

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



*МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ
«Молекулярная онкология:
итоги и перспективы»*

16–17 декабря 2015 г., Москва

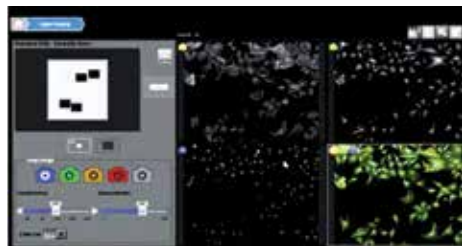
ТОМ 2 № 4
2015



Cytell™ —

Цитофлуориметр,
микроскоп

и счетчик клеток в одной системе



- ❖ Стандартные плашки от 6 до 384 лунок, слайды, чашки Петри (35, 60, 100 мм), матрасы (T-25, T-75)
- ❖ Источник освещения: твердотельный для флуоресценции, светодиодный для проходящего света
- ❖ Каналы флуоресценции (возбуждение/эмиссия):
 - Синий: 390/430 нм
 - Зеленый: 473/512.5 нм
 - Оранжевый: 544/588 нм
 - Красный: 631/702 нм
- ❖ 14-бит CCD-камера, 2.8 Мегапикс.
- ❖ Автоматическая смена объективов в 2-х позициях:
 - 10×/NA=0.45 - для высокого разрешения
 - 4×/NA=0.2 - широкопольный объектив
- ❖ Лазерная и контрастная автофокусировка
- ❖ Автоматизированный контроль движения платформы по X-Y-Z осям.
- ❖ Управляющая система: предустановленное на компьютере «тач скрин» (HP™ 8300, Windows 7, 64-бит) программное обеспечение BioApps (автоматизированное цифровое изображение, исследование клеточного цикла, жизнеспособности клеток, подсчет клеток, редактор карты плашки, системный «бэкап»), сохранение данных в формате .tiff, .jpg, .pdf, и .csv.
- ❖ Не требует инсталляции

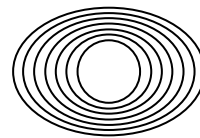
Быстрый 4-стадийный анализ клеток:



С 2014 г. журнал «Успехи молекулярной онкологии» включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор

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 2014 Г.

4 ТОМ 2
'15

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

Редактор В.Е. Ефремова
Корректор В.А. Наумкина
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.
2015. Том 2. № 4. 1–90

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2015

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» — 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Тверская Фабрика Печати»
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 Наталия 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, заведующий лабораторией механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)
- Карпухин Александр Васильевич**, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (Москва, Россия)
- Киселёв Фёдор Львович**, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией молекулярной биологии вирусов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)
- 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 Наталия 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)
- 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., руководитель лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)
- Чердынцева Надежда Викторовна**, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии ФГБНУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии» (Томск, Россия)

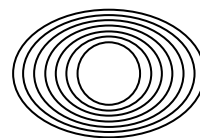
РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

- 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, 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.

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

Zhorovskaya 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. 2
'15

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

Editor V.E. Efremova

Proofreader V.A. Naumkina

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. 2015. Vol. 2.
No. 4. 1—90

© PH "ABV-Press", 2015

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Tver Printing Factory

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, 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)

Kissel'ov Fedor L., PhD, DSc, Associate Member of RAS, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Biology of Viruses of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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)

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, Leading Researcher 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, 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, NY, 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)



microtesty.ru

Микротесты б.м.в.

ООО «МИКРОТЕСТЫ В БИОЛОГИИ, МЕДИЦИНЕ, ВЕТЕРИНАРИИ»



поставки качественных реактивов:

- антитела для диагностики и научных исследований,
- зонды для FISH, CISH,
- микроРНК зонды,
- расходные материалы, буферы для гистологии, ИГХ, гибридизации in situ,
- системы детекции Nichirei (для работы с тканями человека, мыши, крысы),
- положительные контрольные стекла, отрицательные контрольные сыворотки для решения широкого спектра задач по выявлению, мониторингу и прогнозированию опухолей, исследованию опухолевого метастазирования, дифференциальной опухолевой диагностике, идентификации вирусов и пр.

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОНКОЛОГИЯ: ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ»

Секция I	
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА.	10
Секция II	
НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ВИРУСОВ И ИХ РОЛИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОПУХОЛЕЙ.	21
Секция III	
БИОЛОГИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ, РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ.	28
Секция IV	
СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ.	34
Секция V	
ГЕНОМИКА И ЭПИГЕНОМИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ: ОТ ЭКСПЕРИМЕНТА К ПРАКТИКЕ.	41
Секция VI	
НОВЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ.	56

MATERIALS OF THE CONFERENCE “MOLECULAR ONCOLOGY: RESULTS AND PROSPECTS”**Section I**

MOLECULAR MECHANISMS OF CARCINOGENESIS.....	10
--	-----------

Section II

NEW APPROACHES TO STUDYING VIRUSES AND THEIR ROLE IN THE PATHOGENESIS OF TUMORS.....	21
---	-----------

Section III

TUMOR BIOLOGY AND METASTASIS, ROLE OF CELL MICROENVIRONMENT	28
--	-----------

Section IV

SIGNAL CASCADES IN TUMOR CELLS	34
---	-----------

Section V

CANCER GENOMICS AND EPIGENOMICS: FROM EXPERIMENT TO PRACTICE	41
---	-----------

Section VI

NOVEL METHODS AND APPROACHES IN THE MOLECULAR DIAGNOSIS AND THERAPY OF TUMORS	56
--	-----------

КУРСЫ IRCAD/EITS 2015 г.



Это возможность в короткие сроки повысить профессиональный уровень, овладеть новыми методами и развить навыки малоинвазивной хирургии

Курсы лапароскопической и роботизированной хирургии Европейского института телехирургии IRCAD/EITS (Страсбург, Франция) признаны ведущими мировыми специалистами образцом организации учебного процесса. Они одобрены Европейским советом аккредитации непрерывного медицинского образования (EACCME) и институтом Европейского союза медицинских специалистов.

Программа включает теорию и практические сессии. Во время курсов проводятся интерактивные сессии между экспертами и учащимися.

Компания «Медицина Сегодня» обладает солидным опытом в обучении медицинского персонала в России и за рубежом, ее сотрудники возьмут на себя все организационные вопросы: регистрацию, визы, билеты и проживание.

20%
СКИДКА

от стоимости регистрации предоставляется членам обществ:
Российского общества онкоурологов,
Российского общества специалистов по опухолям головы и шеи,
Общества специалистов по онкологической колопроктологии,
Российского общества детских онкологов,
Общества специалистов по нервно-мышечным болезням

Зарегистрироваться и получить подробную программу
можно на сайте www.mctoday.ru
и по электронной почте: info@protiv-raka.ru.

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

«Молекулярная онкология: итоги и перспективы»

16–17 декабря 2015 г., Москва

MATERIALS OF THE CONFERENCE

“Molecular Oncology: Results and Prospects”

Moscow, 16–17 December 2015

Секция I

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Использование компьютерной модели регуляторки щитовидной железы в изучении механизмов клеточной гибели и злокачественного роста клеток фолликула

А.А. Абдувалиев¹, М.С. Гильдиева²,
М. Сайдалиева³, М.Б. Хидирова³

¹Ташкентская медицинская академия,
Республика Узбекистан;

²Республиканский онкологический научный центр Минздрава
Республики Узбекистан, Ташкент;

³Центр разработки программных продуктов и аппаратно-
программных комплексов при Ташкентском университете
информационных технологий, Республика Узбекистан

В работе рассматриваются некоторые результаты анализа клеточных механизмов функционирования фолликула щитовидной железы (ФСЖ) методами математического и компьютерного моделирования. Эти исследования направлены на определение основных закономерностей возникновения, развития и установления различных форм злокачественных новообразований, а также на выявление эффективных мер профилактики и возможных путей управления раковым процессом в организме.

Математическое моделирование клеточных процессов ФСЖ осуществляется на основе твердо установленных биологических закономерностей относительно механизмов управления функционированием клеточных сообществ, кооперативного характера биологических процессов, эффекта ингибирования конечным продуктом и особенностей комбинированной обратной связи жизненных явлений. В качестве класса математических уравнений для количественного анализа закономерностей функционирования клеточной системы ФСЖ использованы функционально-дифференциальные уравнения регуляторики

функциональной единицы клеточных сообществ многоклеточных организмов.

Существующие медико-биологические экспериментальные данные и теоретические положения о структурно-функциональной организации щитовидной железы на клеточном уровне позволяют строить математические модели для количественного анализа регуляторики численности клеточного сообщества ФСЖ в норме и при патологиях на основе метода моделирования регуляторных механизмов живых систем и уравнений регуляторики клеточных сообществ. Наши модельные исследования показали, что хронический рост значения параметра размножения приводит к аномальному поведению численности клеточного сообщества ФСЖ: нарушается стационарное состояние, возникают автоколебания с переходом к нерегулярным колебаниям с непредсказуемым размножением клеток ФСЖ и далее — к эффекту «черной дыры», т. е. резкому срыву колебательных решений. Нерегулярные колебания и «черная дыра» идентифицируются неконтролируемым размножением и резким деструктивным изменением численности клеток ФСЖ.

Работа поддержана Комитетом по координации развития науки и технологий при Кабинете министров Республики Узбекистан (грант № F4-FA-F006).

Перспективы фармакологической регуляции mTOR и IGF-1 для профилактики преждевременного старения и рака

В.Н. Анисимов

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

Диетические вмешательства, имитирующие хроническое ограничение калорийности питания, в настоящее время рассматриваются как наиболее пер-

спективные средства для применения в клинической практике в качестве геропротекторов. К ним относятся препараты, угнетающие передачу сигналов в системах гормон роста — инсулин — инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) — глюкоза, а также в системе, опосредованной белком-мишенью рапамицина (mTOR) млекопитающих и S6-киназой; препараты, активирующие аденозинмонофосфат-зависимую киназу (AMPK) или специфические белки семейства сиртуинов. Протеинкиназа mTOR играет ключевую роль в регуляции роста и клеточного деления у эукариот при воздействии нутриентов (аминокислот, глюкозы, жирных кислот) и митогенов (IGF-1 и инсулина); стимулирует рост клеток, вызывает их гипертрофию, активирует HIF-1-зависимую транскрипцию, включая транскрипцию VEGF и COX-1, активирует секрецию PAI-1, VEGF, IGF-1, FGF, MMP и других биоактивных молекул. Активация mTOR — необходимое условие для достижения клетками состояния старения (cell senescence). Торможение или полная блокада mTOR, достигаемая с помощью генетических модификаций, сопровождается увеличением продолжительности жизни у дрожжей, нематод, плодовых мушек и мышей. Предполагают, что mTOR является ключевым звеном в реализации увеличивающего продолжительность жизни действия диеты с ограниченной калорийностью у различных видов живых организмов (от дрожжей до обезьяны). Как было показано в 65 экспериментах на лабораторных животных, миметики диеты с ограниченной калорийностью — антидиабетические бигуаниды (фенформин, буформин и метформин) — в 86 % случаев тормозили развитие спонтанных и индуцируемых различными агентами опухолей у грызунов. Антиканцерогенный эффект бигуанидов был выявлен в отношении общей частоты опухолей и новообразований в 17 тканях-мишенях при использовании 17 линий мышей (аутбредных, линейных, трансгенных, нокаутных), 4 линий крыс и 1 линии хомячков, 16 химических канцерогенов прямого и непрямого действия различных классов (полициклических ароматических углеводородов, нитрозосоединений, эстрогенов), ионизирующей радиации, вирусов, специальной высокожировой диеты при различных протоколах их воздействия, включая двухстадийную модель канцерогенеза, при разных дозах, режимах и способах введения бигуанидов (с кормом, с питьевой водой, зондированием, инъекционно) и начале их введения в разном возрасте. В 14 % случаев бигуаниды не оказали антиканцерогенного эффекта. Стимуляция канцерогенеза бигуанидами не наблюдалась ни в одной модели. Таким образом, имеются существенные доказательства способности метформина и других антидиабетических бигуанидов предупреждать развитие опухолей. Введение антибиотика рапамицина, угнетающего активность протеинкиназы mTOR, а также генетические модификации, выключающие ее активность, оказывали антиканцерогенный и геропротекторный эффект

у грызунов. В последние годы установлено, что применение метформина на 25–40 % снижает риск злокачественных новообразований многих локализаций и увеличивает продолжительность жизни у больных сахарным диабетом 2-го типа. В настоящее время идут и планируются новые клинические испытания геропротекторной активности метформина у лиц без диабета.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ) (гранты № 14-04-01653/14 и № 15-04-50841).

