекта таргетной терапии опухолей молочной железы.

Выводы. PAK1 является одним из факторов, необходимых для поддержания роста клеток рака молочной железы, в большей степени — для роста эстроген-независимых опухолей молочной железы. Митогенный эффект PAK1 ассоциирован со стимуляцией ключевых сигнальных путей опухолевой клетки и может быть реализован без участия гормонального сигналинга.

*Работа выполнена
при финансовой поддержке РФФИ
(грант № 14-04-00023).*

СЕКЦИЯ V

БИОЛОГИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ

Доклады

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Д.В. Кригер, Д.Г. Тентлер

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

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

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

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

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

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

Постеры

Кластерный анализ экспрессионных профилей микроРНК при раке молочной железы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

²ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», Петрозаводск

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Т.С. Ковшова¹, Н.И. Моисеева²

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Рижский университет им. П. Страдина, Рига

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

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

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

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

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

М. В. Пучинская

УО «Белорусский государственный медицинский
университет», Минск

Введение. Флуоресцентная микроскопия является перспективным современным методом морфологиче-

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

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

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

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

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

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

М.В. Пучинская

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск

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

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

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

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

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

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

Повышенная лекарственная устойчивость раковых стволовых клеток в условиях гипоксии

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

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

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

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

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

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

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

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

Тезисы

Связь лимфогенного метастазирования при раке прямой кишки с параметрами опухолевого неоангиогенеза

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

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

²НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

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

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

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

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

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

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

Изучение маркеров эпителиально-мезенхимального перехода при раке молочной железы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

¹Рижский университет им. П. Страдиня, Рига;

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

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

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

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

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

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

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

СЕКЦИЯ VI

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Доклады

Исследование противоопухолевого воздействия дизинтегрин-обтустатина из яда закавказской гюрзы (*Macrovipera lebetina obtusa*) на мышах с саркомой Крокера (S-180)

Н.М. Айвазян, Н.А. Казарян, Л.А. Гуликан,
А.В. Кишмирян, Г.В. Гукасян

Институт физиологии им. акад. Л.А. Орбели
НАН РА, Ереван

Введение. Исследования последних лет доказали, что токсины змеиных ядов проявили себя не только в качестве важных инструментов для изучения молекулярных основ различных физиологических процессов, но также как уникальная природная кладовая прототипов терапевтических агентов для лечения самого широкого спектра патологий. Выделенный недавно из яда закавказской гюрзы дизинтегрин обтустатин является наиболее коротким из ранее описанных мономерных дизинтегринов, специфически ингибирующий интегрин $\alpha\beta 1$. Ранние опыты показали влияние данного низкомолекулярного пептида на рост и распространение меланомы, онкостатический эффект которого объясняют способностью ингибировать ангиогенез.

Задачи исследования. Выявление ингибирующего влияния обтустатина, а также низких доз самого яда на рост саркомы S-180 у мышей *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Применяли как классические методы определения интенсивности роста опухоли и гистологические исследования, так и методы молекулярно-биологических и биофизических подходов (хемилюминесцентный анализ, сравнительное исследование перекисного окисления липидов тканей и ак-

тивности ферментов системы антирадикальной защиты, анализ на замедление подвижности ДНК в геле, EMSA).

Результаты. Результаты исследования позволяют говорить о стойком подавлении роста опухоли на 33–50 % дизинтегрином и цельным ядом при ежедневных инъекциях в дозах 10 мкг/мышь или 1 мг/кг. Наблюдали также достоверное уменьшение фона окислительных процессов в обеих экспериментальных группах, а также интенсификация активности супероксиддисмутазы в организме.

Выводы. Таким образом, дизинтегрины зоотоксинов могут стать основой синтеза новых противоопухолевых препаратов, направленных, в первую очередь, на замедление и остановку роста злокачественных новообразований, блокируя рецепторы адгезии клеток опухоли и сосудов.

Разработка мономолекулярного химерного рецептора Т-лимфоцитов человека для использования в лечении опухолей, положительных к раково-эмбриональному антигену

В.К. Боженко, А.Н. Шкопоров, А.М. Шишкин, В.А. Солодкий
ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

Введение. Адаптивная терапия злокачественных опухолей с помощью Т-лимфоцитов, несущих искусственные мономолекулярные химерные рецепторы (chimeric antigen receptor, CAR), является одним из актуальных направлений современной иммунотерапии в онкологии.

Задачи исследования. Создание CAR, специфичного к раково-эмбриональному антигену (РЭА) — одному из наиболее распространенных канцер-антигенов.

Материалы и методы. Рецептор создавали методами генной инженерии на основе сиквенса моноклонального антитела к РЭА и известных нуклеотидных последовательностей различных доменов рецептора. Полученный ген рецептора был клонирован в вектор pCI, содержащий промоторный участок цитомегаловируса. Плазмиду, содержащую ген рецептора, доставляли в Т-лимфоциты методом электропорации. Цитотоксические свойства Т-лимфоцитов, несущих предложенный рецептор, исследовали на культурах РЭА-положительных опухолевых клеток и на модели бестимусных мышей с перевитой злокачественной опухолью человека, полученной из РЭА-положительной культуры НСТ-116.

Результаты. Получен мономолекулярный рецептор, состоящий из распознающей части на основе scFv-фрагментов моноклонального антитела к РЭА, участков CD28 как трансмембранного и активационного домена, CD137 (4-1BB) как активационного домена и ζ -цепи (CD247) в качестве эффекторного домена. В исследованиях *in vitro* мы показали структурную и функциональную состоятельность синтезируемых трансфицированными Т-лимфоцитами химерных мономолекулярных рецепторов. Выявлено цитотоксическое влияние на культуры опухолевых клеток. В экспериментах *in vivo* на бестимусных мышах отмечено статистически достоверное увеличение выживаемости в группе, получавшей терапию трансфицированными лимфоцитами по сравнению с контрольными группами.

Исследования фармакокинетики Т-лимфоцитов с химерными мономолекулярными рецепторами к РЭА показали длительное персистирование их в кровотоке. Достаточный для оказания противоопухолевого эффекта уровень трансфицированных Т-лимфоцитов наблюдался в течение недели. Это означает, что для эффективного применения предлагаемой методики необходимы повторные инъекции Т-лимфоцитов, но, в то же время, этот уровень снижает вероятность неконтрольной пролиферации введенных лимфоцитов, ведущих к таким осложнениям как «цитокиновый шторм».

Выводы. Доклинические исследования предложенного искусственного химерного рецептора Т-лимфоцитов к РЭА показали его эффективность и возможность использования для проведения клинических испытаний.

Ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 – потенциальные антираковые препараты

А.Л. Захаренко¹, К.П. Волчо², Т.М. Хоменко²,
О.А. Лузина², Е.В. Суслов², J. Reynisson³, Н.А. Попова⁴,
О.Д. Захарова¹, В.И. Каледин⁴, В.П. Николин⁴,
Н.Ф. Салахутдинов², О.И. Лаврик¹

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

²ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН», Новосибирск;

³School of Chemical Sciences, University of Auckland, New Zealand;

⁴ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск

Введение. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) — перспективная мишень для противоопухолевой терапии, основанной на повреждении опухолевой ДНК, вызванной ингибиторами топоизомеразы 1 (Top1). TDP1 играет ведущую роль в репарации ковалентных комплексов Top1-DNA, образовавшихся под воздействием ингибиторов Top1, таких как камптотецин и его клинические производные. Предположительно, что ингибирование TDP1 может усилить терапевтический эффект ингибиторов Top1, сенситизируя опухолевые клетки к их действию.

Задачи исследования. Поиск эффективных ингибиторов TDP1 среди природных биологических активных соединений. Определение среди наиболее эффективных ингибиторов их собственной цитотоксичности по отношению к культурам опухолевых клеток и их влияния на цитотоксический эффект камптотецина. Изучение влияния наиболее перспективных соединений на рост и метастазирование карциномы Льюиса *in vivo*.

Материалы и методы. Влияние соединений на активность очищенного фермента определялось с использованием флуоресцентного биосенсора, позволяющего следить за накоплением продуктов реакции в режиме реального времени. Цитотоксичность соединений как монопрепаратов и в сочетании с камптотецином определяли с помощью стандартного МТТ-теста в отношении клеток линий MCF-7, RPMI 8226 и HepG2. Для экспериментов *in vivo* использовали мышей линии C57BL/6 с привитой подкожно метастазирующей в легкие карциномой Льюиса.

Результаты. В исследованиях *in vitro* установлена высокая ингибирующая активность соединений в отношении очищенной рекомбинантной человеческой TDP1 (величины IC₅₀ — концентрации, при которых активность TDP1 снижена наполовину — находились в диапазоне от 0,1 до 15 мкМ). Среди них отобраны соединения, малотоксичные в отношении перевиваемых опухолевых клеточных линий в концентрации 50 мкМ. В комбинации с камптотецином некоторые

из этих соединений повышают цитотоксический эффект камптотецина в 2–12 раз, будучи использованы в заведомо нетоксичных концентрациях. В исследованиях *in vivo* установлено, что под действием ингибитора TDP1 имеет место 30 % снижение объема первичной опухоли и, по меньшей мере, двукратное усиление противометастатического эффекта топотекана при карциноме Льюиса.

Выводы. Обнаружен ряд эффективных ингибиторов фермента репарации ДНК TDP1. Показана способность ингибиторов TDP1 усиливать цитотоксический эффект камптотецина *in vitro* и противометастатический эффект его производного топотекана *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 16-13-10074).

PF-114, новый ингибитор тирозинкиназы Bcr-Abl, снижает фосфорилирование CrkL и вызывает гибель клеток хронического миелоидного лейкоза

Е.С. Колотова¹, В.В. Татарский¹, А.А. Зейфман²,
О.В. Строганов², В.С. Стройлов², И.Ю. Титов²,
Ф.Н. Новиков², А.А. Калинина¹, А.Г. Туркина³, Г.Г. Чилова⁴,
А.А. Штиль¹, В.Ю. Шульгина⁴

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

²ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН», Москва;

³ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва;

⁴ООО «Фьюжн Фарма», Москва

Введение. Преодоление резистентности к ингибиторам 1–2-го поколений, вызванной мутациями в химерной тирозинкиназе Bcr-Abl — одна из важных задач при лечении больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ). С использованием метода молекулярного моделирования нами разработан ингибитор Bcr-Abl 3-го поколения PF-114, показавший эффективность в доклинических исследованиях при ХМЛ с наиболее частой мутацией T315I. В настоящее время проводится клиническое исследование PF-114 на базе Гематологического научного центра. В рамках планируемого исследования 1-й фазы предполагаются изучение безопасности и эффективности препарата у резистентных пациентов, поиск оптимальной дозы препарата для дальнейших исследований.

Задачи исследования. Изучение механизмов гибели клеток ХМЛ при действии нового ингибитора тирозинкиназы Bcr-Abl.

Материалы и методы. Исследовали клетки линии K562 (ХМЛ). Определяли цитотоксичность, выполняли иммуноблоттинг, проточную цитофлуориметрию. Определяли внутриклеточный пул CrkL (фосфорилированная и нефосфорилированная формы).

Результаты. Гибель клеток K562 (Bcr-Abl⁺) происходит при действии наномолярных или субнаномолярных концентраций PF-114. Для Bcr-Abl-негативных лейкозов PF-114 значительно менее активен. Гибели клеток K562 предшествует задержка клеточного цикла в фазе G1. Инкубация клеток K562 с PF-114 приводила к снижению содержания клеток с фосфорилированным CrkL — важнейшим субстратом Bcr-Abl. Апоптоз, вызываемый PF-114, сопровождается активацией каспаз 3 и 9, расщеплением поли (АДФрибозо) полимеразы, нарушением фосфорилирования белков семейства STAT и изменением активности митогенактивируемых протеинкиназ.

Выводы. Новый ингибитор Bcr-Abl преимущественно токсичен для клеток ХМЛ, проявляет высокую специфичность к патогенетически важной внутриклеточной мишени, оказывает влияние на белки, участвующие в реализации гибели клеток. Эти результаты, наряду с подавлением мутантных форм Bcr-Abl и благоприятными фармакологическими характеристиками, обуславливают перспективность создания нового препарата для лечения ХМЛ на основе соединения PF-114.

Молекулярные основы для создания нового противоопухолевого средства на основе рибонуклеазы биназы

В.А. Митькевич, И.Ю. Петрушанко, А.А. Макаров

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

Введение. Несмотря на успехи противоопухолевой терапии проблема повышения эффективности методов воздействия на злокачественные новообразования, особенно на их высокометастатические формы, остается актуальной. Избирательным действием на клетки опухоли могут обладать фармацевтические средства, направленные на повреждение их РНК. К настоящему времени накоплены данные о перспективности использования в этих целях рибонуклеаз (РНКаз).

Результаты. Охарактеризованы свойства РНКаз, определяющие их избирательную токсичность в отношении злокачественных клеток. Биназа является катионной гуанил-специфичной РНКазой из *Bacillus pumilus*. Показано, что она проявляет токсическую активность в отношении целого ряда злокачественных клеток человека. Биназа индуцирует гибель клеток по пути апоптоза, что является одной из ключевых особенностей, необходимых для ее потенциального использования в терапии. Важно, что биназа не индуцирует некроз клеток как в культуре, так и на уровне целого организма. На мышинных моделях показано, что биназа эффективно ингибирует рост первичных опухолей и образование метастазов и запускает регенеративные процессы в печени. Потенциальные акцепторы биназы на клетках млекопитающих — это

кислые липиды и гликопротеины, гепарансульфатсодержащие протеогликаны, актин и ассоциированные с РНК белки. Клеточные мембраны нормальных и злокачественных клеток отличаются по составу этих компонентов, что во многом определяет избирательность действия биназы. В качестве внутриклеточных мишеней биназы рассматриваются РНК различного типа, предполагается ее вмешательство в процесс РНК-интерференции. Установлено, что чувствительность опухолевых клеток к действию биназы зависит от экспрессии определенных онкогенов (*KIT*, *FLT3*, *RAS*, *AML1-ETO*).

Выводы. Выявленные молекулярно-генетические особенности опухолевых клеток, определяющие их чувствительность к действию биназы, позволят прогнозировать эффективность ее применения в отношении определенных типов опухолей. Биназа является исключительно стабильным белком, не подверженным окислительным модификациям, что позволяет препаратам на ее основе сохранять свои свойства в течение долгого времени, а также быть эффективными в клетках, подверженных окислительному стрессу, характерному для клеток опухолей. Указанные свойства биназы делают ее привлекательным объектом для разработки противоопухолевых средств.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» и РФФИ (грант № 14-04-00798_a).

Влияние отечественных метаболитических препаратов на функциональную активность гликопротеина-Р

А.В. Шулькин, И.В. Черных, Е.Н. Якушева,
Н.М. Попова, Д.О. Уткин
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова»
Минздрава России, Рязань

Введение. Гликопротеин-Р (Pgp, ABCB1-белок) — эффлюксный белок-транспортер, участвующий в выведении химиотерапевтических препаратов — его субстратов (колхицин, топотекан) из опухолевых клеток. Повышенную активность данного белка связывают с развитием множественной лекарственной устойчивости опухолей. Кроме опухолевых клеток Pgp обнаружен в гепатоцитах, энтероцитах кишечника, эпителии проксимальных почечных канальцев, эндотелии гистогематических барьеров. Поэтому считается, что он также играет важную роль в фармакокинетике лекарственных препаратов. Ряд веществ (индукторы) может повысить активность Pgp, что приводит к развитию резистентности к проводимой терапии, а ряд

препаратов (ингибиторы) способен снизить активность белка-транспортера, что может стать следствием развития побочных эффектов.

Задачи исследования. Изучение влияния мексидола, афобазола и ноопепта на функциональную активность Pgp.

Материалы и методы. Работа выполнена на половозрелых кроликах-самцах породы шиншиллы, являющихся трансляционной моделью для оценки функционирования Pgp. Функциональную активность белка-транспортера оценивали по фармакокинетике его маркерного субстрата — фексофенадина. До начала исследования, а также после курсового введения изучаемых веществ кроликам перорально вводили фексофенадин в дозе 67,5 мг/кг массы тела и оценивали его фармакокинетiku. Мексидол вводили перорально в дозе 50 мг/кг массы тела 3 раза в день в течение 10 дней, ноопепт — перорально в дозе 10 мг/кг массы тела 3 раза в день в течение 14 дней, афобазол — перорально в дозе 3,8 мг/кг массы тела 3 раза в день в течение 14 дней.