Клеточная линия HeLa-TI как потенциальная система скрининга ксенобиотиков на эпигенетическую активность

**А.Ю. Бейзер^{1,2}, И.А. Хитрово¹, Л.Р. Тилова¹,
Е.А. Лесовая^{1,3}, А.Ю. Портянникова¹, Г.А. Белицкий¹,
М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов¹**

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова»;

³ГБОУ ВПО «Рязанский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России

В настоящее время эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов рассматриваются в качестве связующего звена между окружающей средой и геномом. Изменение эпигенетического статуса клетки при воздействии факторов окружающей среды может нарушить основные клеточные процессы и привести в конечном счете к неопластической трансформации и развитию опухоли. В качестве экзогенных агентов, способных оказывать влияние на основные компоненты системы эпигенетической регуляции транскрипции генов, могут выступать как различные компоненты питания и фармакологические препараты, так и экологические факторы. Ранее нашим отделом впервые был предложен метод скрининга эпигенетически активных соединений на модельной системе клеток человека (HeLa), несущих ретровирусный геном с интегрированным в него эпигенетически репрессированным флуоресцентным белком GFP.

Основной целью данной работы являлось исследование возможности использования данной модельной системы для изучения эпигенетических эффектов ксенобиотиков, подвергающихся в организме метаболической активации.

Для оценки состояния ферментативной системы метаболизма ксенобиотиков в клетках линии HeLa-TI были проведены: 1) исследование конститутивного и индуцированного уровней экспрессии мРНК основных изоформ цитохрома P450; 2) оценка генотоксического эффекта ряда проканцерогенных веществ на

клетки HeLa-TI; 3) изучение динамики метаболизма проканцерогенного бенз(а)пирена в клетках HeLa-TI.

С использованием спектрально-флуоресцентного метода мы продемонстрировали, что остаточное количество бенз(а)пирена в среде было обратно пропорционально плотности посадки клеток и времени инкубации. Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени была показана конститутивная экспрессия целого ряда изоформ цитохрома P450 в клетках HeLa-TI, а также повышение уровня мРНК данных ферментов под действием соответствующих индукторов микросомных монооксигеназ. Генотоксический эффект циклофосамида, 3-метилхолантрена, бенз(а)пирена и *орто*-аминоазотолуола, выявленный при помощи метода ДНК-комет, свидетельствовал о функциональной активности микросомных монооксигеназ.

Полученные данные говорят о наличии в клетках линии HeLa-TI активной системы метаболизма проканцерогенов, что позволяет использовать данную клеточную линию при изучении эффектов ксенобиотиков без применения внешних метаболических смесей (например, микросомальной фракции печени крыс S9).

Производные этил-2-амино-пиррол-3-карбоновой кислоты влияют на полимеризацию тубулина, индуцируют арест опухолевых клеток в G2/M-фазе клеточного цикла и ингибируют их пролиферацию *in vitro*

А.Р. Галембикова¹, С.С. Зыкова², С.В. Бойчук¹,
Б.Р. Рамазанов¹, Р.Р. Хуснутдинов¹

¹ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России;

²ФКОУ ВПО «Пермский институт Федеральной службы исполнения наказаний России»

Исследована активность 27 соединений, относящихся к производным этил-2-амино-пиррол-3-карбоновой кислоты (АПК). Цитотоксическую активность АПК оценивали MTS-тестом на различных опухолевых клеточных линиях: лейомиосаркома SK-LMS-1, рабдомиосаркома RD, гастроинтестинальная стромальная опухоль GIST T-1, остеосаркома U-2 OS, а также саркома Юинга A673.

Обнаружено, что 2 соединения, именуемые в дальнейшем АПК-20 и АПК-24, существенно снижали жизнеспособность клеток различных типов сарком мягких тканей, остеосарком, а также гастроинтестинальных стромальных опухолей *in vitro*. Цитотоксическое действие АПК-20 и АПК-24 было время- и дозозависимым.

Результаты иммуноблоттинга свидетельствовали о том, что под влиянием АПК в опухолевых клетках

происходило повышение экспрессии гистона H2AX, фосфорилированного по Ser139. Тем не менее данное изменение не сопровождалось активацией ATM- и ATR-опосредованных путей активации. Эффект АПК был обусловлен исключительно активацией сигнального пути DNA-PK и Chk2-опосредованным механизмом фосфорилирования H2AX в M-фазе клеточного цикла.

Результаты проточной цитометрии подтвердили накопление опухолевых клеток в G2/M-фазе клеточного цикла, а увеличение количества pH3 (Ser10)-позитивных клеток (по данным проточной цитометрии и иммунофлуоресцентной микроскопии) после воздействия АПК свидетельствовало об их накоплении в M-фазе.

Для изучения влияния АПК на динамическое состояние микротрубочек был проведен тест на полимеризацию тубулина *in vitro*, показавший способность АПК-20 и АПК-24 дозозависимо ингибировать процесс полимеризации тубулина.

Результатом воздействия АПК на опухолевые клетки явилось усиление их гибели по механизму апоптоза, о чем свидетельствовало значительное время- и дозозависимое повышение уровня экспрессии расщепленных форм каспазы-3 и поли-(аденозиндифосфатрибоза)-полимеразы по сравнению с контролем.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 13-04-00255).

Влияние постоянного освещения и мелатонина на уровень синтеза часового белка CRY1 в опухолях кожи у мышей SHR

Е.А. Губарева¹, А.В. Панченко¹, М.А. Майдин¹,
И.А. Виноградова²

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

²ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

Актуальность. Нарушение суточных ритмов увеличивает риск развития опухолей различных локализаций. Освещение ночью блокирует синтез мелатонина, гормона эпифиза, синхронизирующего ритмы периферических осцилляторов с центральным. За поддержание циркадианных ритмов на клеточном уровне отвечает система часовых генов и белков, экспрессия которых изменяется при канцерогенезе. Влияние постоянного освещения и введения экзогенного мелатонина на экспрессию часовых генов в опухолях и нормальных периферических тканях мало изучено.

Целью исследования было изучение влияния постоянного освещения и мелатонина на уровень синтеза часового белка CRY1 в нормальной коже и опухолевой ткани.

Материалы и методы. В опытах использовали мышей-самцов SHR в возрасте 14 месяцев. Животных

поместили в условия 12-часовой смены дня и ночи (группа LD) или постоянного освещения (группа LL), часть из них при этом получала мелатонин (группы LDMT и LLMT) в ночное время с питьевой водой. Животным на кожу спины 2 раза в неделю в течение 2 нед наносили диметилбензантрацен (ДМБА), а затем 12-0-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат (ТФА) до конца эксперимента, в контроле наносили ацетон. Анализ экспрессии белка CRY1 проводили иммуногистохимическим методом в 10 образцах кожи и опухолей от животных каждой группы. На микрофотографиях подсчитывали процент позитивно окрашенных ядер в базальном слое кожи и папиллом в программе ImageJ (NIH, США). Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием U-критерия Манна–Уитни и t-критерия Стьюдента в программе MS Excel 2013.

Результаты. Выявлено статистически достоверное увеличение числа животных с опухолями в группе LL по сравнению с LD ($p = 0,0476$) и снижение в группе LLMT по сравнению с LL ($p = 0,0383$). Процент ядер, экспрессирующих CRY1, в коже достоверно не различался между контрольными группами (LD – $41 \pm 5,22$ % и LL – $39 \pm 3,54$ %), тогда как в коже с места аппликации канцерогена он был достоверно ниже во всех группах: LD – $24,96 \pm 4,65$ % ($p = 0,0001$), LL – $28,36 \pm 3,15$ % ($p = 0,0007$), LDMT – $29,36 \pm 4,86$ % ($p = 0,002$), LLMT – $24,38 \pm 3,36$ % ($p = 0,002$). Статистически значимое снижение процента позитивно окрашенных ядер было выявлено в опухолях по сравнению с кожей во всех группах: LD – $17,96 \pm 4,72$ % ($p = 0,0002$), LL – $18,5 \pm 5,09$ % ($p = 0,0008$), LDMT – $20,08 \pm 3,84$ % ($p = 0,001$), LLMT – $17,69 \pm 3,40$ % ($p = 0,0001$). В коже с места аппликации процент позитивно окрашенных ядер достоверно различался при разных режимах освещения ($p_{LL-LD} = 0,0002$; $p_{LLMT-LDMT} = 0,003$), а также при введении мелатонина ($p_{LD-LDMT} = 0,01$; $p_{LL-LLMT} = 0,002$). В опухолях при нормальном освещении введение мелатонина не влияло на экспрессию CRY1, тогда как при постоянном освещении у животных, получавших мелатонин, процент позитивно окрашенных ядер был достоверно выше ($p = 0,0007$).

Выводы. 1. Постоянное освещение стимулирует канцерогенез кожи, вызванный ДМБА и ТФА. 2. Воздействие на кожу канцерогена и постоянное освещение существенно изменяют уровень синтеза часового белка CRY1. 3. В условиях постоянного освещения уровень синтеза белка CRY1 в опухолях кожи повышается при введении мелатонина.

Связь морфологического разнообразия рака молочной железы с хромосомными нарушениями и опухолевой стволовостью: взгляд на механизмы опухолевой эволюции

Е.В. Денисов^{1,2}, Н.А. Скрябин^{2,3}, Л.А. Таширева¹,
Т.С. Геращенко^{1,2}, М.В. Завьялова^{1,2},
Н.В. Чердынцева^{1,2}, В.М. Перельмутер¹

¹ФГБНУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии»;

²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской генетики», Томск

Принято считать, что рак молочной железы (РМЖ) является эволюционно-адаптивной системой, клеточный состав которой меняется во времени под влиянием факторов опухолевой природы, микроокружения и терапии. При РМЖ описано 5 типов морфологических структур (тубулярные, альвеолярные, солидные, трабекулярные и дискретные), представляющих различные пространственные формирования опухолевых клеток, наличие и количественный состав которых в значительной степени варьируют как от случая к случаю, так и в пределах одной опухоли. В данной работе мы попытались понять, насколько внутриопухолевая морфологическая гетерогенность РМЖ связана с хромосомными aberrациями (ХА) и наличием опухолевых стволовых клеток (ОСК), и проследить ее филогенез в контексте опухолевой эволюции. В исследование было включено 35 пациенток с РМЖ, использованы лазерная микродиссекция, микроматричная сравнительная геномная гибридизация, иммунофлуоресцентный анализ и стандартные статистические подходы. Результаты исследования показали, что разные морфологические структуры характеризовались вариабельностью по ХА, однако их количество в большинстве случаев не зависело от типа структур. Не было найдено общих ХА для всех структур, что может говорить о том, что более мелкие aberrации (например, мутации в генах) выступают в роли первичных предковых мутаций. Кроме того, не было идентифицировано специфических ХА для разных типов структур. В частности, кластерный анализ показал отсутствие схожести структур одного типа по ХА. Процент ОСК варьировал между разными структурами от преобладания в солидных и альвеолярных до полного отсутствия в дискретных. На основании вышесказанного, а также по данным филогенетического анализа мы заключили, что формирование морфологического разнообразия (как и, вероятно, появление общего предкового опухолевого клона) РМЖ не связано с ХА, происходит либо локально

и независимо в пределах анализируемых участков опухоли, либо носит хаотический характер и может зависеть от ОСК.

Исследование выполнено за счет Российского научного фонда (РНФ) (грант № 14-15-00318).

Влияние препаратов, полученных из трополоновых алкалоидов, на активность топоизомераз I и II, межнуклеосомную деградацию ДНК и множественную лекарственную устойчивость клеток дрожжей *S. cerevisiae*

А.А. Ибрагимов, О. Касымов, З.М. Еникеева,
А.Ч. Абдирова, Ш.Н. Ибрагимов

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

В исследованиях фундаментальной онкологии при изучении развития фенотипов множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) показано, что в культивируемых клетках, резистентных за счет топоизомеразы II, обнаруживается либо снижение активности этого фермента, либо уменьшение его количества (Kurosawa M., Okabe M., 1996).

Целью исследования было сравнение новых цитостатиков Дэквина, К-19 и К-20, полученных модификацией трополоновых алкалоидов, с этопозидом и доксорубицином при влиянии на МЛУ, активность топоизомераз и межнуклеосомную деградацию ДНК на модели клеток дрожжей *S. cerevisiae*.

Материалы и методы. В эксперименте в чашках Петри использовали интактную твердую среду для дрожжей *S. cerevisiae*, на которой высевали клетки после суточного культивирования в присутствии соответствующего противоопухолевого препарата. Эффективность воздействия препаратов на рост исследуемых клеток оценивали по количеству колоний. Активность топоизомераз I, II и межнуклеосомную деградацию ДНК определяли методом электрофореза ДНК клеток исследуемых вариантов в 1,5 % агарозном геле.

Результаты. Показано заметное преодоление лекарственной устойчивости К-19 и Дэквином — на 57 и 45 % соответственно. Для К-20 и доксорубицина этот показатель был меньше — по 33 %. Этопозид, наоборот, стимулировал рост резистентных клеток на 75 %.

Процент ингибирования топоизомераз I и II был наиболее высоким при воздействии Дэквина — 74 %. Также высокий процент ингибирования топоизомераз (63–68 %) показан для К-19, К-20 и этопозиды, который является известным ингибитором топоизомеразы II и имеет субстратную специфичность к лекарственным транспортерам Pgp/Pdr5p. Доксорубицин ингиби-

вал активность топоизомераз на 41 %. На электрофореграмме показано, что все исследуемые соединения и препараты сравнения способствуют высокой деградации ДНК (65–70 %), наблюдается фрагментация ДНК в виде шлейфа по сравнению с интактной нативной ДНК.

Выводы. Дэквин и К-19 заметно преодолевают МЛУ. При применении терапевтических доз К-19, К-20 и Дэквина наблюдается более выраженное ингибирование активности топоизомеразы II по сравнению с этопозидом.

Работа выполнена при поддержке гранта ФДСС 12.7.

Изменения уровня TNF-α и его растворимого рецептора sTNF-RI в клетках шейки матки при дис- и неопластической трансформации

Е.В. Каюкова, Б.С. Хышиктуев

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России

Известно, что TNF-α является провоспалительным цитокином, играющим важную роль во многих звеньях канцерогенеза. Его эффекты плеiotропны. С одной стороны, он оказывает цитотоксическое действие, активизирует апоптоз, участвует в дифференцировке клеток, межклеточном взаимодействии; с другой — способствует опухолевой прогрессии, иммунной агрессии в патологическом очаге. Доказано, что увеличение уровня TNF-α является неблагоприятным фактором, указывающим на прогрессирование злокачественного процесса, что коррелирует со снижением общей выживаемости. Учитывая широкую медицинскую и социальную значимость рака шейки матки во всем мире, актуальность изучения молекулярных звеньев канцерогенеза бесспорна.

Исследовано содержание уровня TNF-α и его растворимого рецептора sTNF-RI в клетках шейки матки методом иммуноферментного анализа в группах «рак» (рак шейки матки IA–IV стадии) и «предрак» (цервикальная интраэпителиальная неоплазия III степени). Материалом исследования послужили биоптаты шейки матки, полученные путем прицельной ножевой биопсии во время проведения расширенной кольпоскопии или интраоперационно. Образцы контрольной группы были взяты у 25 практически здоровых женщин с их информированного согласия.

В клинической группе «предрак» в клетках цервикального эпителия независимо от их локализации не было выявлено достоверных различий по уровню TNF-α и sTNF-RI, что, вероятнее всего, отражает механизмы избегания противоопухолевой иммунной защиты. При злокачественной трансформации клеток

шейки матки пул TNF- α и sTNF-RI увеличился в 2,6 и 1,7 раза соответственно ($p < 0,001$).

Высокий уровень TNF- α и его растворимого рецептора в клетках экзоцервикса при неоплазии можно объяснить, во-первых, генетической детерминированностью. Во-вторых, уровень TNF- α может увеличиваться за счет его синтеза макрофагами в опухолевом очаге. Данный факт кажется закономерным, учитывая установленное нами ранее изменение пула клеток, экспрессирующих общий лейкоцитарный антиген (CD45), при предраковых состояниях и злокачественной трансформации экзоцервикса. В-третьих, это объясняется шеддингом рецептора, что, возможно, связано с особенностями жирнокислотного состава биологической мембраны опухолевой клетки.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о роли TNF- α и его растворимого рецептора в процессах цервикального онкогенеза.

Корреляционные взаимосвязи между величинами короткоцепочечных жирных кислот и уровнем пролиферативной активности, апоптотической реактивности, показателями клеточного цикла экзоцервикса при дис- и неопластической трансформации

Е.В. Каюкова, Б.С. Хышиктеуев

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России

Известно, что нарушение липидного спектра биологических мембран клеток является одним из звеньев цервикального канцерогенеза. Однако в литературе отсутствуют сведения по изучению роли спектра короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) как компонентов биологических мембран клеток в процессах малигнизации.

Цель исследования — провести корреляционный анализ полученных нами ранее величин спектра КЖК клеток шейки матки, с одной стороны, и параметров пролиферативной активности, апоптоза и кинетики фаз клеточного цикла экзоцервикса при дис- и неопластической трансформации, с другой.

Анализируя выявленные корреляционные взаимоотношения между изучаемыми параметрами, можно констатировать их тесные патогенетические взаимосвязи в процессах малигнизации цервикального эпителия. Так, вероятнее всего, КЖК обладают антиканцерогенным действием, реализуя его через следующие эффекты: во-первых, антипролиферативный, проявляющийся наличием отрицательных взаимосвязей

между концентрациями КЖК, с одной стороны, и пулом CD45-негативных клеток, экспрессирующих Ki-67 (в паранеопластических биоптатах), и долей G2/М-клеток (в очаге предрака, паранеопластических и здоровых клетках), с другой. Наличие положительных корреляций уровня S_{40} с долей пролиферирующих клеток и G2/М-клеток при предраке, вероятно, следует расценивать как «парадоксальный» эффект последних, что нашло свое отражение и в литературных источниках. Во-вторых, КЖК проявляют проапоптотический эффект, что ярко визуализируется в очаге диспластической трансформации, где обнаружена сильная связь последних с клетками, находящимися в разных стадиях апоптоза. В-третьих, выявлено модулирующее влияние КЖК на фазы клеточного цикла с формированием клеточных блоков.

Выявленные механизмы действия КЖК на клетки цервикального эпителия при предопухолевой трансформации и малигнизации отражают степень их участия в опухолевом процессе. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что в условиях дефицита КЖК в клетках экзоцервикса как при предраковых состояниях, так и при малигнизации их антиканцерогенный эффект минимален, что приводит к дестабилизации фаз клеточного цикла, повышению пролиферативного потенциала, изменению апоптотической реактивности клеток.

Таким образом, наличие большого количества корреляционных взаимосвязей между уровнем КЖК и параметрами апоптоза, некроза, фазами клеточного цикла указывает на их тесное патогенетическое участие в процессах цервикального онкогенеза.

Биологические эффекты узкобороздочных лигандов

К.И. Кирсанов¹, Т.И. Фетисов^{1,2}, Е.А. Лесовая^{1,3}, Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская¹

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

²ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России;

³ГБОУ ВПО РязГМУ им. акад. И.П. Павлова Минздрава России

Узкобороздочные лиганды (УБЛ) представляют собой класс соединений разной химической структуры, обладающих аффинностью к малой (узкой) бороздке ДНК. Большинство этих соединений нековалентно связываются с ДНК за счет образования водородных и ван-дер-ваальсовых связей. Благодаря достаточно высокой аффинности к ДНК они влияют на функционирование соответствующих белков метаболизма ДНК и транскрипционных факторов. Соединения этого класса оказались активными в противомикробной терапии и при лечении заболеваний, вызываемых простейшими. Кроме того, УБЛ, обладающие способностью к флуоресценции при взаимодей-

ствии с ДНК, за последние 50 лет получили большое распространение в экспериментальной биологии.

Работа посвящена исследованию спектра биологической активности малых молекул, взаимодействующих с ДНК по малой бороздке. При этом был получен ряд новых эффектов и изучены новые закономерности, среди которых наиболее важными являются следующие: 1) некоторые из распространенных бисбензимидазольных красителей ДНК, а также производных карбазолов обладают рекомбиногенной активностью; 2) практически все АТ-специфические УБЛ способны специфически ингибировать *in vitro* и *in vivo* ДНК-зависимую активацию PARP-1 путем разобщения связи фермента с ДНК-активатором по конкурентному механизму; 3) при обработке личинок *D. melanogaster* некоторыми УБЛ в ядрах клеток дрозофилы происходит исключение PARP-1 из зон конденсированного гетерохроматина, что приводит к реактивации «молчащих» ретротраспозонов и накоплению их мРНК в цитоплазме; 4) УБЛ влияют на эпигенетическую регуляцию транскрипции, связанную как с процессами модификации гистонов, так и метилирования ДНК; 5) УБЛ обладают специфичностью к определенным АТ-богатым последовательностям; 6) некоторые УБЛ проявляют сильные антиканцерогенные и противоопухолевые свойства в экспериментах *in vivo*.

Таким образом, впервые получен ряд приоритетных научных результатов о влиянии УБЛ на процесс канцерогенеза и продемонстрирована перспективность их использования для профилактики канцерогенеза и в противоопухолевой терапии.

Механизмы действия ингибитора тирозинкиназы рецептора эпидермального фактора роста тирфостина AG1478: двуликий Янус

Е.С. Корнилова

ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) в норме участвует в регуляции пролиферации, апоптоза, клеточной подвижности и дифференцировки ряда клеток эпителиального происхождения. Злокачественная трансформация таких клеток часто связана с нарушениями в системе ЭФР-зависимой регуляции. ЭФР воздействует на клетки через высокоспецифичный трансмембранный рецептор — тирозинкиназу, принадлежащую к семейству c-ErbB. Активация тирозинкиназы в результате формирования ЭФР-рецепторного комплекса приводит к автофосфорилированию остатков тирозина в цитоплазматическом домене рецептора, что запускает целый спектр сигнальных каскадов. Параллельно инициируется эндоцитоз ЭФР-рецепторных

комплексов, в результате которого и ЭФР, и рецептор доставляются в лизосомы и деградируют там, приводя к аттенуации стимулированных каскадов. Поскольку опухолевый рост часто коррелирует с гиперэкспрессией рецептора или мутациями, поддерживающими постоянную активность рецепторной тирозинкиназы, использование ее специфических ингибиторов является очевидным терапевтическим подходом, который, однако, не всегда оказывается эффективным.