Результаты. Введение ноопепта не влияло на фармакокинетiku фексофенадина, что свидетельствует о том, что ноопепт не действует на активность белка-транспортера. Введение мексидола в течение 10 дней кроликам вызывало достоверное ($p < 0,05$) увеличение максимальной концентрации фексофенадина на 47,0 %, AUC_{0-24} — на 86,5 % и уменьшение кажущегося объема распределения на 58,8 %, что свидетельствует о том, что мексидол является ингибитором Pgp. Введение афобазола в течение 14 дней сопровождалось повышением AUC_{0-24} фексофенадина — на 105,1 % и снижением его общего клиренса на 56,8 % ($p < 0,05$), что является признаком ингибирующего действия препарата на активность Pgp.

Выводы. Нами установлено, что мексидол и афобазол являются ингибиторами Pgp, а ноопепт не влияет на активность белка-транспортера.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-44-620292_p_a).

Регуляция функционирования гликопротеина-Р посредством тестостерона

А.В. Шулькин, И.В. Черных, Е.Н. Якушева,
Н.М. Попова, Д.О. Уткин
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова»
Минздрава России, Рязань

Введение. Гликопротеин-Р (Pgp) — АТФ-зависимый мембранный белок-транспортер, играющий важную роль в развитии множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток посредством эффлюкса (выведения) химиопрепаратов из клеток наружу. По-

этому поиск лекарственных препаратов, подавляющих активность данного белка-транспортера, является актуальной задачей.

Задачи исследования. Изучение регуляции функционирования Pgp посредством тестостерона.

Материалы и методы. Работа выполнена на кроликах-самцах породы шиншиллы с массой тела 3500–4200 г. В ходе исследования изучали функциональную активность и экспрессию Pgp при орхэктомии, а также при внутримышечном введении тестостерона ундеканата в дозах 12 и 24 мг/кг массы тела. Функциональную активность Pgp на уровне целостного организма определяли по фармакокинетике его маркерного субстрата — фексофенадина. Фексофенадин не подвергается биотрансформации, и его фармакокинетика зависит в основном от активности Pgp. Экспрессию Pgp в печени, почках и тонком кишечнике определяли иммуногистохимически.

Результаты. Показано, что орхэктомия приводила к повышению активности Pgp, что проявлялось изменением фармакокинетики его маркерного субстрата — фексофенадина, а именно: на 7-й день после операции снижением его максимальной концентрации ($C_{\max}$),

на 14-е сутки уменьшением $C_{\max}$ и площади под фармакокинетической кривой концентрация—время (AUC0–t), увеличением общего клиренса (Cl), на 21-й день — снижением $C_{\max}$ и AUC0–t, увеличением Cl. При этом орхэктомия также сопровождалась повышением экспрессии Pgp на 21-й день эксперимента в печени и почках. Введение тестостерона в дозе 6 мг/кг массы тела нормализовало данный показатель.

Установлено, что введение тестостерона в дозах 12 и 24 мг/кг массы тела вызывало снижение функциональной активности Pgp, что проявлялось повышением $C_{\max}$ фексофенадина на 7-е и 14-е сутки, AUC0–t — на 14-е сутки, снижением Cl на 14-е сутки (доза 12 мг/кг), повышением $C_{\max}$ на 7-е сутки, AUC0–t — на 7-е, 14-е и 21-е сутки, и снижением Cl на 7-е и 14-е сутки (доза 24 мг/кг). При этом введение тестостерона в дозе 12 мг/кг массы тела сопровождалось снижением экспрессии Pgp в печени на 14-е и 21-е сутки, в тонком кишечнике — на 7, 14 и 21-е сутки, а в дозе 24 мг/кг массы тела — снижением экспрессии в печени и тонком кишечнике на 7, 14, 21-е сутки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-04-00320_а).

Постеры

Синтез и биологические испытания конъюгатов паклитаксела для терапии рака предстательной железы

А.П. Бер¹, А.Э. Мачулкин¹, Н.С. Воробьева², С.В. Ковалев¹,
А.Г. Мажуга^{1,2}, Е.К. Белоглазкина¹, В.Э. Котелянский¹

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

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

Введение. По данным мировой статистики, на 2012 г. рак предстательной железы занимает 2-е место по распространенности среди мужского населения (1,1 млн новых случаев) [1]. Несмотря на широкий спектр подходов к лечению заболевания, ни один из них не позволяет проводить эффективное лечение опухолей, имеющих метастазы. Многие из современных методов лечения обладают спектром побочных действий.

Задачи исследования. Одним из решений данной проблемы является адресная доставка противоопухолевых препаратов. В клетках рака предстательной железы повышена экспрессия простатического специфического мембранного антигена (ПСМА) по сравнению со здоровыми клетками. Существуют несколько малых молекул, селективно связывающихся с ПСМА [2].

Материалы и методы. В настоящей работе были синтезированы и охарактеризованы конъюгаты противоопухолевого лекарства паклитаксел с лигандами, специфично связывающимися с ПСМА. Конъюгаты состояли из 3 фрагментов, один из которых обеспечивал селективное связывание с ПСМА (вектор). Этот фрагмент связан с активным веществом (паклитаксел) углеродным линкером, который обеспечивает высвобождение лекарства внутри клетки. Длина линкера варьировалась от 5 до 10 атомов углерода. Вектор с линкером соединялись амидным или мочевиным фрагментом.

Результаты. Синтезированы 3 конъюгата: 2 — с амидным сочленением и 1 — с мочевиным. Были проведены испытания *in vitro* на клеточных линиях рака предстательной железы LNCaP (ПСМА⁺) и PC3 (ПСМА⁻). Конъюгаты с амидным сочленением показали токсичность, близкую к соответствующим значениям препарата паклитаксел, однако проявили низкую избирательность к ПСМА-экспрессирующей клеточной линии. Конъюгат с мочевиным сочленением показал высокую избирательность по отношению к ПСМА-положительной клеточной линии, но низкую токсичность.

Выводы. Синтезированы 3 конъюгата, строение которых подтверждено спектрами ¹H и ¹³C ЯМР, масс-

спектрометрией высокого разрешения. Также были проведены биологические испытания на линиях клеток LNCaP (ПСМА⁺) и PC3 (ПСМА⁻).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-34-00017).

1. World Cancer Report 2014. International Agency for Research of Cancer, World Health Organisation.

2. Maresca K.P., Hillier S.M., Femia F.J. et al. A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA) as radiolabeled probes for targeting prostate cancer. J Med Chem 2009;52(2):347–52.

Поиск *in silico* соединений, активных по отношению к опухолевым клеточным линиям человека, на примере рака молочной железы

В.И. Дубовская, А.А. Лагунин,
П.В. Погодин, В.В. Поройков

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

Введение. Существование опухолей, резистентных к традиционным терапевтическим воздействиям, требует создания новых лекарств. Несмотря на достигнутый прогресс, тройной негативный рак молочной железы (РМЖ) невосприимчив к существующему лечению.

Задачи исследования. Для поиска соединений, активных по отношению к опухолевым клеточным линиям человека, создан подход к компьютерному прогнозированию цитотоксического действия лекарственныхподобных веществ на опухолевые и неопухолевые клеточные линии человека с помощью многоступенчатого скрининга, основывающегося на предсказании действия низкомолекулярных химических соединений на белки человека и данных моделирования процессов в регуляторных сетях.

Материалы и методы. Перспективные мишени для воздействия на клеточные линии РМЖ человека были отобраны с помощью метода дихотомического моделирования регуляторных сетей. Анализ регуляторных сетей передачи сигнала внутри клетки включает построение путей передачи сигнала в клетке, поиск регуляторов транскрипции потенциальных фармакологических белков-мишеней. QSAR-анализ зависимостей «структура–цитотоксичность», полученных из баз данных ChEMBL, лег в основу прогноза действия низкомолекулярных химических соединений на белки человека. Используя многоступенчатый скрининг *in silico* 1 млн соединений из баз данных коммерчески доступных

химических веществ, мы отобрали соединения для следующего тестирования.

Результаты. Экспериментальная валидация подхода проведена на 49 соединениях, для которых была предсказана цитотоксичность по отношению к 24 клеточным линиям РМЖ и значительно меньшая — по отношению к 31 неопухолевой клеточной линии. Активность в отношении клеточных линий РМЖ MDA-MB-231 и MCF-7 с IC₅₀ 0,8–50 мкМ проявили 8 соединений. Из них у 5 была значительно более низкая активность в отношении фибробластов человека, а 2 соединения показали избирательную цитотоксичность в отношении определенной клеточной линии РМЖ.

Выводы. Разработанный подход [Konova et al., 2015] позволяет выявлять соединения, цитотоксичные в отношении различных типов опухолевых клеточных линий и оказывающих существенно более слабое влияние на неопухолевые клеточные линии, что дает возможность рационального поиска и конструирования новых лекарственных веществ для терапии злокачественных новообразований.

На основании разработанного нами подхода был создан веб-сервис CLC-Pred для прогноза действия химических соединений на опухолевые и неопухолевые клеточные линии человека, доступный по ссылке: <http://www.way2drug.com/Cell-line/>.

Разработка модельной системы рака молочной железы для оценки эффектов селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора

Е.М. Жидкова, М.А. Мазин, К.А. Кузин,
Л.Р. Тилова, А.В. Савинкова, О.И. Борисова,
А.Ю. Портянникова, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская,
Е.А. Лесовая

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

Введение. Глюкокортикоиды (glucocorticoids, GC) широко используются в качестве коадъювантов в терапии солидных опухолей, в том числе при лечении рака молочной железы (РМЖ). Однако их применение ассоциируется с худшим ответом на лечение и прогнозом для ряда подтипов РМЖ. Действие GC реализуется путем активации глюкокортикоидного рецептора (glucocorticoid receptor, GR). Активированная форма GR может осуществлять регуляцию генов по 2 механизмам: трансактивации и транскрепрессии. Транскрепрессия обуславливает терапевтические эффекты, в то время как трансактивация ведет к развитию побочных эффектов GC. Перспективным является поиск селективных агонистов GR, избирательно активирующих транскрепрессорный механизм. К классу таких агонистов относится 2-(4-ацетоксиметил)-2-хлор-N-

метилэтиламмоний хлорид, или CpдA, соединение растительного происхождения, выделенное из кустарника *Salsola tuberculatifomis*. В предыдущих исследованиях показано, что CpдA конкурирует с GC за связывание с GR, селективно запускает механизм транскрепрессии и проявляет противоопухолевую активность на моделях гемобластозов и рака предстательной железы.

Задачи исследования. Изучение антипролиферативной активности CpдA и сравнение действия CpдA с классическим GC дексаметазоном (Dex) на клеточных моделях РМЖ, а также демонстрация того, что действие CpдA является GR-зависимым.

Материалы и методы. В работе были использованы клетки аденокарциномы молочной железы линий MCF-7 и MDA-MB-231. Путем трансдукции лентивирусным вектором получены сублинии клеток с подавленной экспрессией GR. Для определения уровня экспрессии GR применяли вестерн-блоттинг.

Для проведения эксперимента клетки высевали в 96-луночные планшеты по 2500 клеток на лунку. Каждые 24 ч клетки обрабатывали CpдA или Dex в концентрациях от 0 до 10 мкМ. Измерение плотности клеточной культуры проводили на 2, 4, 6, 8 и 10-е сутки после обработки путем прямого подсчета живых клеток.

Результаты. Продемонстрировано антипролиферативное действие CpдA и Dex на модельные клеточные линии РМЖ. CpдA в концентрации 10 мкМ подавляет пролиферацию клеток линии MCF-7 на 40 %.

Показано, что сублинии клеток с подавленной экспрессией GR невосприимчивы к CpдA и маловосприимчивы к Dex. Таким образом, доказано, что эффект CpдA опосредован исключительно транскрепрессорным механизмом активации GR.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования действия CpдA на моделях РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 16-04-014010 и 15-04-04006).

Синтез и исследование антипролиферативной активности имидазо[1,2-α]пиридиновых производных стероидов

А.С. Козлов¹, И.В. Рассохина¹, О.Е. Андреева²,
А.М. Щербаков², Ю.А. Волкова¹

¹ФГБУН «Институт органической химии
им. Н.Д. Зелинского РАН», Москва;
²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Аналоги стероидных гормонов, содержащие гетероциклические фрагменты, конденсированные или просто связанные со стероидным каркасом, являются наиболее перспективными соединениями

для разработки новых лекарственных препаратов в терапии гормонально зависимых форм рака.

Задачи исследования. Целью настоящей работы стали синтез и изучение антипролиферативных свойств ранее неизвестных классов гибридных имидазо[1,2- α]-пиридиновых производных стероидов эстранового и андростанового рядов.

Материалы и методы. Синтез был реализован с использованием общих приемов тонкого органического синтеза. Доказательство структур лигандов проводили с применением спектроскопии ядерного магнитного резонанса, инфракрасной спектроскопии и масс-спектрометрии. Опухолевые клетки предстательной и молочной желез получены из коллекций ATCC (США) и НИИ цитологии и до проведения экспериментов хранились в криобанке РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Активность рецептора эстрогена измеряли с помощью ген-репортерного анализа.

Результаты. Нами был разработан оригинальный подход к синтезу имидазо[1,2- α]пиридиново-стероидных гибридов, основанный на каскадной реакции гетероциклизации ацетиленов с основаниями Шиффа промотируемой солями меди (I, II). Серии производных стероидов ряда андростана и эстрана, содержащие имидазо[1,2- α]пиридиновый фрагмент в 17-м положении, были получены из 17 α -этинилстероидов с выходами от умеренных до хороших. Проведена оценка противоопухолевой активности полученных соединений по отношению к клеткам линий MCF-7, SKBR3, HBL-100, MDA-MB453, MDA-MB231 (рак молочной железы) и LNCaP-LN3, PC3 (рак предстательной железы). Показано, что все они обладают цитотоксичностью по отношению к клеткам рака молочной железы линии MCF-7 со значением $IC_{50} \leq 10$ мкМ. Продemonстрировано, что гибридные имидазо[1,2- α]пиридиновые стероиды являются активными модуляторами рецептора эстрогенов в клетках рака молочной железы.

Выводы. Высокие результаты противоопухолевой активности и обнаруженная способность модулировать эстрогеновый рецептор α делают имидазо[1,2- α]пиридиновые производные стероидов перспективными для дальнейшего углубленного изучения их свойств и механизмов действия.

Оценка перспектив использования для противораковой генной терапии комбинации генов протеазы 3С вируса гепатита А человека и гибридного белка FCU1

А.А. Комиссаров, И.В. Демидюк, Д.Р. Сафина, М.П. Рошина, А.В. Шубин, Н.А. Лунина, М.А. Карасева, С.В. Костров
ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН», Москва

Введение. Разработка генно-терапевтических лекарственных средств на сегодняшний день интенсивно проводится во всем мире. Однако, несмотря на огромный потенциал, генетическая терапия пока имеет весьма ограниченное применение, что связано с наличием ряда нерешенных проблем. Одной из основных причин низкой эффективности противораковых генно-терапевтических препаратов является ограниченность их действия на определенные типы опухолей или даже определенные типы клеток внутри опухоли. Для преодоления этой ограниченности может быть применен подход, основанный на комбинировании терапевтических генов, продукты которых обладают различными механизмами действия. В рамках данной работы нами впервые была исследована комбинация гена протеазы 3С вируса гепатита А человека и суицидальной системы, состоящей из гена слитого белка дрожжевых цитозиндезаминазы/фосфорибозилтрансферазы (FCU1) и пролекарства 5-фторцитозина (5-ФЦ).

Результаты. Для обеспечения коэкспрессии 3С и FCU1 была получена бицистронная конструкция, в которой между генами введена последовательность 2А-пептида вируса болезни Тешена свиней. Для оценки цитотоксического действия использовали линии клеток человека HEK293 и HeLa. Установлено, что цитотоксическое действие FCU1 и протеазы 3С проявляется по-разному. При индивидуальном действии FCU1/5-ФЦ количество жизнеспособных клеток в культуре уменьшалось постепенно, и максимальный эффект наблюдался к моменту окончания эксперимента – 168 ч после трансфекции (п. т.). Наибольший эффект 3С, напротив, был обнаружен в первой экспериментальной точке (24 ч п. т.), а затем количество жизнеспособных клеток увеличивалось и практически сравнивалось с контролем. Комбинация же генов FCU1 и 3С в составе бицистронной конструкции приводила к суммированию цитотоксических эффектов: клетки погибали быстрее, чем при действии только FCU1, и более полно, чем в случае одной протеазы 3С. В то же время значимой синергии не наблюдали.