Анализируя действие обратимого ингибитора тирозинкиназы рецептора ЭФР тирфостина AG1478 на культивируемые клетки карциномы линии A431, мы обнаружили, что он эффективно подавляет фосфорилирование рецептора по тирозину. При отмывке ингибитора фосфорилирование восстанавливалось, однако его уровень не превышал 70–80 % от первоначального. Используя антитела, «узнающие» определенные остатки фосфотирозина, мы обнаружили, что фосфорилирование Y1173, инициирующего митогенный MAP-киназный каскад, восстанавливалось полностью, тогда как сайт Y1045, отвечающий за взаимодействие с ключевым белком, регулирующим доставку рецептора в лизосомы, — убиквитинлигазой c-Cbl, повторно не фосфорилировался. Таким образом, после удаления ингибитора из инкубационной среды митогенный сигнал начинал генерироваться вновь, тогда как механизм его негативной регуляции практически полностью подавлялся.

Очевидно, что значительные колебания концентрации ингибитора могут возникать как в ходе курса терапии, так и после его окончания, когда уровень ингибитора резко падает. Возможность такого рода эффектов следует учитывать при разработке протоколов клинических испытаний новых ингибиторов тирозинкиназ.

Работа выполнена при поддержке РФФИ.

Ферменты репарации ДНК и их ингибиторы как потенциальные лекарства

О.И. Лаврик

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) — основной фермент, обеспечивающий процессинг ковалентных аддуктов топоизомеразы 1 (TOP1) с ДНК, а также удаление других модификаций с 3'-конца ДНК. Недавно нами было показано, что TDP1 может инициировать репарацию апуриновых/апиримидиновых (AP) сайтов, расщепляя их с образованием однонуклеотидных брешей с фосфатами на 3'- и 5'-концах. Эта активность не наблюдается у мутантной формы TDP1 SCAN1, ответственной за развитие нейродеге-

неративного заболевания — спиноцеребеллярной атаксии. Было показано, что активность TDP1 по расщеплению AP-сайтов стимулируется ключевым регулятором эксцизионной репарации оснований — PARP1. Эти данные свидетельствуют о вовлеченности TDP1 в новый APE1-независимый путь эксцизионной репарации оснований у млекопитающих. TDP1 — многообещающая мишень для противораковой терапии, основанной на повреждениях ДНК, обусловленных действием ингибиторов TOP1. Были синтезированы и протестированы в качестве потенциальных ингибиторов TDP1 ряд новых соединений — производных бензопентатиепина и диазаадамантиана. Полученные результаты позволяют рассматривать эти классы соединений как перспективные ингибиторы TDP1 (концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) для бензопентатиепинов — 0,2–6,0 мкМ, для диазаадамантианов — 5–70 мкМ). Благодаря центральной роли в регуляции процессов репарации ДНК PARP1 является также перспективной мишенью для разработки ингибиторов — эффективных противораковых препаратов. В качестве ингибиторов PARP1 исследован ряд соединений, в том числе дисахаридные нуклеозиды и их производные. Эти соединения оказались конкурентными ингибиторами PARP1 со значениями IC_{50} 25–250 мкМ. Наилучшие ингибиторные свойства проявили производные тимидина независимо от наличия, типа и расположения второго рибозного остатка, поэтому они могут представлять интерес как основа для дальнейшего усовершенствования структуры в целях усиления ингибиторных свойств.

Работа поддержана РНФ (грант № 14-24-00038) и РФФИ (грант № 14-04-00268).

***Helicobacter pylori* и факторы прогрессии рака желудка**

М.А. Сеньчукова^{1,2}, О.Н. Томчук¹,
Н.В. Пучихина^{1,3}, Н.В. Зайцев^{1,2}

¹ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России;

²ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер»;

³ГБУЗ «Онкологический диспансер № 2» Минздрава Краснодарского края, Сочи

Изучены особенности инфекции *Helicobacter pylori* и их связь с активностью воспаления и ангиогенеза, клинко-морфологическими особенностями рака желудка (РЖ). Ткань опухоли и прилежащей слизистой оболочки желудка (СОЖ) у 47 больных РЖ исследованы иммуногистохимически с использованием антител к *H. pylori*, CD4, CD8, CD20, CD68, CD34. Полученные результаты сопоставлены с клинко-морфологическими характеристиками опухоли и отдаленными результатами лечения. В Оренбургской области

отмечена высокая инфицированность *H. pylori* пациентов с РЖ (84,5 %), при этом умеренная и высокая степень обсемененности (СО) СОЖ отмечена более чем у половины (51,3 %) больных. При иммуногистохимическом исследовании у пациентов с РЖ преобладали кокковые формы *H. pylori*, которые наблюдались у 93,4 % инфицированных больных, причем только кокковые — у 68,9 %. Анализ показал, что средняя и высокая СО СОЖ *H. pylori* чаще наблюдались при диффузном типе РЖ (в 59,1 и 25,0 % случаев соответственно при диффузном и кишечном типах РЖ; $p = 0,024$) и при низкодифференцированном РЖ (в 6,7; 55,6; 71,4 и 53,3 % соответственно при высоко- (1), умеренно (2), низкодифференцированной аденокарциноме и недифференцированном раке (3) и перстневидно-клеточном раке (4); $t_{1-2} = 0,014$; $t_{1-3} = 0,005$; $t_{1-4} = 0,010$). Примечательно, что высокая и средняя СО СОЖ кокковыми формами *H. pylori* встречалась достоверно чаще при единичных метастазах в регионарные лимфатические узлы (N1), чем при множественных (в 21,7; 83,3 и 52,9 % случаев соответственно при стадиях РЖ N0, N1 и N2; $p = 0,011$). При высокой и средней СО СОЖ кокковыми формами *H. pylori* отмечено достоверное снижение 3-летней безрецидивной выживаемости больных РЖ (81,0 и 47,4 % соответственно; $p = 0,017$; отношение шансов 4,89; доверительный интервал 1,11–21,47). Связи этого показателя с 3-летней общей выживаемостью пациентов с РЖ не выявлено. Не установлено также связи между СО СОЖ *H. pylori* и уровнем полиморфно-клеточной инфильтрации и количеством лимфоидных фолликулов в СОЖ, плотностью CD4, CD8, CD20 и CD68 в строме опухоли и СОЖ, ПМС. Этот факт, возможно, связан с преобладанием у больных РЖ кокковых форм бактерий, реализация агрессивного потенциала которых может осуществляться не только за счет активации воспалительных процессов в СОЖ, но и других механизмов, например способности бактерий повышать уровень генных мутаций, нарушать процессы апоптоза и пролиферации клеток желудочного эпителия.

Wnt-сигналинг: роль в канцерогенезе и возможности фармакологической регуляции

В.В. Татарский (мл.)¹, В.С. Кочубей^{2,3}, А.В. Колячкина^{2,3},
А.А. Штиль¹, Р.В. Комбаров^{2,3}, Д.В. Генис^{2,3}

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

²ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», Москва;

³ООО «Новые научные технологии», Москва

Активирующие мутации сигнального каскада Wnt играют ключевую роль в развитии новообразований, в частности опухолей толстой кишки. Белки каскада Wnt рассматриваются как новые мишени противоопу-

холевой терапии. Скрининг химической библиотеки миметиков α -спирали на моделях клеточных культур рака толстой кишки человека, трансдуцированных репортерной β -катенин-зависимой конструкцией, выявил ингибиторы Wnt-каскада с оригинальным механизмом действия. Биотинилированное производное соединения-лидера ASX-339 связывается с компонентами транскрипционного комплекса β -катенина, преимущественно с DDX5 (p68) — белком, необходимым для β -катенин-зависимой транскрипции, p53 и рецептором эстрогенов. ASX-339 изменяет связывание β -катенина с компонентами цитоскелета, что соответствует фенотипу нокдауна p68. В наномолярных концентрациях лидерное соединение ингибирует Wnt-опосредованную экспрессию белков c-Мус, циклина D, TCF4, c-Met, CD44 и изменяет экспрессию других генов, приводя к G2/M-блоку клеточного цикла и последующей программированной гибели с активацией каспаз 3 и 9. Однако ингибирование компонентов транскрипционного комплекса, в том числе p68, не обеспечивает достаточное «терапевтическое окно» и неспецифично для опухолей с активацией Wnt-каскада: другие сигнальные пути также регулируются соединением ASX-339. Это характерно и для других ингибиторов Wnt-каскада, действующих на уровне транскрипционного комплекса. Обсуждается возможность таргетной терапии опухолей с активацией сигнального каскада Wnt, в частности посредством ингибирования YAP1-CTNBN1-зависимой транскрипции и функции CDK9.

Экспрессия гена сурвивина (*BIRC5*) и ErbB-2 (*HER-2/neu*) в лимфоцитах при раке молочной железы

Е.А. Шляхтунов, В.М. Семенов, И.С. Веремей

УО «Витебский государственный
ордена Дружбы народов медицинский университет»,
Республика Беларусь

В настоящее время известно, что наличие в опухоли инфильтрирующих лимфоцитов (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) является косвенным свидетельством активного противоопухолевого иммунитета и сочетается с улучшением прогноза у пациенток, страдающих операбельным раком молочной железы (РМЖ). Согласно данным литературы, у больных с высоким содержанием TILs проведение только химиотерапии ассоциировалось с 5-летней безрецидивной выживаемостью 91 %. Добавление анти-HER-2-направленного действия трастузумаба в этой группе не улучшало результатов лечения. Наоборот, было отмечено достоверное снижение 5-летней безрецидивной выживаемости до 80 %. Объяснения данного феномена пока нет. Возможно, это связано с антигенпрезентирующим механизмом самих лимфоцитов.

Цель исследования — изучить экспрессию гена сурвивина (*BIRC5*) и ErbB-2 (*HER-2/neu*) в лимфоцитах, инфильтрирующих ткань карциномы молочной железы, а также в лимфоцитах периферической крови больных РМЖ.

Материалы и методы. После гомогенизации образца замороженной опухоли выделены лимфоциты ($CD45^{+}$) методом сепарирования. Таким же методом выделены лимфоциты из периферической крови. При помощи полимеразной цепной реакции в реальном времени исследована экспрессия гена *BIRC5* и ErbB-2 в лимфоцитах 16 образцов первичной инвазивной протоковой карциномы молочной железы, а также 26 образцов периферической крови пациенток, страдающих РМЖ.

Результаты. В лимфоцитах, выделенных из всех образцов карциномы, определялась экспрессия гена *BIRC5* и ErbB-2 со средним значением ($M \pm ms$) $2,00 \pm 1,29$ (min — 0,003; max — 4,283) для сурвивина и $0,57 \pm 0,29$ (min — 0,024; max — 1,459) для *HER-2/neu*.

В лимфоцитах, выделенных из всех образцов периферической крови, определялась экспрессия ErbB-2 (*HER-2/neu*) со средним значением ($M \pm ms$) $0,661 \pm 0,521$ (min — 0,259; max — 1,405). В 19 образцах (73 %) определялась экспрессия гена сурвивина со средним значением ($M \pm ms$) $0,248 \pm 0,171$ (min — 0,035; max — 0,488). В 7 образцах (27 %) получены отрицательные результаты экспрессии гена *BIRC5*.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о своеобразной «напряженности» клеточного иммунитета как непосредственно в опухолевой ткани, так и в кровяном русле. Широкий разброс показателей может говорить о различном иммунном ответе организма на опухоль. Это исследование указывает на возможное предикторное значение TILs как биомаркера, способного определить группу больных, которые высокочувствительны к химиотерапии и не нуждаются в добавлении трастузумаба. Однако эта гипотеза требует подтверждения в рандомизированных исследованиях.