Выводы. Полученный результат демонстрирует, что интеграция генно-терапевтических систем, вызывающих клеточную гибель и обладающих различными механизмами действия, не препятствует проявлению цитотоксического эффекта каждой из них. Это позво-

ляет предполагать, что спектр действия исследованной комбинации на опухолевые клетки будет более широким, чем в случае индивидуального применения ЗС и FCU1.

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

Оценка эффективности фотосенсибилизатора группы бискарбоцианиновых красителей для фотодинамической терапии опухолей

В.А. Кузьмин¹, А.А. Костюков¹, А.Ш. Радченко¹,
А.А. Штиль², F.A. Farzad Lahiji¹

¹ФГБУН «Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

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

Введение. В настоящее время развитие фотодинамической терапии в значительной степени ограничено небольшим количеством допущенных к применению фотосенсибилизаторов, что вызвано не только проблемой их адресной доставки и активации, но и эффективности, а также безопасности. Бискарбоцианиновые красители обладают рядом достоинств: активируются в дальней инфракрасной области спектра, малотоксичны, проникают во все компартменты клетки.

Задачи исследования. Оценка скорости проникновения и фотоцитотоксичности 2,6-бис-(3,7-ди-N-метил-бенз[1,2-d:4,3-d']бистиазол-)-[N-метил-3,3'-диметил-индокарбоцианина]перхлората (БКЦ) в клетках карциномы прямой кишки человека линии НСТ116. Определение эффективности связывания БКЦ с основным белком крови — человеческим сывороточным альбумином (ЧСА).

Материалы и методы. Выполняли конфокальную флуоресцентную микроскопию, МТТ-тест, абсорбционную и флуоресцентную спектроскопию.

Результаты. Максимальное содержание БКЦ в клетках (флуоресценция экстракта в ДМСО) достигается через 1 ч инкубации и снижается в 2 раза через 24 ч. БКЦ распределен в цитоплазме и присутствует в ядре по данным флуоресцентной конфокальной микроскопии. После 1 ч инкубации с БКЦ (1 мкМ) и замены культуральной среды интенсивность флуоресценции красителя (Ex 514 нм/Em 650 нм) на конфокальных изображениях возрастает через 3 ч. Вероятно, через 3 ч после интернализации БКЦ в составе комплексов с ЧСА среды происходит перераспределение и более прочное связывание с внутриклеточными компонентами, что увеличивает эффективность

флуоресценции. Константа связывания БКЦ с ЧСА составляет $(5,8 \pm 0,4) \text{ E-4 M}^{-1}$. По данным 24 ч МТТ-теста максимальная световая цитотоксичность БКЦ достигается при освещении через 3 ч после инкубации с красителем. Световая цитотоксичность БКЦ составляет 100 % при концентрациях 0,1–1,0 мкМ, не обладающих темновой токсичностью в условиях эксперимента.

Выводы.

- БКЦ эффективно проникает в цитоплазму и ядро клеток НСТ-116 в течение 1 ч после введения в инкубационную среду.
- Сравнительно невысокая константа связывания БКЦ с ЧСА и рост флуоресценции свидетельствуют об образовании более прочных комплексов БКЦ с внутриклеточными компонентами через 3 ч после инкубации.
- БКЦ является перспективным агентом для фотодинамической терапии опухолей, обладающим высокой фототоксичностью в малых и безопасных концентрациях (0,1–1,0 мкМ).

Пептидные аналоги соматостатина, содержащие адамантановый фрагмент

Н.И. Моисеева¹, Д.С. Хачатрян², А.В. Колотаев²,
А.Н. Балаев³, К.А. Охманович³, Е.А. Ручко³

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

²ФГУП «ИРЕА», Москва;

³АО «Фарм-Синтез», Москва

Введение. Аналоги соматостатина в настоящее время широко применяются в диагностике и лечении различных нейроэндокринных раковых заболеваний. Такие пептидные препараты, как октреотид и ланреотид, с успехом используются в медицинской практике. Исследования в области синтеза новых пептидных аналогов соматостатина постоянно расширяются. Одним из перспективных направлений является поиск активных соединений в области коротких линейных пептидов с различными функциональными заместителями.

Задачи исследования. Синтез и исследование цитотоксической активности новых линейных пептидов — аналогов соматостатина — содержащих адамантановый фрагмент.

Материалы и методы. В РОНЦ им. Н.Н. Блохина создан и проходит клинические исследования препарат цифетрелин — защищенный пентапептид, аналог соматостатина. Ранее было показано, что наличие адамантансодержащих фрагментов в пептидах приводит к усилению противоопухолевой активности на резистентных к лекарственным препаратам линиях опухолевых клеток. Объектами наших исследований являются модифицированные линейные пентапептиды,

производные цифетрелина, имеющие в составе адамантановые фрагменты.

Результаты. Разработаны методы синтеза и получены модифицированные пентапептиды с объемными амидными заместителями на С-конце. В частности, получены адамантансодержащие амиды: 1-адамантиламид, N-1-(1-адамантил)этиламин. Исследована цитотоксическая активность полученных соединений на линиях клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7, аденокарцином предстательной железы человека LNCap, LNCapLN3 и PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat и карциномы легкого A549. В качестве контрольных нормальных клеток использовали линию эмбриональных фибробластов человека ФЭЧ. Синтезированные пептиды проявили цитотоксическую активность со значениями IC50 (ингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток) в микромолярном диапазоне. Наиболее активный пептид обладает значительной цитотоксической активностью на всех линиях раковых клеток, причем для клеток HCT-116 наблюдается высокая селективность цитотоксического действия: IC50 (ФЭЧ)/IC50 (HCT-116) = 6,5.

Выводы. Найдены новые активные модифицированные пентапептиды, аналоги соматостатина, проанализирована зависимость «структура–активность», определены направления дальнейшей оптимизации структуры пептидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 14.576.21.0044 от 05.08.2014).

Новый ингибитор рецепторов PD-1 и Tim-3 и его комбинация с лучевой терапией повышают эффективность виротерапии рака

С.Б. Оникиенко¹, В.А. Черешнев², А.В. Земляной¹, Н.В. Бычкова³, В.Ю. Кравцов⁴, В.В. Лищенко³, С.В. Абкин^{4,6}, А.Ф. Панфиленко⁵, И.В. Гужова⁶, Б.А. Маргулис⁶

¹ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург;

²ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина», Екатеринбург;

³ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова», Санкт-Петербург;

⁴ГАОУ ВО ЛО «Ленинградский государственный университет им. А.С.Пушкина», Санкт-Петербург;

⁵ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России, Санкт-Петербург;

⁶ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Ингибиторы блокирующих противоопухолевый иммунный ответ рецепторов PD-1 и Tim-3 повышают эффективность виротерапии рака. Экзогенный белок теплового шока 70 (БТШ-70) и ионизиру-

ющее излучение мобилизуют эндогенный БТШ-70 из клеток опухоли и усиливают целевой иммунный ответ.

Задачи исследования. Оценить эффективность ингибитора рецепторов PD-1 и Tim-3 — экзогенного БТШ-70 — и его комбинации с позитронной терапией при виротерапии рака.

Материалы и методы. Онколитический вирус Сендай (SeV) вводили внутривенно (10^7 – 10^8 вирусных частиц) 8–12 раз еженедельно больным ($n = 43$) метастатическим раком. При высоком уровне $CD3^+CD8^+PD-1^+$ (> 40 % от клеток $CD3^+CD8^+$) ежедневно вводили внутривенно 0,5–1,0 мг БТШ-70 на протяжении 7 сут, затем определяли в периферической крови и опухолевых инфильтратах число клеток $CD3^+CD8^+PD-1^+$ и $CD3^+CD8^+PD-1^+TIM-3^+$. Позитронсодержащий радиофармпрепарат (конъюгат ^{11}C с холином) вводили в дозе 250–400 МБк 1 раз в 7–14 сут в комбинации с БТШ-70 и SeV. Критерии эффективности виротерапии — регрессия опухоли, выраженность цитопатических изменений в раковых клетках, уровень гранзима и перфорина в Т-лимфоцитах.

Результаты. Методом проточной цитометрии установлено, что введение БТШ-70 опухоленосителям снижает число клеток $CD3^+CD8^+PD-1^+$ в периферической крови в 1,6–2,7 раза, $CD3^+CD8^+PD-1^+TIM-3^+$ — в 8,2–10,5 раза ($p < 0,05$). Методом иммуноцитохимии выявлено, что число лимфоцитов без рецепторов PD-1 увеличивается в опухолевом инфильтрате более чем в 3 раза, в них повышается уровень гранзима и перфорина, активируются иммунные механизмы гибели опухолевых клеток. Эффективность виротерапии рака повышается при ее комбинации с введением БТШ70 и позитронной терапии.

Выводы. Двойной ингибитор рецепторов PD-1 и Tim-3 — БТШ70 — повышает эффективность виротерапии рака. Противоопухолевый иммунный ответ усиливается при его комбинации с позитронной терапией.

Нуклеолин/С23 и нуклеофозмин/В23 как потенциальные мишени для противоопухолевой терапии

Д.А. Понкратова¹, А.А. Лушникова¹, И.С. Абрамов², Л.Ф. Морозова¹, С.М. Андреев³, Е.Ю. Рыбалкина¹

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

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

³ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, Москва

Введение. Нуклеолин/С23 и нуклеофозмин/В23 — ключевые регуляторы клеточного цикла, транскрипции и трансляции, биогенеза рибосом, молекулярного транспорта и сигналинга в клетке. Высокий уровень экс-

прессии C23 и B23 на мембране, в цитоплазме и в ядре клеток целого ряда опухолей позволяет рассматривать эти белки в качестве возможных мишеней для ингибиторов клеточной пролиферации. Для индукции избирательной гибели опухолевых клеток перспективны некоторые катионные пептиды (КП) — возможные лиганды мембранного C23, которые имеют дендритную структуру, устойчивы к внутриклеточной деградации и в рабочих концентрациях нетоксичны для нормальных клеток.

Задачи исследования. Анализ цитотоксической активности КП в отношении клеток меланомы кожи, рака яичников и глиобластомы человека.

Материалы и методы. Для изучения цитотоксической активности на культурах клеток меланомы кожи линий melIS, melH, рака яичников линии RYa и 2 штаммов глиобластомы линий Glb-Sh и Glb-17 использовали 3 КП с дендритной структурой и 1 КП, меченый нетоксичным флуоресцентным красителем C-5, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с праймерами к ранее картированным «горячим» точкам этих генов с последующим конформационно-чувствительным электрофорезом в полиакриламидном геле и прямым секвенированием ампликонов с измененной структурой ДНК (полиморфные варианты или мутации). Уровень экспрессии генов *NPM/NCL/Trp53* определяли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией, белков — с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты. В клетках изучаемых линий уровень экспрессии B23/C23 по сравнению с клетками в группе контроля был выше в 3,5/4,6–6,2/8,2 раза в зависимости от линии. Через 3 суток инкубации опухолевых клеток с немечеными пептидами уровень экспрессии матричной РНК (мРНК) *NPM/NCL* снизился в 1,5/1,1–2,1/3,6 раза. В то же время уровень экспрессии мРНК *Trp53* повысился в 1,8–3,5 раза. С помощью МТТ-теста и посредством окрашивания клеток после инкубации с КП красителем Хекст 33342, трипановым синим и йодистым пропидием выявлены апоптотические ядра. Установлена токсичность КП для всех исследованных линий опухолевых клеток. С учетом результатов вестерн-блоттинга избирательная токсичность КП может быть связана с взаимодействием C23/B23/p53, инактивацией p53 и конкурентным связыванием КП с C23 и последующей активацией p53.

Выводы. Исследована цитотоксичность одного из КП с дендримерной структурой молекулы. Выявлена избирательная гибель клеток в культурах меланомы кожи, глиобластомы, рака яичника, но не в культуре подкожных фибробластов человека. Обсуждаются возможные механизмы избирательной цитотоксичности КП с участием шаперонов B23/C23 и p53.

Пептидный фрагмент белка теплового шока Hsp70 ингибирует его шаперонную активность и увеличивает противоопухолевую активность доксорубина

Д.В. Сверчинский, В.Ф. Лазарев, А.Д. Никитина,
И.В. Гужова, Б.А. Маргулис

ФГБУН «Институт цитологии РАН»,
Санкт-Петербург

Введение. Важную роль в защите опухолевой клетки играет молекулярный шаперон Hsp70 (heat shock proteins 70), поддерживающий белки в нативной конформации. В нормальных клетках уровень Hsp70 небольшой, однако в малигнизированных клетках его экспрессия значительно повышается, что является фактором снижения эффективности противоопухолевой терапии. Для того, чтобы усилить действие противоопухолевых агентов, необходимо подавить защитную систему трансформированной клетки, основанную на Hsp70.

Задачи исследования. Многие вещества, ингибирующие Hsp70 и исследуемые в качестве противоопухолевых средств, обладают высокой токсичностью и низкой стабильностью. В то же время пептиды зачастую обладают хорошей пенетрирующей способностью и стабильностью, а также менее токсичны. Поэтому целью нашей работы стал поиск пептидов, способных влиять на его шаперонную активность, и изучение цитотоксического эффекта таких пептидов в комплексе с противоопухолевыми препаратами.

Материалы и методы. Сначала мы провели скрининг пептидов — фрагментов Hsp70 — в целях поиска ингибиторов функции Hsp70 с помощью тестов на узнавание и рефолдинг субстратного белка. Выявленные ингибиторы мы проверяли на способность уменьшать протеолиз Hsp70, указывающую на возможность таких соединений связываться с Hsp70.

Далее методами иммунофлуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии мы изучили способность пептидов—ингибиторов Hsp70 проникать во внутриклеточное пространство.

Наконец, мы оценили цитотоксический эффект пептидов на опухолевые клетки в сочетании с доксорубином в опытах по измерению динамического сопротивления и тестах по оценке активности внеклеточной лактатдегидрогеназы.

Результаты. В ходе нашей работы мы выявили пептиды, подавляющие шаперонную функцию Hsp70. Один из этих пептидов, ICit-2, уменьшает эффективность протеолиза Hsp70, что подтверждает его взаимодействие с данным шапероном.

Потенциальный терапевтический пептид должен обладать способностью проникать во внутриклеточное пространство. Пенетрирующие свойства пептида ICit-2

мы подтвердили в опытах на клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431.

Наконец, мы продемонстрировали дозозависимый эффект стимуляции цитотоксических свойств доксорубина данным пептидом. При этом ICit-2 не показал собственной цитотоксичности.

Выводы. Нами был найден пептид, подавляющий активность Hsp70 и усиливающий действие доксорубина. В отличие от многих других потенциальных терапевтических средств, ингибирующих Hsp70, ICit-2 не обладает собственной токсичностью в рабочих концентрациях, что делает его возможное фармакологическое применение более безопасным.

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

Роль дефектов интерферона 1-го типа в вирусном онколизе

Д.А. Серяк

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

Введение. Вирусный онколиз представляет собой перспективный метод биотерапии злокачественных новообразований. Онколитические вирусы способны вызывать избирательную гибель опухолевых клеток. Однако некоторые типы опухолей остаются резистентными к виротерапии, что частично обусловлено механизмами врожденного противовирусного иммунитета, опосредованного интерфероном 1-го типа.

Задачи исследования. Проведение широкого скрининга модельных раковых линий на чувствительность к интерферону, выявление линий, чувствительных к вирусной инфекции, с нарушенными механизмами противовирусной защиты.

Материалы и методы. В скрининге раковых линий на наличие нарушений в компонентах противовирусной системы защиты использовали стандартный метод оценки чувствительности клеток к заражению вирусом везикулярного стоматита при добавлении экзогенного интерферона. Протестированы модельные линии различных типов злокачественных опухолей, среди которых — глиобластомы, рак легкого, поджелудочной и предстательной желез, остеосаркома.

Результаты. Проанализирована панель модельных клеточных линий различных типов рака на чувствительность к интерферону. Выявлены раковые линии с нарушенными механизмами противовирусной защиты. Клеточные линии с подавлением белка-адаптера MAVS методом РНК-интерференции — важнейшего компонента интерфероновой системы — показали повышенную чувствительность к вирусу по сравнению с опухолевыми линиями того же гистологического типа, но без ингибирования MAVS.

Выводы. Полученные предварительные результаты подтверждают, что опухолевые линии обладают различной чувствительностью к вирусной инфекции и это, отчасти, может быть связано с разной способностью раковых клеток поддерживать противовирусный иммунный ответ. Отобранные в ходе скрининга клеточные линии будут использованы для дальнейшего детального изучения дефектов интерфероновой системы в опухолевых клетках различных типов.

Подходы к лечению саркомы тучных клеток вирусом Сендай

А.С. Сидоренко¹, А.В. Терешкова¹, Е.А. Мухина², Г.В. Ильинская^{3,4}

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

²Клиника онкологии животных ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» — филиал ФГБУ НМИРЦ

Минздрава России, Москва;

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

⁴ФГБУ «Российский научный центр медицинской реабилитации и курортологии» Минздрава России, Москва

Введение. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении онкологических заболеваний, злокачественные опухоли остаются одной из основных причин смертности во всем мире. Вирусный онколиз представляет собой принципиально новый подход к терапии этих заболеваний, основанный на естественной способности некоторых вирусов селективно убивать опухолевые клетки, не повреждая здоровые ткани. Одним из представителей таких вирусов является парамиксовирус Сендай, непатогенный для человека, кошек и собак, но вызывающий респираторную инфекцию у мышей.

Задачи исследования. Изучить онколитическую активность вируса Сендай на модели тучноклеточной саркомы собак и кошек.

Результаты. В качестве модели мы выбрали мастоцитому (злокачественную саркому тучных клеток) — часто встречающуюся опухоль у собак и кошек и имеющую очень плохой прогноз (более чем в 70 % случаев). В предварительных экспериментах *in vitro* мы показали, что опухолевые клеточные линии человека и животных различного гистогенеза, в том числе первичные опухолевые линии, обладают избирательной чувствительностью к вирусу Сендай, а также обеспечивают различный уровень образования вирулентных частиц.

Нами были пролечены 27 животных (22 собаки и 5 кошек) с диагнозом мастоцитомы различной дифференцировки и разной степени злокачественности. Из них 14 животных были прооперированы с недостаточным захватом здоровых тканей. Были апробированы как схемы лечения вирусом (в монорежиме или в комбинации с хирургическим вмешательством), так

и различные способы введения вакцины. Независимо от способа введения вируса полная или частичная ремиссия была достигнута в 82 % случаев. Длительность ремиссии была 3–31 мес (по настоящее время), максимальная продолжительность жизни — 21–38 мес (по настоящее время). С начала лечения вирусом у животных наблюдалось улучшение общего самочувствия.

Выводы. Таким образом, мы показали, что вирус Сендай является перспективным онколитиком и может быть использован как альтернатива адьювантному лечению, в ряде случаев заменить хирургическое вмешательство при мастоцитамах, а возможно и при других опухолях. Клинически значимых побочных эффектов не отмечено.

*Работа выполнена
при финансовой поддержке РНФ
(грант № 14-15-01073).*

Молекулярные механизмы противоопухолевого действия терапевтически приемлемого аналога оливомицина А

В.В. Татарский¹, А.Н. Тевяшова², А.К. Исагулиева¹,
А.А. Штиль¹

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

²ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе», Москва

Введение. Оливомицин А (1) — антибиотик группы ауреоловой кислоты. Высокая цитотоксичность 1 для опухолевых клеток сопровождается неприемлемой общерезорбтивной токсичностью.

Задачи исследования. Создать производные с достаточным терапевтическим «окном», сохраняющие противоопухолевую активность 1. Химические модификации структуры 1, в частности селективное окисление боковой цепи агликона и последующее амидирование промежуточного продукта 1'-дез-(2,3-дигидрокси-н-бутироил)-1'-карбоксиоливомицина, позволили получить N-(2-диметиламиноэтил) амид 1'-дез-(2,3-дигидрокси-н-бутироил)-1'-карбоксиоливомицина (2).

Результаты. Противоопухолевый эффект 2 на моделях трансплантированных опухолей у лабораторных мышей достигнут в дозах, переносимых животными, что позволяет расценивать 2 как кандидата в лекарственные средства. В настоящем исследовании изучены механизмы действия 2 (в сопоставлении с 1) на культурах опухолевых клеток млекопитающих. Соединение 2 вызывало гибель опухолевых клеток различного гистогенеза (аденокарциномы молочной железы MCF-7, яичника SKOV-3, толстой кишки SW620 и HCT-116, рака легкого H460 и H1299, гемобластозов HL-60, Jurkat, K562, мягкотканых сарком MCH-7, Wehi-164, U2OS) в наномолярных концентрациях. Гибель сопро-

вождалась нарастанием доли апоптотических клеток (по данным проточной цитофлуориметрии с аннексин-ом V и пропидия йодидом) после 48–72 ч инкубации. Исследование распределения фаз клеточного цикла показало, что 2 (100 нМ) блокирует клетки в G1 и G2/M. При более высоких концентрациях (1 мкМ) клетки задерживаются в фазе репликации. Задержка клеточного цикла сопровождалась снижением содержания циклина D1 и c-Мус, однако экспрессия ингибиторов циклинзависимых киназ (p21, p27, p18) не увеличивалась, что позволяет использовать препарат на линиях клеток с инактивирующими мутациями этих белков.

Выводы. Сравнимая противоопухолевая активность при снижении общей токсичности позволяет рассматривать соединение 2 в качестве перспективного лекарственного кандидата для терапии.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
программы «Фарма-2020» Правительства РФ
(государственный контракт № 14. N08.12.0058
от 11.11.2015).*

Синтез и противоопухолевые свойства новых производных β-карболина

Д.С. Хачатрян¹, А.В. Колотаев¹, М.А. Барышникова²,
В.Н. Осипов^{1,2}, К.Р. Матевосян³

¹ФГУП «ИРЕА», Москва;

²НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

³ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический
университет им. Д.И. Менделеева», Москва

Введение. В литературе широко известны β-карболины, к классу которых относятся некоторые природные соединения, например алкалоиды, проявляющие мультиактивность (противомалярийную, противовирусную, противогрибковую и противоопухолевую [1–3], как например, гармин [4]). Исследования в области синтеза новых производных карболина постоянно расширяются, в связи с этим разработка методов синтеза новых производных, изучение их противоопухолевой активности представляются актуальной задачей.

Задачи исследования. Для поиска новых цитостатиков потребовалось получить ряд производных β-карболина из триптамина по реакции Пикте–Шпенглера с учетом ранее синтезированных нами нескольких ароматических альдегидов, несущих разнообразные фармакофорные гетероциклические заместители, полученных заменой атома хлора различными O-, N-, S-нуклеофилами (фенолы, вторичные амины, тиолы) [5].

Материалы и методы. Все полученные соединения охарактеризованы протонным магнитным резонансом, масс-спектрами и элементным анализом. Для оценки противоопухолевой активности использовали МТТ-тест.

Исследование проводили на клеточных линиях опухолей человека: карциномы толстой кишки HCT-116, карциномы предстательной железы PC-3, карциномы легкого A549, аденокарциномы молочной железы MCF-7, Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, полученных из Банка клеточных линий РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Активными считали соединения, у которых IC50 (ингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток) была ≤ 100 мкМ.

Результаты. Разработаны препаративные методики получения карболинов, содержащих гетероциклические фармакофорные заместители. Активность обнаружена у всех соединений. В концентрации 100 мкМ цитотоксичность > 82 % показали 12 соединений. В концентрации 10 мкМ на всех линиях клеток цитотоксичностью > 80 % обладали 10 соединений, а 2 соединения были цитотоксичны на 56–75 %. В концентрации 1 мкМ активность не обнаружена.

Выводы. На основе результатов анализа зависимости структура–активность были выбраны 4 наиболее перспективных соединения для дальнейших исследований.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 14.576.21.0044 от 05.08.2014).

1. Chourasiya R.K. et al. Med Chem Res 2013;22(6):2991–3001.
2. Wu W. et al. Antimicrob Agents Chemother 2015;59(1):356–64.
3. Daoud A. et al. Eur J Pharmacol 2014;724:219–30.
4. Chen Q. et al. Int J Cancer 2005;114(5):675–82.
5. Хачатрян Д.С. и др. Известия РАН. Серия химическая 2015;(2):395–404.

Влияние димерных бисбензимидазолов, содержащих пиперазиновый цикл в линкере, на метилирование ДНК в клетках рака молочной железы

Д.А. Храброва¹, Е.С. Громова¹, Н.Н. Вейко²,
В.Н. Ташлицкий¹, С.В. Костюк², М.А. Кваша¹, А.Л. Жузе³,
В.С. Коваль³, Е.С. Ершова², А.А. Иванов⁴

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

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва;

³ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

⁴ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Метилирование ДНК, осуществляемое ДНК-метилтрансферазами (МТаз), — одна из наиболее активно изучаемых эпигенетических модификаций, играющая важную роль в контроле экспрессии генов в клетках эукариот. В нормальных клетках создается свой профиль метилирования, однако в раковых клетках наблюдается гиперметилирование CpG-островков в промоторных областях генов-супрессоров опухолей.

Ингибиторы МТаз вызывают реактивацию этих генов, что позволяет их использовать в противоопухолевой терапии. Ранее в качестве ингибиторов МТаз нами были сконструированы димерные бисбензимидазолы с пиперазиновым циклом в олигометиленовом линкере между бисбензимидазольными фрагментами, DBP (n) (n — число метиленовых звеньев) [1]. Эти соединения растворимы в воде, и в микромолярных количествах ингибируют прокариотическую МТазу M.SssI.

Задачи исследования. Изучение влияния DBP (1–4) на метилирование ДНК в клетках рака молочной железы MCF-7. Исследовать проникновение DBP (1–4) в раковые клетки, оценить влияние DBP (1–4) на общий уровень метилирования геномной ДНК и степень метилирования промоторных участков нескольких генов, изучить возможность реактивации генов-супрессоров опухолей под действием DBP (1–4).

Материалы и методы. Проникновение DBP (1–4) в клетки MCF-7 анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Для оценки влияния DBP (1–4) на общее метилирование геномной ДНК использовали иммунофлуоресцентный и иммуноферментный анализы и метод UPLC/MS/MS. Метилирование промоторных областей генов *RARB* и *PTEN* определяли по расщеплению ДНК метилчувствительными эндонуклеазами. За экспрессией генов-супрессоров в клетках MCF-7 в присутствии DBP (1–4) следили, измеряя уровень матричной РНК с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Показано, что DBP (1–4) локализуются, главным образом, в ядрах раковых клеток. Эти соединения были обнаружены также в митохондриях; их влияния на окислительный стресс не наблюдалось. Продемонстрировано, что DBP (1–4) оказывают небольшой деметилирующий эффект на геномную ДНК в клетках MCF-7. Обнаружена способность DBP (1–4) уменьшать степень метилирования промоторных областей генов-супрессоров опухолей *RARB* и *PTEN*. Соединения DBP (2) и DBP (4) способствуют реэкспрессии генов *CDKN2A* и *RUNX3*, а DBP (1) — генов *CDKN2A*, *Apaf-1*, *RUNX3*, *APC* и *RARB*, «молчащих» в клетках MCF-7 из-за гиперметилирования промоторных областей.

Выводы. DBP (n), возможно, в дальнейшем могут быть использованы для подавления роста опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 6-04-01087).

1. Ivanov A.A., Koval V.S., Susova O.Yu. et al. DNA specific fluorescent symmetric dimeric bisbenzimidazoles DBP (n): the synthesis, spectral properties, and biological activity. Bioorg Med Chem Lett 2015;25(13):2634–8.

Синтез и оценка антипролиферативной активности аналогов комбретастина А-4

Л.В. Яминова¹, В.З. Ширинян², А.В. Ядыков¹, А.И. Маркосян³

¹ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», Москва;

²ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН», Москва;

³Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА, Ереван

Введение. Несмотря на существенный прогресс, достигнутый за последние десятилетия в разработке новых противоопухолевых препаратов, современная онкологическая наука и медицинская химия по-прежнему сталкиваются с проблемами контроля и лечения злокачественных опухолей человека. Одним из важных молекулярных мишеней для противоопухолевых препаратов является клеточный белок тубулин, обладающий уникальной способностью связывать низкомолекулярные лиганды. Среди таких лигандов, способных

связываться с колхициновым сайтом тубулина и ингибировать пролиферацию раковых клеток, особое место занимают аналоги комбретастина А-4, представляющие собою цис-стильбены, содержащие в качестве арильных остатков в основном метокси-производные ароматических и гетероароматических соединений.

Задачи исследования. Синтез и оценка противоопухолевой активности новых аналогов комбретастина А-4. Был синтезирован широкий ряд триарилдивинилкетонов 2 и на его основе получены производные циклопентенона 3 и дигидронафталина 4.

Материалы и методы. Применили общие методы органического синтеза, ядерного магнитного резонанса, масс-спектрометрию, МТТ-тест.

Результаты. Для оценки биологической активности проведено тестирование синтезированных соединений на 4 линиях опухолевых клеток человека: Т-клеточного лейкоза (Jurkat), карциномы легких (A549), рака кишечника (HCT-116) и аденокарциномы молочной железы (MCF-7).

Выводы. Проведена оценка как исходных дивинилкетонов, так и продуктов реакции, которая показала, что последние менее активны, чем исходные соединения.

Тезисы

Аминокислотный состав нового комплекса биологически активных веществ эриксин для лечения эстроген-негативных форм рака молочной железы

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

¹Ташкентская медицинская академия, Ташкент;

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

Введение. Эриксин — водный раствор комплекса биологически активных веществ (полипептидов и свободных аминокислот), а также микроэлементов, получаемых из биомассы змей *Eryx*. Препарат обладает биостимулирующим эффектом, повышает сопротивляемость организма к действию повреждающих факторов, оказывает специфическое лечебное действие, способствуя регрессии патологических очагов воспаления, нормализации или существенному улучшению лабораторных и биохимических показателей, а также количественных и функциональных параметров иммунной системы.

Задачи исследования. В целях исследования механизма действия препарата эриксин мы определили аминокислотный состав данного лекарственного средства.

Материалы и методы. Аминокислотный анализ проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Agilent Technologies 1200 (США).

Результаты. Проведенные исследования показали, что общее содержание аминокислот в препарате эриксин составляет 1103,482 мкг/г сухого вещества. Наибольшая доля аминокислот приходилась на глутаминовую кислоту (250,5766 мкг/г), треонин (204,1804 мкг/г), валин (109,0255 мкг/г), триптофан (90,44374 мкг/г), пролин (81,18231 мкг/г), лейцин (72,37258 мкг/г), аргинин (53,60088 мкг/г), изолейцин (50,33778 мкг/г), метионин (28,78033 мкг/г).

В настоящее время проводится интенсивное изучение фармакологических свойств аминокислот: исследуются фармакологические свойства фенилаланина, установлены терапевтические эффекты аденозил метионина при депрессии и таурина при коррекции артериального давления, ацетил цистеин анонсирован в качестве гепатопротектора и обнаружено иммуномодулирующее действие лизина, аргинин используется при эндотелиальной дисфункции и заживлении язв кожи, изучается действие аргинина на агрегацию тромбоцитов, расширяется терапевтический потенциал

триптофана и т. д. Также следует отметить воздействие активного деривата метионина (S-Adenosyl-L-methionine, SAME) на метилирование ДНК, что позволяет позиционировать SAME в качестве кандидата для фармакологического управления репарацией ДНК и профилактики неоплазм.

Выводы. Комплекс аминокислот, входящий в состав препарата эриксин, обуславливает его терапевтические свойства и позволяет реализовывать биостимулирующие эффекты, повышать сопротивляемость организма к действию повреждающих факторов. Наличие в комплексе аминокислот метионина может быть использовано в качестве регуляции репарацией ДНК и профилактики неоплазм, что требует в будущем проведения дополнительных исследований.