Противоопухолевые лиганды на основе антрадиофендионов: модулирование биологических свойств путем модификации структуры боковых цепей

А.Е. Щекотихин

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва;
ФГБОУ ВПО РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва

Лиганды, стабилизирующие G-квадруплексные структуры ДНК, рассматриваются как перспективные кандидаты для поиска новых лекарственных средств. Модификация терминальных аминокислот 4,11-бис(аминоалкиламином)антрадиофендионов в гуанидиногруппы

позволяет повысить сродство лигандов к G-квадруплексам (Cogoi S. et al., 2013). Так, был открыт бисгуанидин ЛХТА-1581, обладающий высоким сродством к теломерному квадруплексу и квадруплексам из промоторов онкогенов, способный блокировать теломеразу, транскрипцию онкогенов и опухолевый рост (Cogoi S. et al., 2014).

Моделирование комплексов лиганд–квадруплекс было использовано для дизайна нового поколения лигандов. Синтез соединений нового хемотипа, содержащих 3 боковые цепи с гуанидиногруппами, позволил получить производные антрадиофендиона, обладающие высокой аффинностью к теломерному G-квадруплексу и значительно большей селективностью связывания по сравнению с бисгуанидином ЛХТА-1581.

Продолжая оптимизацию лигандов G-квадруплексов, модификацией терминальных аминогрупп получена серия бис(хлорацетамидино)антрадиофендионов. Показано, что замена терминальных гуанидиногрупп в ЛХТА-1581 на хлорацетамидиногруппы (ЛХТА-1795) сохраняет аффинность лигандов к квадруплексам и увеличивает цитотоксические свойства препарата за счет более высокого аккумулярования в опухолевых клетках. Для нового соединения-лидера ЛХТА-1795 проведены углубленные исследования биологических свойств и механизма действия (Cogoi S. et al., 2015). Лиганд ЛХТА-1795 за счет стабилизации квадруплекса H-Ras-2 вызывает достоверное снижение (до 95–99 %) содержания продукта трансляции гена *HRAS* (белка p21 H-Ras) в опухолевых клетках. Бисхлорацетамидин ЛХТА-1795 не только вызывает остановку пролиферации, но и эффективно блокирует формирование колоний опухолевых клеток. На модели ксенографтов рака мочевого пузыря T24 выявлен высокий противоопухолевый эффект G-квадруплексного лиганда ЛХТА-1795.

Протеинкиназа С-дельта – новая молекулярная мишень производных акадезина

А.М. Щербаков¹, В.Б. Цветков^{2,3}, Б.В. Тяглов⁴,
К.В. Лобанов⁴, С.В. Яроцкий⁴, А.С. Мионов⁴,
Р.С. Шакулов⁴, А.А. Штиль¹

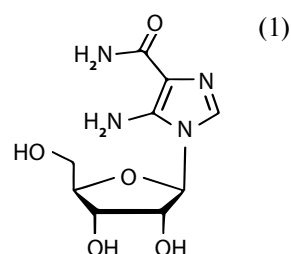
¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН», Москва;

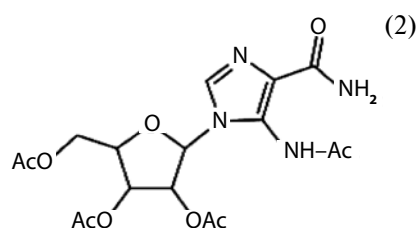
³ФГБУН «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины ФМБА России», Москва;

⁴ГНЦ РФ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва

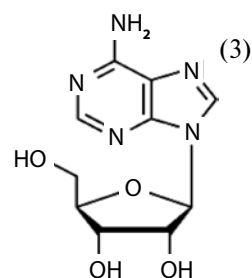
Акадезин (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-1-β-D-рибофуранозид, AICAR) (1) — регулятор важных сигнальных каскадов, что обуславливает его перспективность в качестве лекарственного кандидата.



В результате химических модификаций молекулы нами получены новые производные с различными заместителями в гетероциклическом кольце и углеводном остатке. Сравнение способности акадезина и новых производных вызывать гибель культивируемых клеток рака кишки и молочной железы выявило 5-ацетиламино-4-ацетиламиноимидазолил-1-β-D-2',3',5'-триацетилрибофуранозид (2) как соединение-лидер.



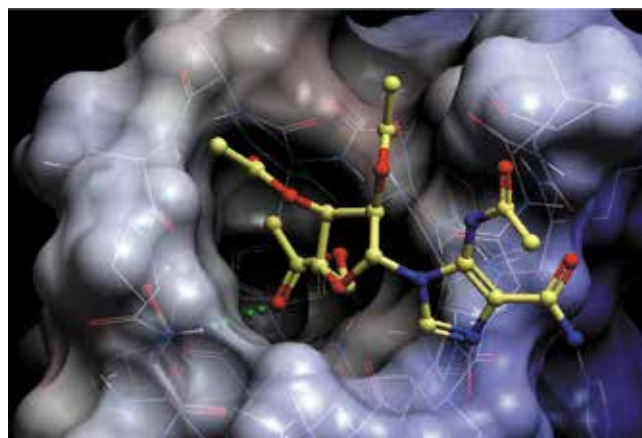
Это соединение активировало киназу АМРК — основную мишень акадезина. Кроме того, соединение (2) снижало базальную и индуцированную форболовым эфиром (ФЭ) NFκB-опосредованную трансактивацию гена-репортера. Это позволило предположить, что «классические» (Ca²⁺/фосфолипидзависимые) изоформы протеинкиназы С (ПКС) могут быть мишенями NFκB-ингибирующего действия соединения (2). Действительно, в субмикромольных концентрациях оно ингибировало δ-изоформу ПКС (ПКСδ) (по фосфорилированию пептидного субстрата в бесклеточной системе). Активность α1-, α2-, β- и γ-изоформ ПКС, а также протеинкиназ IKKα и IKKβ не изменялась или снижалась лишь при использовании существенно более высоких (2 порядка) концентраций соединения (2). В соответствии с этими результатами данное соединение снижало ФЭ-индуцированное фосфорилирование IκB и активацию NFκB в клетках рака молочной железы. По способности ингибировать ПКСδ соединение (2) активнее акадезина (1) в 37 раз и ближайшего физиологического аналога аденозина (3) в 2 раза.



Проведено моделирование взаимодействия соединений (1)–(3) с CYS2-доменом ПКСδ (PDB:1PTR) с помощью процедуры докинга, реализованного в программе ICM 3.8. Анализ результатов докинга показал, что соединения (2) (см. рисунок) и (3) связываются с ПКСδ в области встраивания активаторов (ФЭ, диацилглицерола), а акадезин (1) не имеет энергетически выгодных расположений в этой области.

Таким образом, химические модификации структуры акадезина позволили получить более активное производное и выявить внутриклеточную мишень — ПКСδ, важную для установления молекулярных механизмов действия соединений этого химического класса.

Работа поддержана грантом Президиума РАН.



Связывание соединения (2) с CYS2-доменом ПКСδ (PDB:1PTR)

Секция II

НОВЫЕ ПОДХОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ВИРУСОВ И ИХ РОЛИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОПУХОЛЕЙ

Delivery of oncolytic alphavirus into mouse mammary tumor using functionalised magnetic nanoparticles

A. Zajakina, B. Kūrēna, A. Ezerta, D. Zhulenkov

Latvian Biomedical Research and Study Centre, Riga

The recombinant alphaviruses have a potential to be used for development of efficient self-amplifying RNA vaccines for cancer treatment. The advantages of such type of genetic vaccines are the high level of biosafety, efficient p53 independent transgene expression in cancer cells and low anti-vector immunity for re-administration, comparing to virus particles. However, the application of high virus titres *in vivo* leads to broad distribution of the vector. One solution is to reduce the virus dose and at the same time to enhance the vector targeting and transduction capacity. In this study we applied superparamagnetic nanoparticles (MNPs) to increase the efficiency of Semliki Forest virus (SFV) transduction of TS/A mouse mammary carcinoma cells.

The MNPs/virus complexes, which were formed by electrostatic and hydrophobic interactions between SFV and magnetic core coated with different types of polymers, are easy to generate in contrast to specific ligand – ligand interaction-based complexes requiring chemical modification of the virus and nanoparticles. Among nanoparticles, which were tested in this study, the highest enhancements of SFV transduction have demonstrated two positively charged MNPs types coated with biodegradable aminosilane and chitosan molecules, respectively. Moreover, the method for vector concentration by magnetic nanoparticles was developed. The site specific targeting of magnetically labelled virus particles through externally applied magnetic field gradient was demonstrated *in vivo* in a mouse TS/A breast cancer model.

The proposed mode of SFV magnetic targeting is a promising strategy for controlling the biodistribution

of the vector in clinical applications. Furthermore, the iron accumulation can be clearly visualized by MRI, providing therefore additional vector tracking possibilities.

The viral theory of cancer revisited: a role for the nuclear organization in human lymphomas

T. Tsfasman^{1,2}, D. Germini^{1,2}, R. El-Amine^{1,2}, O. Yarovaya^{1,2}, S. Bury-Moné³, M. Lipinski¹, Y.S. Vassetzky¹

¹UMR8126, Université Paris-Sud, CNRS, Institut de cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France;

²CNRS LIA1066 "Laboratoire Franco-Russe de Recherche en Oncologie", Villejuif, Moscow;

³Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Background. Environmental factors play an important role in most human cancer. Burkitt's lymphoma (BL), a rare B-cell lymphoma caused by specific chromosomal translocations resulting in the juxtaposition of the CMYC oncogene with an immunoglobulin gene locus, is a typical example of cancer strongly affected by environmental factors. BL is associated with the Epstein – Barr virus, human immunodeficiency virus (HIV), malaria and exposure to a *Euphorbiaceae* plant. The molecular mechanisms of these environmental factors remain largely unknown.

Results. One of the major enigmas to solve is why all these factors specifically induce Burkitt's lymphoma, and no other malignancies? Our data indicate that these factors perturb the nuclear organization of B-cells inducing the prolonged co-localization of potential translocation partners, the IGH and CMYC loci.

Conclusions. HIV and EBV induce changes in the nuclear architecture of B cells. This may specifically provoke BL-specific translocations.

Эпигенетическая регуляция вирусной инфекции

С.В. Винокурова¹, М.Д. Фёдорова¹, В.Г. Хоменков¹,
Л.С. Павлова¹, Н.П. Киселёва¹,
М. фон Кнебель Доберитц², Ф.Л. Киселёв¹

¹Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ
«РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²Гейдельбергский университет, Германия

Актуальность. Вирусы папилломы человека (ВПЧ) высокого риска являются этиологическим фактором рака шейки матки. Нормальный вирусный цикл тесно связан с процессом дифференцировки плоскоклеточного эпителия. Трансформация эпителия инициируется повышенной экспрессией вирусных онкогенов Е6 и Е7. Однако молекулярные механизмы дерегуляции экспрессии вирусных онкогенов остаются недостаточно изученными. ДНК-метилирование необходимо для регуляции экспрессии и обеспечения репликации многих ДНК-вирусов.

Целью исследования является изучение роли метилирования регуляторных последовательностей ВПЧ 16-го типа генома на экспрессию вирусных онкогенов.