Подавление экспрессии белковых маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и признаков злокачественности в клетках рака кишечника человека низкими дозами противоопухолевых препаратов как один из новых механизмов эффективности низкодозовой метрономной химиотерапии больных раком толстой кишки

Н.А. Безденежных, О.А. Ковалева, А.А. Лихова,
В.Е. Жильчук, Ю.И. Кудрявец

Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев;
Ровенский онкологический диспансер, Ровно

Введение. Ранее мы показали, что режим метрономной низкодозовой (НД) терапии химиопрепаратами (ХП), особенно в сочетании с интерфероном альфа (ИФН-α), у пациентов с инкурабельным метастатическим колоректальным раком (мКРР) вызывает в ряде случаев регрессию метастазов в печень и значительно увеличивает их 3-летнюю выживаемость (Онкология, 2011). Одним из механизмов противоопухолевого эффекта метрономной НД терапии ХП было значительное снижение уровня VEGF в крови пациентов.

Задачи исследования. Выяснить характер прямого действия НД терапии ХП на злокачественность опухолевых клеток и их иммунофенотип.

Материалы и методы. Исследовали культуру клеток, применяли иммуногистохимический, цитогенетический и статистический методы. В экспериментах *in vitro* использовали модели клеток линий COLO 205 и HT-29, а также клеток мКРР человека на ранних пассажах (до 20).

Результаты. Мы показали, что прямое продолжительное действие (до 30 сут) НД терапии ХП и ИФН- α *in vitro* в концентрациях в 10–20 раз ниже LD50 модифицирует мезенхимальный фенотип клеток, значительно ингибирует клеточную пролиферацию и колониеобразование в агаре.

Инкубация клеток мКРР с иринотеканом, цисплатином и/или ИФН- α оказывает генотоксическое действие на клетки: значительно уменьшается количество делящихся клеток и клеток с тороподобным ядром, значительно увеличивается число клеток с микроядрами. Важно, что при длительном действии НД терапии ХП клетки мКРР не утрачивают свою чувствительность к ХП в дозах LD50.

Характерным признаком изменений в опухолевых клетках является практически полное подавление экспрессии фактора транскрипции EMT Slug и маркера опухолевых стволовых клеток CD44 при различных комбинациях препаратов. В монорежиме или в комбинации с ХП ИФН- α резко подавлял все признаки EMT.

Выводы. Одним из новых механизмов эффективности метронотной терапии больных мКРР может быть не только ее антиангиогенный эффект, но и генотоксическое действие НД терапии ХП и реверсия EMT в клетках мКРР с утратой их злокачественности.

Получение и анализ нового пептидного ингибитора Ras-ГТФазы

В.К. Боженко, Т.М. Кулинич

ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

Введение. Белок Ras является одной из ключевых молекул сигнального пути MAPK/ERK, ответственного, в частности, за деление и пролиферацию клеток. Мутации гена *KRAS*, приводящие к гиперактивации сигнального пути MAPK/ERK, встречаются в 25 % всех опухолей человека, что делает *KRAS* одним из наиболее важных онкогенов и, соответственно, мишенью для терапии. Также известно, что мутации *KRAS* делают неэффективной таргетную терапию, направленную на *BRAF*-мутантные формы рака.

Нами была получена оригинальная пептидная последовательность, обладающая ингибирующими свойствами в отношении Ras-ГТФазы.

Задачи исследования. Разработка нового противоопухолевого препарата — пептидного ингибитора Ras-ГТФазы.

Материалы и методы. Пептид был получен методом твердофазного синтеза. Цитотоксическая и цитостати-

ческая активности пептида исследовали *in vitro* на клеточных линиях злокачественных опухолей человека: HT-29, НСТ-116, SCOV, A549, MCF-7 с применением стандартных тестов (MTT-тест, ЛДГ-тест), метода проточной цитофлуориметрии (двойная окраска CFDA-SE/PI и двойная окраска AnnexinV-PI, позволяющие оценить уровень апоптоза), а также с помощью технологии online-мониторинга iCelligence.

Результаты. При оценке влияния последовательности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы на культуры клеток с использованием MTT- и ЛДГ-тестов было показано, что количество живых клеток во всех исследованных культурах уменьшается при увеличении концентрации ингибитора Ras-ГТФазы в диапазоне от 2 до 40 мкМ пропорционально внесенной концентрации и мало зависит от типа клеток. Низкие концентрации (2 и 5 мкМ) вызывают обратимый эффект, в то время как концентрации > 10 мкМ оказывают стойкий цитотоксический эффект. Также показано, что внесение в культуральную среду исследуемого пептида приводит к активации апоптоза. Наибольший проапоптотический эффект наблюдался в культурах A549 (аденокарцинома легкого), НСТ-116 и HT-29 (колоректальный рак). С помощью метода оценки жизнеспособности в реальном времени iCelligence показано, что концентрация 20 мкМ приводит к стойкому 100 % торможению пролиферации.

Выводы. Полученные результаты демонстрируют, что сконструированная пептидная последовательность обладает выраженными цитотоксическими и цитостатическими свойствами в отношении клеток злокачественных опухолей различного гистогенеза. При этом IC50 находится в диапазоне 5–20 мкМ и зависит от типа исследуемой культуры.

К механизму цитотоксического действия новых производных трополоновых алкалоидов К-50, К-60, К-61

З.М. Еникеева, А.А. Ибрагимов, А.Ч. Абдирова,
И.В. Карпышева

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

Введение. Исследования последних лет привели к формированию новых представлений о механизме гибели клеток, имеющих повреждения ДНК. Заметное нарушение систем репарации с отражением в повреждении ДНК приводят клетку к гибели в результате нарушения функций всех биохимических систем из-за невозможности полноценной транскрипции генов, содержащих дефекты в матрице ДНК.

Задачи исследования. Изучение влияния новых производных трополоновых алкалоидов К-50, К-60 и К-61, проявивших высокую противоопухолевую активность, на синтез ДНК, активность топоизомеразы II

и экспрессию мышинового гена лекарственной устойчивости *MDR2* на опухоли саркомы-180 по сравнению с этопозидом.

Материалы и методы. К суспензии клеток опухоли саркома-180 в 96-луночных планшетах добавляли препараты в концентрации 50 (К-50), 70 (К-60) и 22 (К-61) мкг/мл и инкубировали 2 ч при температуре 37 °С и 5 % углекислом газе (CO₂) в CO₂-инкубаторе, количество выделенных ДНК и РНК измеряли на спектрофотометре СФ-26. Межнуклеосомную деградацию ДНК оценивали посредством электрофореза ДНК в 1,5 % агарозном геле. Из опухолевой ткани под воздействием каждого препарата были получены тотальные препараты РНК, затем методом обратной транскриптазы были получены матричные РНК и синтезированы комплементарные ДНК (экспрессия *MDR2*/полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией).

Результаты. Синтез ДНК в опухоли саркомы-180 (*in vitro*) К-50, К-60, К-61 и этопозид ингибировали на 60, 75, 80 и 65 % соответственно. Синтез РНК опухоли К-50, К-60, К-61 и этопозид ингибировали на 70, 65, 70 и 54 % соответственно. Также наблюдается деградация межнуклеосомной ДНК под влиянием изучаемых препаратов на 80–90 %, под действием этопозид — на 70 %. Целостность ДНК зависит от активности топоизомеразы II, которая ингибирована на 55, 60 и 75 % препаратами К-50, К-60, К-61, под действием этопозид — на 55 %. Действие препаратов на экспрессию гена лекарственной устойчивости *MDR2* было следующим: К-50 — 20 %, К-60 — 22 %, К-61 — 15 % по сравнению с повышенным уровнем *MDR2* этопозид (35 %). При исследовании экспрессии опухолевого супрессора p53 опухоли *in vitro*, К-50, К-60, К-61 и этопозид ингибировали экспрессию p53 на 40, 35, 50 и 20 % соответственно.

Выводы. Противоопухолевые препараты К-50, К-60, К-61 способствуют низкому уровню развития множественной лекарственной устойчивости, по-видимому, из-за значительного ингибирования синтеза ДНК и РНК, межнуклеосомной деградации ДНК и активности топоизомеразы II.

*Работа поддержана грантом
Республики Узбекистан ФДСС 12.7.*

К изучению механизма радиосенсибилизирующего действия препаратов К-2 и К-19, полученных из колхамина

**Ш.Н. Ибрагимов, А.А. Ибрагимов, З.М. Еникеева,
А.Ч. Абдилова, Н.Б. Юсупова**

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

Задачи исследования. Изучение радиосенсибилизирующего действия новых противоопухолевых пре-

паратов, разработанных в РОНЦ им. Н.Н. Блохина, на животных с опухолями.

Материалы и методы. Опухоли животных облучали на аппарате Theratron мощностью 112 Гр/мин (источник кобальт-60) в тотальной разовой дозе, равной 6 и 3 Гр, а также в дозе 1,5 Гр 4-кратно или 1 Гр 3-кратно, защищая животных свинцовыми пластинами со специальным отверстием. Определяли противоопухолевую активность при однократном и многократном введении препарата совместно с облучением на животных-опухоленосителях. К суспензии клеток опухоли саркома 180 в 96-луночных планшетах добавляли препараты и инкубировали 2 ч при температуре 37 °С и 5 % углекислом газе (CO₂) в CO₂-инкубаторе. Затем количество выделенных ДНК и РНК измеряли на спектрофотометре СФ-26. Межнуклеосомную деградацию ДНК оценивали посредством электрофореза ДНК в 1,5 % агарозном геле. Из опухолевой ткани под воздействием каждого препарата были получены тотальные препараты РНК, затем методом обратной транскриптазы были получены матричные РНК и синтезированы комплементарные ДНК (экспрессия *MDR2*/полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией).

Результаты. При изучении на животных с опухолями препаратов К-2 и К-19 совместно с облучением найден режим их применения (доза, время введения до облучения и в схемах) при однократном и многократном введении. На мышах с саркомой-180 и солидной опухолью Эрлиха наибольшую активность препараты проявляют при воздействии за 16 ч до облучения, которая превышает действие облучения 4,5 и 6,0 Гр на 20–26 % при снижении уровня побочных эффектов облучения. Снижение дозы облучения до 3 Гр способствует потенцированию действия облучения на 60 %.

Выводы. Изученный эффект объясняется механизмом действия препаратов К-2 и К-19 — способностью воздействовать на синтез ДНК (фаза S) и синхронизировать клетки в фазе M + G₂, что показано цитофлуориметрическим методом и приводит к дальнейшему повреждению их облучением. Кроме того, способность препаратов снижать активность топоизомеразы II, которая ингибирована на 63 и 75 %, объясняет их более выраженное противоопухолевое и радиосенсибилизирующее действие.

*Работа поддержана грантом
Республики Узбекистан АДСС 15. 9.4.*

Доклиническое изучение токсичности нового противоопухолевого лекарственного средства – гликозидного производного индолокарбазола – ЛХС-1208

А.А. Николина, Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева,
В.А. Чалей, Н.П. Ермакова, В.М. Бухман

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

Введение. ЛХС-1208 — новый противоопухолевый препарат на основе гликозидного производного индо-локарбазола, разработанный в РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Задачи исследования. Изучение острой токсичности ЛХС-1208 на мелких животных и субхронической токсичности на крысах и собаках.

Материалы и методы. Работа проведена на 276 мышах линии В6D2F1 женского и мужского пола, 140 беспородных крысах женского и мужского пола и 4 собаках породы бигл. При изучении острой токсичности мышам препарат вводили однократно внутривенно (в/в) в диапазоне доз 35–175 мг/кг, крысам — 50–125 мг/кг; внутрибрюшинно (в/б) мышам — 50–200 мг/кг, крысам — 60–100 мг/кг. При изучении субхронической токсичности препарат вводили ежедневно 15-кратно крысам в/б в суммарных дозах 50, 100, 200 мг/кг, собакам — в/в в суммарных дозах 20 и 30 мг/кг. Крысы были выведены из эксперимента на 3-е и 30-е сутки, собаки — на 3-е и 60-е сутки.

Результаты. При в/в применении ЛХС-1208 мышам и крысам и при в/б введении крысам гибели животных не наблюдалось. Гибель мышей при в/б применении препарата наступала на 2–4-е сутки на фоне сосудистых нарушений. Расчетные токсические дозы при /б введении мышам: для самок ЛД₅₀—143 (134–170) мг/кг; для самцов ЛД₅₀—143 (136–159) мг/кг. После в/б применения препарата у мышей и крыс отмечено дозозависимое отставание прироста массы тела по сравнению с приростом массы тела контрольных животных. При изучении субхронической токсичности на крысах установлено, что препарат вызывал морфофункциональные изменения в сердечно-сосудистой системе. Наблюдалось отсутствие половых отличий для мелких лабораторных животных.

В условиях субхронического эксперимента на собаках отмечены внешние проявления интоксикации только после первого введения препарата в течение 5 мин: собаки трясали головой, наблюдались акты дефекации и мочеиспускания, состояние оглушенности, ступора, жажды, сокращение мышц живота, подергивание лап. ЛХС-1208 вызывал недозозависимое уменьшение количества тромбоцитов, оказывал недозозависимое влияние на углеводный обмен, функцию поджелудочной

железы и синтезирующую функцию печени, вызывал количественные и качественные изменения на электрокардиограмме собак. Морфологически в сердце собак, получавших препарат в суммарной дозе 30 мг/кг, на 3-е сутки опыта отмечены выраженные признаки очагового межжелудочного миокардита, не полностью обратимые к 60-м суткам опыта.

Выводы. Установлены лимитирующие виды токсичности для ЛХС-1208: кардиотоксичность, гематотоксичность (тромбоцитопения) и гепатотоксичность.

Трансляционные биохимические маркеры токсичности

Т.В. Осипова, В.М. Бухман

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

Введение. Использование трансляционных биохимических маркеров токсичности (ТБМТ) помогает принять правильное решение в ходе исследования, сократить время, снизить затраты, необходимые для разработки новых противоопухолевых препаратов и передачи их в клиническую практику. Традиционно в НИИ ЭДитО РОНЦ им. Н.Н. Блохина применяют ТБМТ, содержащиеся в сыворотке подопытных лабораторных животных.

Задачи исследования. Изучение современного состояния проблемы, связанной с использованием ТБМТ при доклиническом изучении токсичности новых лекарственных форм и комбинаций противоопухолевых препаратов.

Материалы и методы. Анализ современной научной литературы относительно роли ранее известных и вновь открытых ТБМТ.

Результаты. ТБМТ определяются во время доклинических испытаний и применяются на всех этапах исследования. На этапе трансляции результатов доклинических исследований клинический точный подбор ТБМТ необходим для помощи врачам в обеспечении максимальной безопасности пациентов на первых этапах клинических испытаний. ТБМТ должны обладать высокой чувствительностью и специфичностью, легко измеряться в реальном времени в легкодоступных биологических средах, одинаково оценивать процесс у лабораторных животных разных видов и человека, позволять сравнивать результаты клинических исследований с доклиническими. Во избежание ошибочных результатов ТБМТ должны быть тщательно валидированы и квалифицированы. Например, в настоящее время международный консорциум (Predictive Safety Testing Consortium, PSTC) рекомендует при оценке потенциальной нефротоксичности наряду с традиционными сывороточными ТБМТ внедрять панель ТБМТ, содержащихся в моче лабораторных животных (KIM-1, β 2-микроглобулин, цистатин С, кластерин, ttf-3 и др.).

Эти ТБМТ выявляют ранние структурные поражения в различных отделах нефрона и наряду с традици-

онными маркерами (сывороточный креатинин и азот мочевины крови) должны использоваться для оценки нефротоксичности препаратов.

Заключение. В настоящее время происходит внедрение рациональных комбинаций новых и традиционных ТБМТ в исследования, проводимые в НИИ ЭДиТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Бактериохлорины: от вещества до фотосенсибилизатора нового поколения

Е.А. Плотникова¹, М.А. Грин², Е.А. Лукьянец³,
Р.И. Якубовская¹

¹ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» — филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «Московский технологический университет», Москва;

³ФГУП «Государственный научный центр «НИОПИК», Москва

Введение. Метод фотодинамической терапии (ФДТ) активно применяется последние 30 лет в клинической практике при лечении злокачественных новообразований различной локализации. Официальные фотосенсибилизаторы (ФС) имеют спектр поглощения в области 660–685 нм. Проницаемость биологических тканей в этом диапазоне невелика и составляет всего несколько миллиметров, что позволяет лечить только поверхностные опухоли. Поэтому в настоящее время ведутся поиск и разработка новых ФС, поглощаемых в дальней красной и ближней инфракрасной областях спектра.