Материалы и методы. Для выделения ДНК использовали клинические образцы тканей пациентов, содержащие интраэпителиальные неоплазии и инвазивные карциномы шейки матки, а также прилегающий нормальный эпителий шейки матки. Верификацию участков эпителия с трансформированным эпителием проводили с помощью иммуногистохимического анализа экспрессии p16^{INK4A}. Специфические участки эпителия выделяли методом микродиссекции. Анализ метилирования ВПЧ проводили методом бисульфитного секвенирования с использованием праймеров, перекрывающих регуляторную область ВПЧ (upstream regulatory region, URR). Эффект метилирования на активность URR оценивали путем введения селективного метилирования сайтов связывания транскрипционных факторов и последующего измерения экспрессии генов-репортеров и вирусных онкогенов.

Результаты. Установлено, что паттерн метилирования вирусного генома специфически меняется в процессе дифференцировки плоскоклеточного эпителия. Кроме того, показано, что уровень метилирования URR ВПЧ 16-го типа возрастал в трансформированном эпителии по сравнению с нормальным, в особенности — в сайтах связывания вирусного белка Е2, являющегося ключевым вирусным фактором регуляции вирусной транскрипции и репликации. Было установлено, что метилирование одного из сайтов связывания Е2 приводит к существенной активации вирусного промотора и увеличению (до 5 раз) экспрессии вирусных онкогенов.

Выводы. Полученные данные позволяют предположить, что метилирование URR ВПЧ 16-го типа яв-

ляется важным механизмом регуляции экспрессии вирусных генов во время нормального вирусного цикла. Кроме того, метилирование сайтов связывания вирусного белка Е2 может приводить к активации вирусного промотора и повышенной экспрессии вирусных онкогенов.

Инфицированность вирусами папилломы человека больных воспалительными и хроническими заболеваниями миндалин

О.Ю. Дворянинова¹, Н.В. Литвяков^{1,2}, Е.Л. Чойнзонов^{1,3}

¹ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский
Томский государственный университет»;

³ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Томск

Актуальность. Известно, что в 50–85 % случаев рак миндалин (РМ) ассоциирован с инфицированностью вирусами папилломы человека (ВПЧ), тогда как у здоровых лиц и пациентов с инволютивными миндалинами ВПЧ не обнаруживают. Из вышесказанного можно сделать вывод о причастности ВПЧ к инициации/прогрессии злокачественного процесса миндалин.

Цель исследования — оценить частоту встречаемости ВПЧ-позитивной рецидивирующей формы ангины (РФА), хронического декомпенсированного тонзиллита (ХДТ) и папилломатоза миндалин (ПМ) в сопоставительном аспекте с клинико-анамнестическими показателями заболевания.

Материалы и методы. Изучена частота встречаемости ВПЧ 6, 11, 16 и 18-го типов в патологически измененной ткани миндалин у больных с РФА ($n = 5$), ХДТ ($n = 32$) и ПМ ($n = 7$). Контрольная группа представлена 56 лицами без морфологических изменений ткани миндалин. Типирование ВПЧ проведено с использованием коммерческих наборов фирмы «Амплисенс» (ФГУН ЦНИИЭ, Москва).

Результаты и обсуждение. ДНК ВПЧ была выявлена в ткани миндалин 20 % больных РФА, 72 % — ПМ; у больных ХДТ ДНК ВПЧ обнаружено не было. У 1 пациента с РФА обнаружена микст-инфекция из 3 типов ВПЧ (6, 11 и 18), у больных ПМ случаи микст-инфекции были зарегистрированы в 3 раза чаще: у 2 в ткани папилломы определены ВПЧ-6 и -11, и у 1 — ВПЧ-16 и -18. Случаи детекции моноинфекции ВПЧ-6 были характерны только для больных ПМ. В контрольной группе микст-инфекция обнаружена в 3 случаях: в 2 — ВПЧ-6 и -11 и в 1 — ВПЧ-31 и -33. Статистически значимых различий в частоте инфицированности ВПЧ ткани миндалин между группой пациентов с хроническими заболеваниями и контрольной группой не выявлено ($p \geq 0,05$). Таким образом, вклад ВПЧ в иници-

ацию ПМ очевиден, тогда как вопрос о его участии в индукции РФА и ХДТ остается открытым.

Частота выявляемости некоторых вирусов у больных раком мочевого пузыря

И.В. Косова¹, О.Б. Лоран², Л.А. Синякова², Л.В. Гундорова³,
В.А. Косов⁴, Д.Н. Колбасов¹, П.П. Коростелкин¹

¹Урологическое отделение ГБУЗ «Городская клиническая больница № 68 Департамента здравоохранения г. Москвы»;

²кафедра урологии и хирургической андрологии

ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, Москва;

³патологоанатомическое отделение ГБУЗ ГКБ № 68 ДЗМ;

⁴ГУ «Коми республиканский онкологический диспансер», Сыктывкар

Цель — установить процент выявляемости вирусных ДНК в ткани опухоли мочевого пузыря.

Материалы и методы. Проведено обследование и лечение 79 больных раком мочевого пузыря (58 мужчин и 21 женщина) в возрасте от 38 до 90 лет (средний возраст 65 ± 10 лет). Выполнено стандартное обследование. Ткань опухоли взята для диагностики наличия вирусов методом полимеразной цепной реакции: вируса простого герпеса (HSV) 1-го и 2-го типов, вируса папилломы человека (HPV), цитомегаловируса (CMV), вируса Эпштейна–Барр (EBV).

Результаты. Наличие вирусных ДНК в ткани опухоли было выявлено у 23 (29,1 %) больных. У 15 пациентов в опухоли отмечено наличие ДНК EBV, у 2 — CMV, в 3 случаях — HPV высокого онкогенного риска (типы 16, 39, 45, 52, 59), в 1 — HSV 1-го и 2-го типов. В 2 случаях выявлено 2 вируса (HPV + EBV и EBV + CMV). Среди этих пациентов у 1 диагностирована аденокарцинома сигмовидной кишки, у 1 — плоскоклеточный рак мочевого пузыря, у 13 (56 %) — уротелиальный рак высокой степени злокачественности. Опухоль была рецидивной у 7 (30 %) больных.

Выводы. Наличие вирусных ДНК в ткани опухоли выявлено у 29,1 % пациентов с раком мочевого пузыря, у 56,0 % из которых опухоли были низкодифференцированными.

Вирусы в канцерогенезе рака мочевого пузыря

И.В. Косова¹, О.Б. Лоран², Л.А. Синякова², Л.В. Гундорова³,
В.А. Косов⁴, Д.Н. Колбасов¹, П.П. Коростелкин¹

¹Урологическое отделение ГБУЗ ГКБ № 68 ДЗМ;

²кафедра урологии и хирургической андрологии ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, Москва;

³патологоанатомическое отделение ГБУЗ ГКБ № 68 ДЗМ;

⁴ГУ КРОД, Сыктывкар

Цель — установить этиологическую роль вирусов в генезе развития опухолей мочевого пузыря, их влияние на частоту рецидивирования, развитие инвазивных и метастатических форм.

Материалы и методы. Проведено обследование и лечение 79 больных раком мочевого пузыря (58 мужчин и 21 женщина) в возрасте от 38 до 90 лет (средний возраст 65 ± 10 лет). Выполнено стандартное обследование, дополнительно взят анализ крови на иммуноглобулин (Ig) класса G, IgM к вирусу простого герпеса (HSV) 1-го и 2-го типов, цитомегаловирусу (CMV), вирусу Эпштейна–Барр (EBV).

Результаты. У больных с рецидивным течением имело место повышение уровней anti-CMV IgG ($p = 0,001$) и anti-EBV IgG-EBNA ($p = 0,037$); с высоким потенциалом злокачественности — anti-HSV I, II IgG ($p = 0,03$); с местно-распространенным процессом — anti-EBV IgEA ($p = 0,02$) по сравнению с уровнем антител при неинвазивном первичном раке мочевого пузыря низкого потенциала злокачественности. При наличии позитивных лимфатических узлов уровень anti-EBV IgG-EBNA был выше ($p = 0,0257$), чем при их отсутствии. Отмечается высокая корреляция между уровнем anti-CMV IgG и наличием ДНК CMV в опухолевой ткани ($R = 0,354$; $p = 0,001$), рецидивным характером опухоли ($R = 0,351$; $p = 0,002$); умеренные коррелятивные связи со стадией процесса ($R = 0,281$; $p = 0,014$) и уровнем антител к ранним антигенам EBV ($R = 0,285$; $p = 0,015$). В свою очередь, наличие ДНК CMV в опухоли коррелировало с уровнем нуклеарных антител к EBV ($R = 0,3$; $p = 0,008$), а ДНК EBV — с уровнем капсидных антител ($R = 0,354$; $p = 0,002$) и ранних антигенов ($R = 0,261$; $p = 0,027$) к EBV. Уровень IgG к HSV 1-го и 2-го типов коррелировал с уровнем ранних антигенов ($R = 0,306$; $p = 0,009$).

Выводы. Обнаружено статистически достоверное повышение уровня вирусных антител у больных рецидивным и местно-распространенным раком мочевого пузыря высокого потенциала злокачественности. Выявлены статистически значимые коррелятивные связи между наличием вирусных ДНК CMV и EBV в опухоли, уровнем их антител, стадией процесса и рецидивным характером опухоли.

Проблема полиомавируса SV-40, возможная связь с новообразованиями человека

Б.А. Лапин¹, А.А. Агумава¹, Г.Л. Кобяков²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», Сочи;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко», Москва

Вирус SV-40 был открыт в 1960 г., когда введение контаминированной этим вирусом полиовакцины мы-

шам индуцировало у последних множественные опухоли. Источником контаминации служила культура клеток почки макаков-резусов, на которых размножался вакцинный вирус, естественно контаминированная ДНК-содержащим вирусом SV-40. В связи со способностью вызывать множественные опухоли, вирус получил название полиомавируса. Вирус был внесен в человеческую популяцию в период массовой иммунизации против полиомиелита контаминированной вакциной. Лицо, инфицированное SV-40, выделяет вирус во внешнюю среду, в связи с чем вирус-носителями могут стать лица, не подвергавшиеся вакцинации контаминированной вакциной. Беспокойство медиков вызывает способность вируса индуцировать множественные опухоли у лабораторных грызунов и обнаружение ДНК вируса в ряде опухолей человека. Этой проблеме посвящено большое количество весьма противоречивых публикаций. Критически рассматриваются как достоверность обнаружения ДНК SV-40, так и его роль в генезе различных новообразований.

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) нами исследовалась ДНК SV-40 в хирургически удаленных опухолях головного мозга различного гистогенеза (глиомах, астроцитомах, менингиомах). Параллельно исследовались эти опухоли, заключенные в парафин для гистологического исследования, а также кровь больных, полученная до операции. Экстракцию ДНК из ткани опухоли, цельной крови и депарафинизированных блоков проводили протеиназным методом. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе ROTORGEN Q, используя прямой праймер 5'-GGGTCTTCTACCTT-TCTCTTCTTT-3', обратный праймер 5'-GCAGTGGTGAATGCCTT-3' и зонд FAM-AACCTGTTTTGCTCAGAAGAAA-TGCCA-TAMRA. Объем ПЦР-смеси составлял 25 мкл и содержал 10 мкл ДНК, 100 нМ зонда, 0,5 мкл Taq-полимеразы (Интерлабсервис, Taq-F), 2,5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера (5 mM MgCl₂), 200 мкл дНТФ, 500 нМ каждого праймера. Программа амплификации: 95 °C 5 мин и 50 циклов 95 °C 10 с, 60 °C 30 с с определением ОП.

Результаты исследования представлены в таблице.