Задачи исследования. Медико-биологическое изучение субстанций бактериохлоринового ряда, поглощаемых в дальней красной и ближней инфракрасной областях спектра, и отбор высокоэффективной субстанции для создания нового препарата для ФДТ.

Материалы и методы. В качестве ФС исследованы вещества бактериохлоринового ряда природного ($\lambda_{\max} = 750\text{--}805$ нм) и синтетического ($\lambda_{\max} = 745\text{--}765$ нм) происхождения. Для отбора эффективной субстанции оценены фото-, физико-химические свойства, фотоиндуцированная активность и темновая цитотоксичность на панели опухолевых клеток различного генеза; способность проникновения и накопления в опухолевых клетках. Изучены динамика накопления красителей в опухолевой ткани и их биораспределение и эффективность ФДТ с ФС у мышей с опухолями S37, Colo26 и LLC малого (объем опухоли 125 ± 15 мм³) и большого (объем опухоли 420 ± 30 мм³) размеров.

Результаты. В результате проведенных исследований отобраны 2 субстанции: метиловый эфир О-пропилосим N-пропоксифактопурпуринимид ($\lambda_{\max} = 800$ нм) и синтетический мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин ($\lambda_{\max} = 747$ нм), которые не агрегируют

на протяжении длительного времени, фотостабильны, проникают в клетки и концентрируются в везикулярных клеточных структурах субмикронного размера, проявляют высокую фотоиндуцированную активность в отношении опухолевых клеток различного генеза (IC50 для клеток саркомы S37 составляет 100 и 32 нМ соответственно), селективно накапливаются в опухолевом очаге и быстро выводятся из организма, показывают высокую противоопухолевую эффективность при лечении мышей с опухолями малого и большого размеров (полная резорбция опухолевого очага и излеченность животных от 40 до 100 %).

Выводы. Из большого многообразия исследованных соединений отобраны 2 высокоэффективные субстанции, поглощающие в длинноволновой области спектра, позволяющие лечить опухоли большого размера и открывающие новые возможности для ФДТ.

Противоопухолевые гибридные соединения на основе стероидов

В.М. Ржезников¹, З.С. Смирнова², В.Н. Толкачев²,
Т.А. Федотчева³, Н.Л. Шимановский³

¹ФГБУ «Эндокринологический научный центр»,
Минздрава России, Москва;

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

³ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва

Гормонотерапия является одним из важнейших методов лечения рака молочной железы (РМЖ) и других гормонозависимых опухолей у женщин. В основе всех методов лежит принцип ингибирования стимулирующего действия эндогенных эстрогенов на клетки опухолей. Поэтому для лечения РМЖ применяют антиэстрогены, антагонисты ароматазы и гонадолиберин. Для усиления противоопухолевого действия антиэстрогенов исследователями из ЭНЦ и РОНЦ им. Н.Н. Блохина предложен новый тип веществ — антиэстрогеноцитостатики на основе гибридных структур, сочетающих антигормональное действие с цитотоксическим. Целевые структуры были синтезированы с использованием в качестве антигормонального фрагмента 11 α -ацетоксипроизводных эстрогена, эстрадиола и 17 α -этинилэстрадиола с антиэстрогенной активностью. Их конденсацией с известным цитостатиком хлорфенацилом получен ряд принципиально новых веществ, обладающих высоким противоопухолевым действием. Путем скрининга на моделях мышинных аденокарциномы молочной железы Са 755, саркомы Са-37, меланомы В-16, карциномы легкого LLC, а также индуцированной диметилбензантраценом опухоли молочной железы крыс отобран наиболее перспективный препарат с условным названием цитэстрол ацетат (ЦА). ЦА на указанных моделях опухолей показал тор-

можение роста опухоли от 80 до 99 %, а по силе и продолжительности действия превосходил тамоксифен. Препарат обладает хемосенсибилизирующим действием, в 3 раза усиливает активность доксорубина на культуре клеток РМЖ MCF-7/R, резистентной к доксорубину. Для выяснения механизма цитотоксического действия исследовано влияние ЦА на регуляцию апоптоза путем определения экспрессии матричной РНК белков BCL-2 и Вах в клетках MCF-7. Увеличение экспрессии Вах наряду со снижением таковой для BCL-2 свидетельствует о токсическом действии ЦА, вызывающем апоптоз опухолевых клеток. Высокое сродство (87 %) к эстрогенным рецепторам в клетках РМЖ позволяет предположить о возможности стероидного фрагмента ЦА выполнять функцию вектора направленного транспорта цитостатика в опухоль.

Механизм противоопухолевого действия ормустина *in vitro* на клетки линий диссеминированной меланомы человека

Н.С. Сапрыкина¹, Д.А. Афанасьева¹, В.П. Краснов²,
М.А. Барышникова¹

¹НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «Институт органического синтеза
им. И.Я. Постовского УрО РАН», Екатеринбург

Введение. Результаты изучения транспорта и метаболизма аминокислот и полиаминов в клетках позволили идентифицировать ряд биологических мишеней и метаболических путей, пригодных для последующего конструирования высокоселективных противоопухолевых препаратов. Ормустин — нитрозоалкилмочевинное производное аминокислоты L-орнитин — синтезирован в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН. В доклинических исследованиях *in vitro* и *in vivo* выявлена его высокая противоопухолевая активность.

Задачи исследования. Изучение механизма действия ормустина *in vitro*.

Материалы и методы. Лекарственная форма «ормустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» создана в лаборатории разработки лекарственных форм РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Исследование проводили на клеточных линиях диссеминированной меланомы человека (mel Kog, mel Ibr, mel Z, mel Mtp-X, mel Ch, mel Is), полученных в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Тип клеточной гибели определяли методом двойного окрашивания аннексином V-FITC и пропидием йодидом. Активность сигнальных путей апоптоза определяли по изменению уровня каспазы-3, -8, -9 в реакции иммунофлуоресценции с антителами к каспазам.

Результаты. Ормустин в IC50 через 24 ч инкубации вызывал апоптотическую гибель клеток всех исследованных линий (двойное окрашивание аннексином и пропидием йодидом), кроме mel Kog, где детектировали только окрашивание пропидием йодидом. При исследовании сигнальных путей апоптоза на линии mel Kog наблюдали активацию каспазы-8 и -9 и увеличение уровня активной каспазы-3 со временем инкубации. В клетках линий, у которых отсутствовала экспрессия рецептора внешнего пути апоптоза CD95 (mel Z, mel Mtp-X) отмечали высокий уровень активной каспазы-9 и снижение активных каспазы-8 и -3. В остальных клеточных линиях зафиксирован высокий уровень всех каспаз, что говорит о запуске как внешнего, так и митохондриального сигнальных путей апоптоза.

Выводы. Ормустин вызывает гибель клеток диссеминированной меланомы по механизму каспазозависимого апоптоза.

Работа выполнена в рамках
Государственного контракта 13411.1008799.13.163
от 12.07.2013 «Доклинические исследования
противоопухолевого лекарственного
средства класса нитрозомочевин».

Экспрессия и очистка рекомбинантного раково-тестикулярного антигена NY-ESO-1

Ю.П. Финашутина, В.А. Мисюрин, А.В. Мисюрин

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

Введение. Белок NY-ESO-1 относится к семейству NY-ESO-1/LAGE. Представители данного семейства — раково-тестикулярные антигены, не экспрессирующиеся в здоровых тканях, за исключением семенников. NY-ESO-1 является очень иммуногенным антигеном. Он способен индуцировать как гуморальный ответ, так и клеточный. Таким образом, белок NY-ESO-1 может быть подходящей мишенью для специфической иммунотерапии.

Задачи исследования. Получить высокоочищенный рекомбинантный раково-тестикулярный белок NY-ESO-1.

Материалы и методы. Кодировочная последовательность гена *NY-ESO-1* была искусственно синтезирована на основе 11 химически синтезированных фрагментов размером около 50 нуклеотидов (ЗАО «Евроген», Москва), методом 2-стадийной полимеразной цепной реакции. Далее кодирующая последовательность гена была клонирована в плазмиду pET-15b, и белок был экспрессирован в штамме *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. Подлинность нуклеотидной последовательности плазмиды и гена *NY-ESO-1* подтверждена прямым секвенированием по Сэнгеру. Рекомбинантный белок

NY-ESO-1 очищен с помощью металл-аффинной хроматографии.

Результаты. Нами получена искусственно синтезированная кодирующая последовательность гена *NY-ESO-1*. Также выделена плаزمид для экспрессии гена *NY-ESO-1* в бактериальных клетках на основе вектора pET-15b. Рекombинантный белок NY-ESO-1 был экспрессирован под контролем индуцируемого промотора в суспензионной культуре клеток *E. coli*. Подобраны условия для оптимальной экспрессии и очистки белка из бактериальных клеток. Выход целевого продукта составил 8 мг на литр бактериальной культуры. По данным электрофореза масса полученного продукта была ~18 кДа,

что соответствует массе природного белка NY-ESO-1. Чистота рекombинантного белка оценивалась по электрофореграмме и составила 96 %.

Выводы. Получен бактериальный продуцент рекombинантного человеческого антигена NY-ESO-1. Очищенный белок NY-ESO-1 может быть использован для широкого спектра исследований в онкологии и иммунологии, например для получения специфических антител. На основе рекombинантного белка NY-ESO-1 можно создавать противоопухолевые вакцины с применением адъювантов. Также с помощью этого белка можно оценивать специфический гуморальный ответ в сыворотке крови онкологических больных.

СЕКЦИЯ VII

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ

Доклады

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

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

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

Задачи исследования. Изучение характера распределения ERα, уровня экспрессии рецепторов эпидермального (EGFR) и трансформирующего факторов роста (TGF-βR1), их полиморфных вариантов для поиска взаимосвязи с эффективностью терапии тамоксифеном у 113 больных люминальным раком молочной железы.

Материалы и методы. У 37 пациенток отмечено прогрессирование заболевания на фоне приема тамоксифена (тамоксифен-резистентная группа), у 76 больных признаки прогрессирования отсутствовали (тамоксифен-чувствительная группа). Характер распределения ERα, а также уровень экспрессии EGFR и TGF-βR1 оценивали иммуногистохимическим методом. Полиморфизм генов *ESR1* (rs2228480, rs2077647), *EGFR*

(rs1468727), *TGF-βR1* (rs334354) был изучен с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Гетерогенный характер распределения ERα в опухоли был выявлен в 81,1 % наблюдений у пациенток с прогрессированием заболевания по сравнению с 56,6 % больных с благоприятным исходом ($p = 0,019$). Кроме того, носительство мутантного генотипа и аллеля гена *ESR1* (rs2228480) ассоциировано с резистентностью к терапии тамоксифеном ($p = 0,022$ и $p = 0,018$ соответственно). Показано, что уровень экспрессии EGFR значимо выше в тамоксифен-резистентной группе больных по сравнению с тамоксифен-чувствительной ($p = 0,007$). Напротив, высокие показатели экспрессии TGF-βR1 наблюдались в тамоксифен-чувствительной группе по сравнению с тамоксифен-резистентной ($p = 0,043$).

Выводы. Характер распределения ERα, уровень экспрессии EGFR и TGF-βR1, а также полиморфные варианты *ESR1* могут являться потенциальными молекулярно-генетическими маркерами эффективности терапии тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы.

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

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

С.В. Бойчук, А.Р. Галембикова, П.Д. Дунаев
ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань

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

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

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

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

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

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

Внеклеточные микроРНК крови и мочи в диагностике рака предстательной железы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Клеточные биочипы и возможности их применения для диагностики онкогематологических заболеваний

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Цитотоксический эффект антител против PRAME-экспрессирующих клеток

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

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

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

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

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

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

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

Поиск молекулярных маркеров для неинвазивной диагностики онкоурологических заболеваний

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

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

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

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

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

ных маркеров для неинвазивной диагностики основных онкоурологических заболеваний.

Материалы и методы. На 1-м этапе исследовали 29 образцов РНК, выделенной из осадка мочи пациентов с РПЖ (10 образцов), группу контроля составили 19 образцов ДГПЖ/ПИН и простатита. Экспрессию генов *PCA3* и *TMPRSS2:ERG* определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с TaqMan-зондами относительно эндогенного (*GAPDH*) и тканеспецифичного (*KLK3*) контролей. На 2-м этапе, используя полимеразную цепную реакцию с последующим секвенированием экзонов 7 и 10 *FGFR3*, исследовали 16 образцов осадков ДНК из осадков мочи больных РМП, группу контроля составили 24 пациента с циститом и мочекаменной болезнью.

Результаты. Гиперэкспрессия *PCA3* была характерна для РПЖ: диагностическая точность при пороговом значении ΔCt (*PCA3-KLK3*), равном 0,98, составила 84 % для осадков мочи. Экспрессия химерного онкогена *TMPRSS2:ERG* выявлена в 50 % случаев РПЖ и 17 % случаев ПИН, которая рассматривается как предраковое состояние. В 31 % случаев РМП обнаружены миссенс-мутации: с.746С→G (р.S249C), с.1124А→G (р.Y375C), с.1144G→C (р.G382R) и 2 случая с.1156T→C (р.F386L), в контрольной группе мутации *FGFR3* не выявлены.

Выводы. Показано, что анализ экспрессии и мутаций генов *PCA3*, *TMPRSS2:ERG* и *FGFR3* может быть использован как компонент неинвазивной диагностики РПЖ и РМП по осадку мочи.

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

Р.Б. Самсонов¹, Т.А. Штам², В.С. Бурдаков², А.В. Малек¹

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

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

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

Задачи исследования. Разработка технологии выделения и биохимического анализа циркулирующих

экзосом плазмы и оценка диагностической ценности метода.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Результаты. В образцах опухолей были найдены наследственные факторы риска: у 4 пациенток мутации в гене *TP53* (синдром Ли–Фраумени) и у 1 пациентки в гене *MSH6* (синдром Линча), а также патогенные соматические мутации в хорошо известных драйверных генах (*SMO*, *CTNNB1*, *CDKN1B*). Определено соответствие образцов опухолей подтипам классификации Лехмана. По результатам анализа были построены индивидуальные модели процессов, происходящих в опухоли, которые объясняют устойчивость к применяемой терапии.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Институт биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси, Минск;

ГБУЗ НО «Новосибирский областной клинический
онкологический диспансер», Новосибирск

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

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

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

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

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

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

Постеры

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

И.С. Березкина

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

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

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

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

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

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

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

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

Микрочастицы мочи как источник микроРНК для диагностики рака предстательной железы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

и клиническими признаками наследственного РМЖ, проходивших лечение в стационаре РНИОИ. Методом пиросеквенирования (PyroMark Q 24) был проведен анализ 6 мутаций в локусах генов *BRCA1/2*: 185delAG, 300T>G (C61G), 2080delA, 4154delA, 5382insC, 6174delT, входящих в коммерческую панель («BRCA-скрин», ИнтерЛабСервис, Россия). ДНК для исследования получена из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

D.A. Dalimova, Sh.U. Turdikulova

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

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

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

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

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

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

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

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

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

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

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

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

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

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

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

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

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

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»
Минздрава России, Москва

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

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

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

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

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

Экспериментальная модель энтерита при действии высоких доз 5-фторурацила

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

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

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

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

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

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

Материалы и методы. Исследования выполнены на мышцах-самцах C57BL/6 (18–22 г): группа I — интактные; группа II — 5-ФУ внутривентрально (в/б) ежедневно в дозе 100 мг/кг в течение 5 дней с последующей отменой; группа III — 5-ФУ в/б ежедневно в дозе 500 мг/кг, 5 дней. По 6 животных групп II и III выводили из эксперимента на 2-е и 6-е сутки после введения 5-ФУ. Исследования тонкой и толстой кишки проводили с помощью световой микроскопии, протеомного

анализа и изучали экспрессию генов методом полимеразной цепной реакции.

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

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

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

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

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

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

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

проживающих на территории Южного федерального округа.

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

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

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

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

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

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

ФГБУН «Институт проблем нефти и газа РАН», Москва

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии»
Минздрава России, Москва

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Не обнаружено достоверной корреляционной связи экспрессии BRCA1 и ЭР β .

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

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

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

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

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

Е.А. Шляхтунов

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Дизайн таргетной панели для диагностики рака щитовидной железы методом высокопроизводительного секвенирования

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Тезисы

Исследование эстроген-негативных форм рака молочной железы

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

¹Ташкентская медицинская академия, Ташкент;

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

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

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

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

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

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

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

IL-16 и VEGF в сыворотке крови при новообразованиях костей

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

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

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

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

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

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

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

Комплексная экспрессия раковых тестикулярных антигенов в клетках HeLa

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

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

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

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

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

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

Оценка влияния облучения на клетки постоянных и первичных линий глиобластом

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

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

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

полученных из операционного материала больных глиобластомой.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

А.А. Ковалева, Ю.И. Кудрявец

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

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

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

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

Выводы. Уменьшение стабильности хромосомного аппарата с комплексом определенных цитогенетиче-

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ключевые проангиогенные факторы у больных почечно-клеточным раком

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

²Ровенский областной онкологический диспансер, Ровно

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

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

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

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

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

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

Д.С. Кутилин, Я.С. Енин

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

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

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

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

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

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

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

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

Фосфодиэстеразы цНМФ – PDE4 – новые мишени для таргетной терапии опухолей

Г.Б. Лапа

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

Введение. Ранее нами показано, что соединения (LGB-014E, LGB-088 и др.), содержащие 3-амино-6,7-диметоксиизохинолиновый фрагмент, проявляли избирательную цитотоксичность к клеточным линиям HCT-116, Hke3, MOLT-4, K-562 на уровне IC₅₀ 2–0,5 μ M. Для дальнейшего улучшения цитотоксических и противоопухолевых свойств соединений этого ряда мы провели поиск их молекулярных мишеней. Проверка *in vitro* ряда молекулярных мишеней среди протеинкиназ, предсказанных *in silico* (PASS), не привела до сих пор к положительным результатам. Однако такая проверка молекулярных мишеней среди фосфодиэстераз (PDE) циклических нуклеотидов (цНМФ), также предсказанных *in silico*, привела к обнаружению изофермента PDE4B, аффинного для скринированных соединений.

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

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

Результаты. Данные литературы дают утвердительный ответ на поставленные вопросы. Описаны ингибиторы PDE4D, PDE5, PDE7A, а также PDE10, проявляющие противоопухолевые свойства в различных ксенографтах колоректального рака, опухолей центральной нервной системы, предстательной железы, моделях меланомы и ряде лейкозов. Данные литературы, а также изучение сигнальных каскадов *in silico* показывают, что ингибирование PDE4, повышение уровня циклического аденозинмонофосфата и активация протеинкиназы A влияют на RAS/CRAF/MEK/ERK-сигнальный каскад, снижая развитие и выживание ряда линий меланом, колоректальных типов рака (HCT116, Hke3), лейкозов (MOLT-4, K562) и других форм опухолей с мутациями RAS.

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

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

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

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

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

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

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

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

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

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

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

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

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

Мутации гена *VHL* в светлоклеточном раке почки

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Работа поддержана грантом RFMEFI60414X0118.

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

A. Mokran

Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod

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

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

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

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

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

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

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

A. Mokran

Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod

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

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

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

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

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

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

Идентификация циркулирующих опухолевых ДНК для ранней диагностики мелкоклеточного рака легкого

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

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

Задачи исследования. Поиск методов ранней диагностики МКРЛ.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Гипергомоцистеинемия у онкологических больных

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

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

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

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

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

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

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

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

Д.Г. Пасечник, М.И. Коган, З.М. Ахохов, А.А. Гусев

Кафедра урологии и репродуктивного здоровья человека
с курсом детской урологии-андрологии ФПК и ППС
ФГБОУ ВО «Ростовский государственный
медицинский университет» Минздрава России,
Ростов-на-Дону

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

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

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

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

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

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

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

Е.А. Пономаренко, Е.А. Дудко, Т.А. Богущ, Д.В. Новиков,
О.М. Рябинина, Е.А. Богущ, Б.Е. Полоцкий,
М.И. Давыдов, М.М. Давыдов

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

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

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

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

Результаты

1. Экспрессия ЭРβ выявлена во всех образцах НМРЛ, ЭРа — только в 89 % опухолей.

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

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

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

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

Выводы

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

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

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

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

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

левания во многом зависит от степени дифференцировки опухолевой клетки.

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

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

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

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

Роль beclin-зависимой аутофагии в защитном эффекте терафала от токсичности доксорубина для клеток эритролейкоза K562

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

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

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

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

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

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

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

Исследование эффективности соединения T1023 в защите нормальных тканей

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

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

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

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

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

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

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

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

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

С.Ю. Смирнов, К.Н. Батура, М.В. Якимова, Т.А. Чехович,
Е.А. Гутковская, А.М. Пашкевич, И.В. Ануфриенко,
Ю.В. Гуляева, Е.И. Субоч, Р.М. Смолякова, В.Т. Кохнюк

ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии
и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»,
аггородок Лесной, Минский район

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ных раком, пограничными и доброкачественными новообразованиями яичников.

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

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

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

Новые мутации в гене кальретикулина CALR при диагностике миелопролиферативных заболеваний

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

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

²ООО «ГеноТехнология», Москва;

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

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

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

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

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

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

Анализ статуса мутаций *EGFR* при аденокарциноме легкого

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

БУЗОО «Клинический онкологический диспансер», Омск

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Возможности и перспективы биохимической диагностики нейроэндокринных опухолей

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

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

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

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

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

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

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

Изучение ингибиторов и активаторов плазминогена в опухолях щитовидной железы

Т.Ю. Харитиди, И.А. Казанцева

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ных люминальным В и трижды негативным субтипами рака молочной железы.

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

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

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

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

Генетические особенности увеальной меланомы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Введение. Саркомы костей — агрессивные злокачественные опухоли, склонные к быстрому метастазированию, при этом известно, что в механизмах инвазии и метастазирования опухолей активное участие принимают матриксные металлопротеиназы (ММП).

Задачи исследования. Анализ содержания ММП-2, ММП-7, ММП-9 и их тканевого ингибитора ТИМП-1 в сыворотке крови больных первичными опухолями костей.

Материалы и методы. Обследовали 54 больных с различными гистологическими вариантами опухолей костей в возрасте от 14 до 59 лет. ТИМП-1 определяли в сыворотке крови до лечения методом иммуноферментного анализа (Biosource, США), ММП-2, ММП-7, ММП-9 (R&D, США). Статистический анализ результатов проводили с помощью программы Statistica 8 (Statsoft, США).

Результаты. Показано, что медианы ММП-2 в сыворотке крови у практически здоровых людей (196 нг/мл) и больных опухолями костей (160 нг/мл) не различались и не зависели от гистологического строения опухолей. Не выявлено достоверных различий в сывороточных уровнях ММП-7 между больными опухолями костей и контрольной группой. Однако при анализе значений маркера с учетом гистологического строения опухоли достоверные отличия отмечены в уровне ММП-7 между пациентами с гигантоклеточными опухолями (3,4 нг/мл) и саркомой Юинга (2,6 нг/мл; $p < 0,05$). Обнаружено достоверное повышение содержания ММП-9 в сыворотке крови в контроле (501 нг/мл) относительно общей группы (377 нг/мл; $p < 0,05$). Отмечены достоверные различия в содержании ММП-9 между больными хондросаркомой (311 нг/мл) и периостальной остеосаркомой (552 нг/мл; $p < 0,05$). Сывороточные уровни ТИМП-1 не зависели от пола, возраста, локализации и размера опухолей костей. Медианы ТИМП-1 были достоверно выше при типичной (484 нг/мл; $p < 0,038$) и периостальной (609 нг/мл; $p < 0,007$) остеосаркомах по сравнению с контролем (436 нг/мл). Наиболее низкие показатели общей 5-летней выживаемости (33 %) выявлены в группе больных с сывороточными уровнями ММП-2 < 160 нг/мл и ММП-9 > 377 нг/мл.

Выводы. Представленные данные могут служить предметом дальнейших исследований по определению клинической значимости уровней ММП-2, ММП-7, ММП-9 и ТИМП-1 в прогнозе клинического течения различных гистологических вариантов сарком костей.

Полногеномный анализ рака полости рта и глотки

О.В. Шаньгина, В.А. Юрченко, Д.М. Максимович,
Д.Г. Заридзе

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Полногеномный анализ 6034 больных раком полости рта и глотки и 6585 практически здоровых лиц (контрольная группа) выявил 8 локусов, влияющих на риск развития рака этих органов ($p < 5 \times 10^{-8}$). Причем 7 из них были выявлены впервые. Обнаружена

статистически достоверная связь между риском рака полости рта и глотки и локусами на хромосомах 6p21.32 (rs3828805, HLA-DQB1) (относительный риск (ОР) 1,28), 10q26.13 (rs201982221, LHPP) (ОР 1,67) и 11p15.4 (rs1453414, OR52N2-TRIM5) (ОР 1,19). Подтвержден протективный эффект полиморфизма локуса на хромосоме 4q23 (rs1229984, ADH1B) (ОР 0,56). Два новых участка хромосом 2p23.3 (rs6547741, GPN1) (ОР 0,83) и 9q34.12 (rs928674, LAMC3) (ОР 1,24), а также 2 уже известных локуса на хромосомах 9p21.3 (rs8181047, CDKN2B-AS1) (ОР 1,24) и 5p15.33 (rs10462706, CLPT-M1L) (ОР 0,74) были ассоциированы с раком полости рта.

Риск развития рака ротоглотки был связан только с генами человеческого лейкоцитарного антигена (HLA). Классический анализ аллелей *HLA* показал, что гаплотипы II класса *HLA* DRB1*1301-HLA-DQA1*0103-HLA-DQB1*0603 (ОР 0,59) играют защитную роль в развитии рака ротоглотки. При дополнительной стратификации больных раком ротоглотки по статусу инфицированности вирусом папилломы человека (ВПЧ) было обнаружено, что защитная роль этих антигенов с риском рака ротоглотки была значительно сильнее у ВПЧ-положительных больных (ОР 0,23), чем у ВПЧ-отрицательных лиц (ОР 0,75).

Полногеномный анализ рака полости рта и глотки выявил новые локусы, полиморфизм которых ассоциирован с предрасположенностью к развитию опухолей данной локализации.

Разработка системы анализа генетических данных, полученных методом высокопроизводительного секвенирования, для диагностики онкопатологий и подбора таргетной терапии

Л.В. Шаталова, Д.И. Борисевич, Д.О. Коростин,
В.В. Ильинский

ООО «Генотек», Москва;
ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН»,
Москва

Введение. Онкологические заболевания являются одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Таргетная терапия онкопатологий обладает значительным потенциалом, однако для ее применения необходимо развитие своевременных методов диагностики, основанных на молекулярных методах анализа опухолей. Перспективным направлением является использование методов высокопроизводительного секвенирования ДНК (NGS) опухолей. Для эффективного применения данного подхода необходима разработка программных комплексов для обработки

данных NGS в реальном времени в целях получения результатов, необходимых для прогнозирования эффективности таргетной терапии.

Задачи исследования. Разработать комплекс алгоритмов и программного обеспечения для обработки и интерпретации генетических данных опухолей, полученных методом NGS.

Материалы и методы. В работе использованы математические алгоритмы, обеспечивающие идентификацию мутаций при обработке генетических данных и оценивающие функциональный эффект наличия мутации, эволюционную консервативность сайта, где произошла мутация, а также степень ассоциации гена с развитием злокачественных опухолей и наличие для него таргетных лекарственных противоопухолевых препаратов.

Результаты. Было разработано программное обеспечение (ПО) на языке программирования Python. Для анализа эффективности ПО отсекарованы и проанализированы 2 типа рака — 8 пар образцов рака предстательной железы и 9 пар образцов аденокарциномы желудка — в сравнении с контрольными образцами морфологически неизменной ткани соответствующего органа тех же пациентов.

В результате работы ПО из тысяч детектированных мутаций на 1 образец отбирается до 8 соматических коротких мутаций, до 1 инсерции или делеции протяженного участка и до 3 транслокаций. Среди генов, в которых обнаружены мутации, присутствуют гены, являющиеся типичными онкомаркерами, такие как *TP53*, *APC*, *NF1*, что подтверждает работоспособность системы. Для генов с наибольшим числом обнаруженных мутаций *CHEK2* и *ATM* были найдены лекарственные средства, чувствительность к которым снижалась при наличии мутаций в данных генах с $FDR < 5\%$.

Выводы. Нами было разработано ПО, способное выполнять автоматическую биоинформатическую обработку генетических данных образцов опухолей и выявлять драйверные мутации, связанные с развитием опухолей и затрагивающие гены, ассоциированные с чувствительностью к уже существующим, а также к перспективным препаратам для таргетной терапии опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (идентификатор соглашения RFMEFI60716X0152).

Новый опухолевый супрессор почечно-клеточного рака

М.С. Шитова, О.В. Ковалева, О.Р. Назарова,
Д.К. Малаева, Ю.Г. Кжышкова, А.Н. Грачев

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва;

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

Введение. За 2 последних десятилетия во всем мире наблюдается неуклонный рост заболеваемости раком почки. В России данная патология занимает 10-е место по частоте встречаемости среди злокачественных новообразований, и несмотря на большое количество исследований ее этиология остается до конца не выясненной. С уверенностью можно сказать, что рак почки по-прежнему является достаточно сложным заболеванием как в диагностическом, так и в терапевтическом плане. Выявление новых диагностических или прогностических факторов рака почки — одно из основных направлений современной молекулярной онкоурологии. Ранее нами был обнаружен белок CLTAP, претендующий на роль опухолевого супрессора почечно-клеточной карциномы.

Задачи исследования. Исследование экспрессии белка CLTAP в различных типах опухолей почки методом иммуногистохимии, а также анализ его диагностического и терапевтического потенциала.

Материалы и методы. Образцы тканей почечно-клеточной карциномы, а также соответствующих морфологически нормальных тканей получены от пациентов, оперированных в 2009–2014 гг. по поводу рака почки в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Весь материал проходил гистологическую верификацию и охарактеризован в соответствии с TNM-классификацией. Анализ экспрессии CLTAP в образцах почечно-клеточной карциномы на уровне белка проводился методом иммуногистохимии.

Результаты. На предыдущем этапе исследований, проведенных методом количественной полимеразной цепной реакции, показано, что уровень экспрессии мРНК CLTAP в почечно-клеточных опухолях снижен более чем в 50 раз по сравнению с нормальной тканью. В данной работе мы проанализировали экспрессию белка CLTAP методом иммуногистохимии в 71 образце тканей опухолей почки и 20 образцах тканей нормальной почки. Из 71 исследуемого образца 66 составляли светлоклеточные карциномы (42 образца I–II степени градации по Фурману, 24 образца — III–IV степени), 4 образца папиллярного рака и 1 образец хромофобного рака. Во всех исследованных образцах опухолей отмечена потеря экспрессии исследуемого белка. В 20 исследованных образцах условно нормальной ткани почки экспрессия CLTAP была выявлена во всех исследованных образцах.

Выводы. Проведенное исследование подтверждает потерю экспрессии белка CLTAP в почечно-клеточных карциномах и указывает на то, что данный белок функционирует как классический опухолевый супрессор.

Потеря его экспрессии происходит непосредственно в процессе опухолевой трансформации и не зависит от клинико-морфологических характеристик опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-15-00396).

Сигнальные пути эпителиально-мезенхимального перехода и регуляторы ангиогенеза в опухолях молочной железы

А.М. Щербаков¹, О.Г. Овсий², Е.С. Герштейн¹,
Л.К. Овчинникова¹, В.Д. Ермилова¹, Г.П. Генс¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва

Введение. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) — комплексный процесс изменения фенотипа клеток от эпителиального к мезенхимальному. Центральным событием в инициации ЭМП является активация транскрипционных факторов семейства Snail — SNAI1 и SNAI2/SLUG, которые вызывают снижение синтеза белка Е-кадгерина и последующее ослабление клеточных контактов. Представляет интерес исследование взаимосвязи ЭМП с другими сигнальными путями при раке молочной железы (РМЖ).