Материал	Число образцов	Доля SV-40-положительных образцов (%)
Кровь от больных с опухолями мозга	118	33
Нативные опухоли мозга (глиома, астроцитома, менингиома)	181	29
Парафиновые блоки опухоли мозга	70	24

Вирус SV-40 индуцирует неструктурный полипептид — большой опухолевый антиген (TAg), который связывается с белком ретинобластомы (pRb) и супрес-

сором белка p53, блокируя апоптоз инфицированных клеток, что может привести к трансформации клеток, неконтролируемому размножению и возможной малигнизации.

Вирус Сендай как онколитический агент

А.С. Сидоренко¹, А.В. Терешкова¹, Е.А. Мухина²,
О.В. Матвеева^{1,3}, П.М. Чумаков¹, Г.В. Ильинская^{1,4}

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

²Клиника онкологии животных, Московский
научно-исследовательский онкологический институт
им. П.А. Герцена — филиал НМИЦ Минздрава России;

³Biopolymer Design, Acton, USA;

⁴НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Онколитические вирусы — это вирусы, способные вызывать гибель именно злокачественных, но не нормальных клеток. К ним относятся и некоторые представители парамиксовирусов, например вирус Сендай. Раковые клетки в избытке продуцируют гликопротеины, способные служить вирусными рецепторами. Гибель злокачественных клеток может происходить как за счет прямого цитолитического действия вируса Сендай, так и вследствие активации противоопухолевого иммунитета. Вирус может усиливать образование многоядерных клеточных конгломератов (синцитиев), что ускоряет вовлечение новых клеток в инфекционный процесс внутри опухоли и позволяет вирусу «ускользнуть» от нейтрализующего воздействия антител. Частые генетические дефекты раковых клеток в системе интерфероновой и апоптозной ответов создают благоприятные условия для репликации вируса именно в злокачественных клетках. Имуноопосредованная гибель злокачественных клеток обусловлена тем, что вирус является мощным индуктором интерферона и стимулирует противоопухолевую активность различных клеточных компонентов иммунного ответа, таких как дендритные клетки, натуральные киллеры и цитотоксические Т-лимфоциты. При этом не ясно, насколько часто встречаются опухоли, чувствительные к вирусу, и как предсказать эту чувствительность, непонятен способ распространения вируса в организме. Нами проведен анализ сравнительной чувствительности ряда первичных опухолевых культур и клеточных линий. Выявлено, что гибель клеток, обусловленная вирусом, не всегда коррелирует с продукцией вирулентных частиц. С помощью антител показано, что клетки с разной чувствительностью к вирусу одинаково хорошо адсорбируют его на своей поверхности. Лимфоциты и дендритные клетки способны *in vitro* переносить вирус на опухолевые клетки. Получены первые обнадеживающие результаты по лечению собак вирусом Сендай. Внутриопухолевые инъ-

екции вируса у части животных вызвали частичную или полную ремиссию.

Работа поддерживается грантом Минобрнауки России (проект RFMEF160714X0067).

Анализ функциональной активности онкогена *LMP1* вируса Эпштейна–Барр у больных с ВЭБ-ассоциированной патологией и вирусоносителей

К. В. Смирнова

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

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), являясь убиквитарным герпесвирусом человека, ассоциирован с рядом злокачественных новообразований, таких как недифференцированный рак носоглотки, лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина и др. В различных географических регионах мира и этнических группах выявлены варианты ВЭБ, для которых характерны определенные наборы мутаций в ключевых генах онковируса, что находит отражение в его трансформирующих свойствах и онкогенном потенциале. Среди этих генов наиболее генетически вариабельным оказался основной онкоген ВЭБ — *LMP1* (кодирующий латентный мембранный белок 1 (*LMP1*)), который, будучи мультифункциональным геном, играет чрезвычайно важную роль в патогенезе ряда злокачественных неоплазий. Молекулярный анализ *LMP1* различного клинического и географического происхождения позволил обнаружить генетические варианты, отражающие в ряде случаев их неодинаковую биологическую активность. Целью настоящего исследования стал сравнительный анализ функциональной активности наиболее распространенных вариантов онкогена *LMP1* у больных ВЭБ-ассоциированной патологией — раком носоглотки (РНГ) и хронических вирусоносителей — пациентов с различными опухолями полости рта (ОПР), не ассоциированными с этим вирусом.

Проведенные нами исследования образцов *LMP1* ВЭБ, полученные от больных 2 изучаемых групп, показали их высокую гомологию с описанными ранее в литературе вариантами вирусного онкогена — B95.8/A, Cao/China1, Mediterranean+ (Med+), Med— и North Carolina (NC). Клеточные линии крысиных фибробластов Rat-1, экспрессирующие варианты *LMP1* от больных РНГ и ОПР, по величине формируемых фокусов трансформации и по способности образовывать колонии в жидком агаре практически не различались. Кроме того, уровни активации сигнальных путей клетки (NF-κB, AP1, PI3K), вызываемой вариантами *LMP1* из обеих изучаемых групп, были невысокими, а их различия в сравниваемых группах статистически недостоверны.

Таким образом, проведенные исследования показали, что российские образцы *LMP1* по своим аминокислотным последовательностям близки к описанным ранее вариантам *LMP1* ВЭБ зарубежного происхождения, но обладают рядом уникальных мутационных особенностей. При этом отсутствие специфического варианта *LMP1*, преимущественно ассоциированного с РНГ, свидетельствует о том, что любой персистирующий в популяции штамм ВЭБ с любым вариантом онкогена *LMP1* может инициировать патологический процесс, ведущий к возникновению данной ВЭБ-ассоциированной опухоли, если этот процесс сопровождается воздействием на вирусоносителя вредных факторов внешней или внутренней среды.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 13-04-00063 и № 14-04-01810.

Пилотные исследования по обнаружению RNA-транскриптов *bovine leukemia virus* у доноров крови человека

А. В. Сырцев¹, А. А. Алимов^{2,3}, С. А. Галецкий¹,
Е. В. Огородникова¹, Ю. В. Чувев¹, Г. Е. Сулимова³

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

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

³ФГБНУ «Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН», Москва

Bovine leukemia virus (BLV) является РНК-содержащим ретровирусом, который вместе с вирусами Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-1, HTLV-2) относится к семейству *Retroviridae*, роду *Deltaretrovirus*. BLV является возбудителем широко распространенной медленной инфекции лейкоза крупного рогатого скота. Вирус может размножаться в культурах клеток крупного рогатого скота, ряда других млекопитающих, в том числе человека. По своей генетической структуре вирус содержит все гены, присущие семейству HTLV, включая ген *TAX*, который обладает трансактивирующими, трансформирующими функциями и является онкогеном. BLV может представлять собой реальный риск для развития онкологических болезней у человека.

Материалы и методы. Для исследований была выбрана группа доноров крови в количестве 200 человек (97 женщин и 103 мужчины) в возрасте от 18 до 56 лет. Предварительно доноры были тестированы на вирус иммунодефицита человека 1-го и 2-го типов, сифилис, вирусные гепатиты В и С; все пробы были расценены как негативные. От каждого образца лимфоцитарной массы с использованием тризол-метода была выделена РНК и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени синтезирована комплементарная ДНК (кДНК). Последующий пилотный анализ 200 алиquot был проведен методом nested-ПЦР с праймерами к генам *TAX* (200 b. p.), *ENV* (473 b. p.)

и POL (178 б. п.) BLV. Тестирование проводилось независимо в 2 лабораториях (РОНЦ им. Н.Н. Блохина и Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова).

Результаты. Методом ПЦР и секвенирования кДНК показано наличие РНК-транскриптов BLV в клетках 2 (1 %) из 200 здоровых доноров крови человека.

Выводы. Впервые в России получены данные по персистенции BLV у доноров крови человека. В связи с актуальностью результатов необходимы дальнейшие молекулярно-генетические исследования BLV, проведение филогенетического анализа выявленных позитивных образцов BLV у человека, определение их генетического происхождения в соответствии с филогенетической классификацией 8 известных генотипов BLV.

Биомолекулярные и лазерные технологии повышения эффективности вирусной терапии рака

В.А. Черешнев¹, А.Н. Бельских², С.Б. Оникиенко²,
А.В. Земляной², В.Ю. Кравцов³, С.В. Абкин³,
О.В. Матвеева⁴, А.Л. Ниворожкин⁵, Г.С. Соколовский⁶

¹ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина», Екатеринбург;

²ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург;

³АОУ ВПО «Ленинградский государственный университет», Санкт-Петербург;

⁴Biopolymer Design, Acton, MA, USA;

⁵Alternative Innovative Technologies, Boston, USA;

⁶ФГБУН «Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН», Санкт-Петербург

Введение. Перспективным направлением повышения эффективности онколитической вирусной терапии на основе вируса Сендай (CeV) может быть использование внеклеточных белков теплового шока 70 (БТШ-70). Импульсно-периодическое излучение лазера вызывает мобилизацию эндогенных БТШ-70 при облучении кожи в зоне введения CeV. БТШ-70 активируют дендритные клетки кожи, которые доставляют CeV в опухоль и запускают целевой иммунный ответ. Получены производные БТШ-70 пролонгированного действия на основе конъюгатов БТШ-70 с полиэтиленгликолем (ПЭГ) и Fc-фрагментом иммуноглобулина класса G.

Материалы и методы. Онколитическая вирусная терапия включала лазерное облучение участков кожи пациента с последующим внутрикожным введением в эти зоны CeV. Лечение проводили еженедельно в течение 12 нед у больных местно-распространенным и метастатическим раком ($n = 28$) при отсутствии у них эффекта от традиционной терапии. CeV применяли в сочетании с БТШ-70, БТШ-70–ПЭГ или БТШ-70–Fc.

Критерии эффективности вирусной терапии: регрессия опухоли, снижение онкомаркеров, селективная репликация CeV в клетках опухоли, выявление прямого цитопатического действия вируса на эти клетки, вторичных поражений в них, связанных с действием клеток-эффекторов иммунной системы.

Результаты. В группе контроля (изолированное применение CeV) положительный эффект получен у 7 из 77 пациентов, в основной группе — у 13 из 28 больных. БТШ-70, БТШ-70–ПЭГ, БТШ-70–Fc и излучение лазера значительно повышают целевой эффект CeV. Активируются вирус-специфические и иммунные механизмы гибели опухолевых клеток. Повышение перфорина и гранзима B (HScore = 250–300) в клетках-эффекторах иммунной системы сопровождается активацией механизмов гибели клеток опухоли. Резкое снижение их уровня (HScore = 30–50) сопровождается снижением эффективности вирусной терапии, гиперсекрецией воспалительных цитокинов и развитием системного воспалительного ответа.

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о значительном повышении эффективности вирусной терапии рака при использовании инновационных биомолекулярных и лазерных технологий.

Рак молочной железы и вирусная инфекция Эпштейна–Барр

Е.А. Шляхтунов, А.В. Савченко

УО ВГМУ ордена Дружбы народов, Республика Беларусь

В настоящее время не прекращаются поиски новых предикторов течения опухолевого процесса при раке молочной железы. Ассоциация вирусов и опухолевых процессов в организме продолжает интересовать и волновать многие научные сообщества во всем мире.

Цель работы — исследовать в опухолевой ткани карциномы молочной железы персистенцию вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) как возможного нового прогностического фактора опухолевой прогрессии.

Материалы и методы. В исследование было включено 178 образцов опухолевой ткани карцином молочной железы, в том числе 40 образцов — для ретроспективного анализа и 138 — для проспективного исследования. Проводилось определение наличия ядерного антигена ВЭБ (EBNA-1) в ткани карциномы молочной железы иммуногистохимическим (ИГХ) методом ($n = 40$ — ретроспективно, $n = 70$ — проспективно), а также выполнялся поиск ДНК вируса методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) ($n = 68$).