Задачи исследования. Оценка уровня экспрессии белков SNAI1, SNAI2, NF-κB (одного из коактиваторов Snail), VEGF и его рецепторов 1-го и 2-го типов в опухолях больных РМЖ.

Материалы и методы. Иммуногистохимическим методом (ИГХ) в 157 образцах РМЖ выполнен анализ SNAI1, SNAI2, NF-κB, VEGF-А и его рецепторов (VEGFR1, VEGFR2), Ki67 и HER2/neu. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0 (StatSoft).

Результаты. Уровни экспрессии SNAI1 и SNAI2 в опухоли достоверно положительно коррелировали ($R = 0,55$; $p < 0,05$), что может указывать на одновременный синтез этих белков-регуляторов ЭМП в РМЖ. Опухоли со средней и высокой экспрессией SNAI2 составили суммарно более 65 % наблюдений, экспрессия SNAI1 была менее выраженной: преобладали опухоли, в которых этот белок не выявлен. Транскрипционный фактор NF-κB (один из основных коактиваторов Snail) содержался приблизительно в половине образцов РМЖ, при этом уровни экспрессии NF-κB и SNAI1, а также SNAI2 достоверно коррелировали ($R = 0,54$ и $0,46$ соответственно; $p < 0,05$). Оценка взаимосвязи экспрессии белков-регуляторов ЭМП и компонентов VEGF-сигнального пути продемонстрировала следующие тенденции: уровень экспрессии как SNAI1, так и SNAI2 достоверно и положительно взаимосвязан с уровнем экспрессии VEGFR1 (в обоих случаях $R = 0,44$; $p < 0,05$). Корреляционная взаимосвязь уровней экс-

прессии VEGFR2 с экспрессией SNAI1 и SNAI2 также имеет выраженный положительный характер ($R = 0,53$ и $0,51$ соответственно; $p < 0,05$). Более чем в 100 случаях выявлена коэкспрессия VEGFR2 и SNAI2. Таким образом, при РМЖ прослеживается координированная активация белков-регуляторов ЭМП и основных компонентов VEGF-сигнального пути.

Выводы. Впервые на клиническом материале продемонстрирована координированная активация белков-регуляторов ЭМП (Snail) и основных компонентов VEGF-сигнального пути при РМЖ. Представленные результаты могут свидетельствовать о важной роли процессов ЭМП в регуляции неоангиогенеза.

Пересмотр фундаментальных представлений о раке тела матки: от дуализма к большому разнообразию в применении к механизмам канцерогенеза, типам заболевания и вариантам терапии

Л.М. Берштейн, И.В. Берлев, А.Н. Балтрукова

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова»,
Санкт-Петербург, пос. Песочный

Рак тела матки (РТМ) принадлежит к числу ведущих онкогинекологических новообразований. Многолетняя оценка ситуации в этой области вынуждает искать как причины роста частоты заболеваемости, так и подходы к ограничению числа болеющих женщин и случаев, характеризующихся большей агрессивностью. В отношении характеристик опухолевого процесса удалось установить, что в противоположность британским данным о нарастании в последние годы преимущественно эндометриоидных с благоприятным течением новообразований, по собственным предварительным наблюдениям, имеются сведения об увеличении доли опухолей с экспрессией HER2/neu, что может способствовать более раннему прогрессированию заболевания и сочетанию с повреждением/меньшей способностью к репарации ДНК. Не исключено, что таким карциномам присущ сдвиг в сторону большего образования генотоксических метаболитов классических эстрогенов. В то же время среди больных РТМ в комбинации с избыточной массой тела выявлено постепенное относительное увеличение доли женщин с признаками инсулинорезистентности, что сочетается с более высокой клинической стадией заболевания в отсутствие большей выраженности признаков системной генотоксичности. Благодаря применению современных высокотехнологичных методов лабораторного анализа формируется представление о существовании не 2 (т. е. дуалистической модели), как казалось ранее, а большего числа типов рака эндометрия, что законо-

мерным образом ведет к созданию современных его молекулярно-биологических классификаций (учитывающих, в частности, представленность в опухоли мутаций гена ДНК полимеразы POLE_epsilon и микросателлитной нестабильности) и, как можно надеяться, к оптимизации клинической практики. Соответственно, упомянутые и другие накапливающиеся материалы позволяют наметить мишени (как в эндометрии, так и вне его) для предупредительных и терапевтических воздействий, в том числе, и специфической природы применительно к отдельным подтипам РТМ, как это уже реализуется при раке молочной железы. Среди внеэндометриальных мишеней системного характера, в отношении каждой из которых продолжается поиск «сдерживающих» средств, следует назвать, во-первых, стероидную, а также 2 нестероидные — сопряженную с гормонально-метаболическими нарушениями по типу упоминавшейся инсулинорезистентности и воспалительно-цитокиновую (прогенотоксическую). Применительно к последней речь, в частности, может идти о восстановлении в опухолевой и жировой тканях гомеостатического баланса про- и противовоспалительных липидных медиаторов на основе молекул типа резольвина, протектина и марезина и их производных, что как в области онкогинекологии, так и онкологии в целом пока обсуждается в недостаточной степени. Дополнение представлений о гормоноассоциированных факторах риска, прогноза и чувствительности к терапии этого заболевания с учетом роли провоспалительного/антивоспалительного гомеостата указывает на необходимость поиска доступных оценке маркеров этой системы, в том числе ассоциированных с состоянием генома (включая профиль мутаций онкогенов и генов-супрессоров) как у больных с нормальной массой тела, так и с различными подтипами ожирения. Все это открывает значительное поле деятельности в целях оптимизации мер по предупреждению и лечению РТМ и пониманию механизмов эндометриального канцерогенеза.

Рак эндометрия и фенотипы ожирения: генетический и генотоксический компонент

Л.М. Берштейн, А.Г. Иевлева, Т.Е. Порошина,
Е.А. Туркевич, И.М. Коваленко

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова»,
Санкт-Петербург, пос. Песочный

Введение. Хотя избыточная масса тела является широко известным фактором риска развития рака эндометрия (РЭ), далеко не всегда учитывается факт гетерогенности ожирения (в частности, подразделения его на метаболически здоровое ожирение (МЗО), т. е. не имеющее выраженных гормонально-метаболических нарушений, и стандартное ожирение (СО), сочетающееся с симптомокомплексом инсулинорезистент-

ности). Помимо этого, неясно, в силу чего у больных РЭ с СО клиническая стадия опухолевого процесса более продвинута, чем у больных с МЗО (ЛМБ и др., 2015), и вовлечены ли в формирование потенциальных связей различных фенотипов ожирения со стадией и дифференцировкой карцином эндометрия в период установления диагноза такие параметры, как состояние генома и признаки системного генотоксического повреждения.

Материалы и методы. В исследование были включены ранее нелеченные больные РЭ ($n = 70-110$ в зависимости от использованного метода), преимущественно находящиеся в постменопаузальном периоде (средний возраст 60,2 года). В опухолевой ткани иммуногистохимическим методом исследовали экспрессию HER2/neu и онкосупрессора PTEN ($n = 70$). В ДНК, выделенной из мононуклеаров венозной крови, взятой натощак, методом полимеразной цепной реакции определяли представленность полиморфных вариантов генов *FTO*, *rs9939609* и рецептора лептина *LEPR Gln223Arg* ($n = 110$), а также длину теломер ($n = 110$). С использованием мононуклеаров из той же крови и с применением Comet assay оценивали в автоматизированном варианте момент хвоста комет и долю ДНК в хвосте ($n = 70$), а в сыворотке крови тех же больных методом иммуноферментного анализа определяли уровень 8-ОН-дезоксигуанозина (8-ОН-dG, $n = 87$), интерлейкина 6 (ИЛ-6, $n = 79$) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α , $n = 79$).

Результаты. По средним данным, различия между группами СО и МЗО (в пользу СО) продемонстрировали лишь уровень ИЛ-6 в сыворотке крови и представленность генотипа AA над генотипом TT (полиморфизм *FTO*); при МЗО в отличие от СО генотип GG превалировал над генотипом AA (полиморфизм *LEPR Gln223Arg*). С более высокой стадией РЭ коррелировали длина теломер в мононуклеарах (МЗО, тенденция (Т)), экспрессия HER2/neu в опухоли (МЗО, Т) и содержание ИЛ-6 в сыворотке крови (СО, достоверно (Д)), а с менее продвинутой стадией — доля ДНК в хвосте комет (МЗО, Т), экспрессия PTEN в опухоли (МЗО, Т) и длина теломер (СО, Т). Корреляция с более низкой степенью дифференцировки опухолевой ткани оказалась свойственна уровню 8-ОН-dG в крови (МЗО, Т) и моменту хвоста комет (СО, Т), а с более высокой дифференцировкой коррелировали длина теломер (МЗО, Т) и экспрессия PTEN в опухолевой ткани (СО, Д).

Выводы. Корреляции исследованных параметров оказались более «логичными» в отношении дифференцировки опухоли, и эта «логика» была в равной степени присуща больным РЭ с СО и МЗО. Обращает на себя внимание, что различия между группами СО и МЗО по средним данным и в отношении связи с большей клинической стадией опухолевого процесса были свойственны уровню ИЛ-6, являющемуся маркером не только прогенотоксического, но и провоспалительного сдвига.

Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (грант № 15-04-00384).

Циркулирующие антитела и копии ДНК вируса Эпштейна–Барр в качестве биомаркеров рака носоглотки в неэндемичном регионе

**В.Э. Гурцевич, Н.Б. Сениота, В.Н. Кондратова,
А.В. Игнатова, М.В. Ломая, М.А. Кропотов,
А.М. Мудунов, А.В. Лихтенштейн**

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), относящийся к семейству герпес-вирусов человека, обладает уникальными биологическими свойствами. Им инфицировано практически все население планеты, как правило без каких-либо клинических проявлений. В то же время ВЭБ — признанный этиологический агент для ряда злокачественных заболеваний. Среди них особое место занимает рак носоглотки (РНГ), в возникновении которого ВЭБ играет ключевую роль, стимулируя прогрессирование патологического процесса от предраковых поражений до появления злокачественной опухоли. Еще одна особенность вируса состоит в отличающейся частоте вызываемых им патологий в различных географических регионах и этнических группах. Так, наиболее часто РНГ диагностируют в южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии, несколько реже — в арабских странах Северной Африки и на Аляске. Россия относится к неэндемичным регионам с уровнем заболеваемости РНГ, составляющим десятые доли процента от числа солидных опухолей, регистрируемых в стране.

Исследованиями, проведенными в эндемичных регионах, доказано, что у больных РНГ возникновение заболевания сопровождается повышенными титрами гуморальных антител к ВЭБ, которые поднимаются до высоких уровней еще в доклинической фазе болезни.

При этом обнаружение антител, относящихся к группе иммуноглобулинов (Ig) класса А, против капсидного антигена ВЭБ (ВКА), широко используется для скрининга РНГ в эндемичных по этому заболеванию южных провинциях Китая, Гонконга, Сингапура и Малайзии.

В последнее время наблюдается нарастающий интерес к тестированию в плазме крови нуклеиновых кислот, ассоциированных с опухолью, в качестве метода, способствующего раннему выявлению рака и мониторингу опухолевого процесса. При этом в эндемичных регионах ДНК ВЭБ в плазме крови больных РНГ является одним из наиболее изученных опухолевых маркеров, количественное определение которого представляется полезным для идентификации остаточной клинически скрытой опухоли после проведенной терапии и для прогнозирования эффективности лечения.

С учетом вышесказанного цель настоящего исследования состояла в сравнительной оценке клинической значимости уровней гуморальных антител к комплексу антигенов ВЭБ (IgG- и IgA-антител к ВКА; IgG-антител к раннему антигену) и числа копий ДНК-вируса в плазме больных РНГ в неэндемичном регионе — России. При этом впервые предстояло выяснить, какой из изучаемых маркеров наиболее полезен для диагностики РНГ и оценки клинического статуса больных после проведенной химиолучевой терапии. Результаты исследований свидетельствуют о том, что оба плазменных маркера — IgA-антитела к ВКА и ДНК ВЭБ могут быть успешно использованы для диагностики нРНГ в России и, по-видимому, в любом неэндемичном по РНГ регионе. Однако число копий ДНК-вируса в плазме больных является более чувствительным и специфическим маркером, более точно отражающим эффективность проведенной терапии, а также состояние ремиссии или рецидива болезни.

Информация для авторов

Уважаемые коллеги!

При оформлении статей, направляемых в журнал «Успехи молекулярной онкологии», следует руководствоваться **правилами**:

1. Статья должна быть представлена в электронном виде (в отдельных файлах: текст статьи со списком литературы, таблицы, графики, рисунки, подписи к рисункам, резюме) на адрес: **adv.mol.onc@ronc.ru**.

Шрифт – Times New Roman, 14 пунктов, через 1,5 интервала. Все страницы должны быть пронумерованы.

2. На первой странице должно быть указано: название статьи, инициалы и фамилии всех авторов, полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа, **его (их) полный адрес с указанием индекса**.

Обязательно указывается, в каком учреждении работает каждый из авторов.

В конце статьи должны быть обязательно приведены **контактные телефоны, рабочий адрес с указанием индекса, адрес электронной почты и фамилия, имя, отчество полностью, занимаемая должность, ученая степень, ученое звание автора (авторов)**, с которым редакция будет вести переписку.

3. Объем статей: оригинальная статья – не более 12 страниц; мини-обзоры – не более 5 страниц; обзор литературы – не более 30 страниц; краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

Структура оригинальной статьи: введение, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, заключение (выводы).

К статьям должно быть приложено **резюме** на русском и английском языках, отражающее содержание работы, с названием статьи, фамилиями и инициалами авторов, названием учреждений; **для оригинальных статей – структурированное резюме (введение, материалы и методы, результаты и т. д.)**. Объем резюме – не более 2000 знаков с пробелами. Количество **ключевых слов** должно составлять от 3 до 10.

4. Иллюстративный материал:

- Фотографии должны быть контрастными; рисунки, графики и диаграммы – четкими.

- Фотографии представляются в электронном виде в формате TIFF, JPG, CMYK с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

- Графики, схемы и рисунки должны быть представлены в формате MS PowerPoint.

- Все рисунки должны быть пронумерованы. Подписи к рисункам даются на отдельном листе. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения и обозначения, использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписи к рисунку.

- Все таблицы должны быть пронумерованы, иметь название. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице.

- Ссылки на таблицы, рисунки и другие иллюстративные материалы приводятся в надлежащих местах по тексту статьи в круглых скобках.

5. Единицы измерений даются в СИ.

- Все сокращения (аббревиатуры) в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом употреблении. Использование не общепринятых сокращений не допускается.

- Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

6. К статье должен быть приложен список цитируемой литературы, оформленный следующим образом:

- Список ссылок приводится **в порядке цитирования**. Все источники должны быть пронумерованы, а их нумерация – строго соответствовать нумерации в тексте статьи. Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

- Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» – в английском тексте).

- При ссылке **на статьи из журналов** указывают также название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, DOI, PMID. Например: Ornitz D.M., Xu J., Colvin J.S. et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. J Biol Chem 1996;271(25):15292–7.

- При ссылке **на монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания. Например: Joël C.A. Fertility disturbances in men and women: a textbook with special reference to etiology, diagnosis and treatment. Basel: Karger, 1971.

- При ссылке **на данные, полученные из Интернета**, указывают электронный адрес цитируемого источника. Например:

- Федянин М.Ю., Хмелькова Д.Н., Серебрянская Т.С. и др. Рецепторы фактора роста фибробластов при злокачественных опухолях. Злокачественные опухоли 2014;(4). [Fedyanin M.Yu., Khmelkova D.N., Serebriyskaya T.S. et al. Receptors of fibroblast growth factor at malignant tumours. Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumours 2014;(4). (In Russ.)].

- Доступно по: <http://www.malignanttumours.org/>. [Available at: <http://www.malignanttumours.org/>. (In Russ.)].

- Все ссылки на литературные источники печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например, [5]).

- Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательное **не более 30 источников**, в обзорах литературы – **не более 100**.

7. Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

8. Все статьи, в том числе подготовленные аспирантами и соискателями ученой степени кандидата наук по результатам собственных исследований, принимаются к печати в ускоренном порядке.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Все поступающие статьи рецензируются.

Присланные материалы обратно не возвращаются.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