Результаты. В 53,5 % образцов опухолевой ткани подтверждено наличие вирусного ядерного антигена методом ИГХ и в 42,6 % образцов — методом ПЦР. Наиболее часто EBNA-1 и ДНК ВЭБ определялись

в материалах пациенток, имеющих метастазы в регионарные лимфатические узлы (N+), больных с опухолями высокой и средней степени злокачественности (G2–3), имеющих лимфовенозную инвазию (LVSI+), а также при гиперэкспрессирующих HER-2/neu раках и высоким индексе пролиферативной активности (Ki-67 > 50 %). Риск прогрессирования опухолевого процесса после завершения специального лечения в сроки до 21 мес повышается у 69,2–96,6 % женщин, у которых выявлена персистенция ВЭБ в опухолевой ткани. У 87,5 % пациенток с наличием вирусного генома (EBNA-1), подтвержденного ИГХ-методом, имеется риск умереть от рака молочной железы в течение 5 лет после установления диагноза.

Заключение. Ассоциация ВЭБ может рассматриваться как негативный прогностический фактор, способствующий прогрессированию опухолевого процесса и повышающий риск смерти от рака молочной железы. До настоящего времени не установлен патогенетический механизм влияния ВЭБ на опухолевую ткань карциномы молочной железы и способность данного вируса влиять на развитие лекарственной устойчивости к различным группам химиопрепаратов, применяемых для лечения рака данной локализации. Дальнейшее исследование этих механизмов с использованием культуры опухолевых клеток позволит оптимизировать подходы к лечению рака молочной железы.

Секция III

БИОЛОГИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ, РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

Экспрессия UCP-1, ароматазы и маркеров макрофагальной инфильтрации в жировой ткани больных раком эндометрия с различными фенотипами ожирения

Л.М. Берштейн, М.С. Мухина, А.Г. Иевлева, Д.А. Васильев
ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России,
Санкт-Петербург

Избыточная масса тела является одним из известных факторов риска развития рака эндометрия (РЭ). Эндокринные и паракринные факторы, продуцируемые жировой тканью (включая ее стромальные клетки, происходящие из мезенхимальных предшественников), могут способствовать индукции и поддержанию опухолевого роста. По имеющимся наблюдениям, ожирение гетерогенно; жировое депо большого сальника, локализующееся относительно недалеко от матки, может иметь с ней контакты за счет спаек и кровоснабжения, а экспрессия ассоциированного с термогенезом белка UCP-1 может быть более высока в оментальном жире по сравнению с подкожным, что позволяет отводить первому промежуточное положение между бурой и белой жировой тканью (Oberkofler et al., 1997).

Цель работы состояла в изучении особенностей оментального жирового депо у больных РЭ со «стандартным» (сопряженным с инсулинорезистентностью) (СО) и «метаболически здоровым» ожирением (МЗО).

Материалы и методы. В оментальной жировой ткани 50 нелеченых больных РЭ (средний возраст 60,1 года) иммуногистохимическим (ИГХ) методом оценивали экспрессию UCP-1, ароматазы и маркеров макрофагальной инфильтрации (CD68, CD163), а в выделенной тотальной РНК — относительную экспрессию мРНК UCP-1 и CYP19 (ароматазы) с помощью поли-

меразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в сравнении с экспрессией гена-рефери.

Результаты. По данным ИГХ установлено достоверное снижение экспрессии ароматазы и CD68 и тенденция к снижению экспрессии UCP-1 в оментальном жире при МЗО по сравнению СО (в группе с индексом массы тела $\geq 25,0$). В то же время экспрессия UCP-1 более выраженно коррелировала с клинической стадией заболевания в случае МЗО, а не СО. По результатам ПЦР в жировой ткани больных с МЗО на фоне заметного разброса индивидуальных данных выявлена лишь умеренная тенденция к более выраженной экспрессии гена ароматазы. Сравнение полученных результатов в группах больных с эндометриоидной аденокарциномой и неэндометриоидным подтипом РЭ не обнаружило каких-либо заметных различий.

Выводы. Фенотип ожирения при РЭ в большей степени определяет свойства жирового депо большого сальника, чем гистологический подтип заболевания. Не исключено, что свойства этого депо как элемента висцеральной жировой ткани могут преобладать над таковыми, присущими бурому жиру. Снижение, по данным ИГХ, интенсивности эстрогенообразования и макрофагальной инфильтрации жировой ткани у больных РЭ с МЗО может указывать на дополнительные механизмы более благоприятного в этом случае течения заболевания.

*Работа поддержана грантом
РФФИ № 15-04-00384.*

Экспрессионное профилирование различных морфологических структур опухоли молочной железы: маркеры инвазии, метастазирования и химиорезистентности

Т.С. Герашенко^{1,2}, Е.В. Денисов^{1,2}, М.В. Завьялова^{1,2},
В.М. Перельмутер¹, Н.В. Чердынцева^{1,2}

¹ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность оказывает существенное влияние на опухолевую прогрессию и эффективность химиотерапии рака молочной железы. **Целью исследования** явилось изучение экспрессионных особенностей различных морфологических структур опухоли молочной железы, обуславливающих их дифференциальный вклад в инвазию, метастазирование и химиорезистентность заболевания. С помощью лазерной микродиссекции PALM из свежемороженых опухолевых срезов 3 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа были получены тубулярные, альвеолярные, солидные, трабекулярные морфологические структуры и дискретные группы клеток. Для проведения микроматричного экспрессионного анализа из структур была получена мРНК, выполнена ее обратная транскрипция и полнотранскриптомная амплификация. Образцы комплементарной ДНК метились с помощью красителя Cy3, гибридизовались на микроматрицах SurePrint G3 v28 × 60k, биоинформатическая обработка проводилась с помощью пакета программ R и расширения LIMMA. Результаты экспрессионного анализа нормализовались относительно нормального эпителия молочной железы. Экспрессионный анализ показал, что все структуры характеризовались экспрессией общего кластера генов: *FN1*, *SI00A7*, *COL3A1*, *KIT*, *CTSD*, *EGLN3* и др. Кластерный анализ показал, что все структуры одного типа от разных пациентов группировались вместе. Кроме того, различные морфологические структуры демонстрировали специфическую экспрессию генов, связанных с опухолевой инвазией (*DCN*, *CDH1*, *ZEB1*, *EPCAM* и др.), метастазированием (*LOXL2*, *VEGFA*, *MTSS1*, *CCL2* и др.) и химиорезистентностью (*NAT1*, *ABCA12*, *ABCC1*, *PIK3C3* и др.), валидация которых в настоящее время проводится на большей группе больных раком молочной железы. Таким образом, различные типы структур опухолей молочной железы являются не только морфологически, но и функционально обособленными опухолевыми популяциями со специфическими экспрессионными характеристиками, отражающими

ми их инвазивный, метастатический и химиорезистентный потенциал.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ (проект № 14-15-00318).

Роль Е-кадгерина в диссеминации неопластических клеток

Н.А. Глушанкова, С.Н. Рубцова, И.Ю. Житняк

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва

Трансмембранный белок Е-кадгерин обеспечивает стабильную межклеточную адгезию в эпителиальных тканях. Угнетение его экспрессии считается неблагоприятным прогностическим маркером течения заболевания у онкологических больных, хотя в последнее время работы, посвященные иммуногистохимическому исследованию экспрессии Е-кадгерина в опухолях, подвергаются критическому разбору.

Для исследования роли Е-кадгерина в миграционной активности неопластических клеток были использованы линии эпителиальных клеток IAR, трансформированных *in vitro* онкогеном *Ras* или химическими канцерогенами: линии IAR-6-1 и IAR1170D11, F9, H5, сохранившие Е-кадгерин, и линии IAR1162C4, D3, F4, утратившие Е-кадгерин. Были получены стабильные линии, экспрессирующие флуоресцентные белки GFP и mKate2, а также линии, экспрессирующие GFP-Е-кадгерин, распределение которого в клетках совпадало с распределением эндогенного Е-кадгерина. Видео-микроскопические исследования показали, что трансформированные клетки, сохранившие экспрессию Е-кадгерина, способны к индивидуальной, а также к более эффективной коллективной миграции. С помощью конфокальной микроскопии было проанализировано поведение трансформированных клеток IAR, различающихся по экспрессии Е- и N-кадгерина, на монослое нормальных эпителиальных клеток линии IAR-2. Было обнаружено, что трансформированные эпителиоциты IAR-6-1 и IAR1170 способны прикрепляться к эпителиальному монослою, образуя смешанные Е-кадгериновые контакты с нормальными эпителиальными клетками. Трансформированные эпителиоциты, сохранившие экспрессию Е-кадгерина, могли мигрировать по поверхности эпителиального монослоя, а также инвазировать монослой на границах между нормальными клетками. При разрушении адгезионных взаимодействий в результате экзогенной экспрессии в трансформированных эпителиоцитах доминантно-негативного мутанта Е-кадгерина или супрессии Е-кадгерина с помощью малых интерферирующих РНК наблюдалось резкое угнетение инвазивной активности неопластических клеток. Таким образом, опосредованные Е-кадгерином межклеточные адгезионные взаимодействия могут играть существенную

роль на этапах диссеминации опухолевых клеток в организме.

Роль эпителиальных кадгеринов в регуляции механизмов метастазирования рака молочной железы

Ю.М. Засадкевич, А.А. Бриллиант, С.В. Сазонов

ГИАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург

Введение. Метастазирование рака молочной железы сопровождается реализацией эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), что обеспечивает способность опухолевых клеток к подвижности и миграции. Считается, что в активации ЭМП участвует Р-кадгерин, трансмембранная экспрессия которого наблюдается при развитии злокачественной опухоли. Одним из начальных этапов ЭМП является снижение экспрессии Е-кадгерина, а также увеличение экспрессии виментина.

Материалы и методы. Изучена экспрессия эпителиальных кадгеринов и связанных с ними катенинов, а также виментина в группах с наличием и отсутствием регионарных метастазов. Исследовано 208 случаев инвазивного долькового рака молочной железы иммуногистохимическим методом. Для определения экспрессии Е-кадгерина использовались антитела E-cadherin Clone EP700Y (Cell Marque, США), β -катенина — β -catenin Clone 14 (Ventana, США), p120-катенина — p120-catenin Clone 98 (Ventana, США), Р-кадгерина — Р-cadherin Clone 56C1 (Monosan, Нидерланды), виментина — Vimentin Clone V9 (DAKO, Дания).

Результаты и выводы. Цитоплазматическая экспрессия β -катенина (67 %) и p120-катенина (84 %) в большей степени выявлена в опухолях при отсутствии регионарных метастазов. Активация ряда сигнальных путей (канонический сигнальный путь Wnt, сигнальный путь с участием RhoГТФаз) указанными молекулами приводит к увеличению подвижности, миграции, инвазии, резистентности, выживаемости и пролиферации опухолевых клеток, а также к реализации ЭМП, что сопровождается развитием метастазов. Изменение экспрессии β - и p120-катенинов предшествует развитию регионарных метастазов. Экспрессия Р-кадгерина клетками опухоли остается высокой на любой стадии регионарного метастазирования, но существенно увеличивается к стадии N2 (с 86 до 91 % случаев; $p < 0,05$). Таким образом, механизмы, приводящие к экспрессии Р-кадгерина, усиливаются по мере развития опухолевого процесса. Выявлено также, что количество опухолей, экспрессирующих виментин, увеличивается к стадии N2 (с 70 до 84 %; $p < 0,05$), что является подтверждением реализации ЭМП и при-

обретения опухолевыми клетками способности к миграции, являющейся одним из условий развития метастазов.

Анализ прогностического значения измерения экспрессии арпина в опухолях молочной железы

М.Е. Ломакина¹, С. Вашер², В.Д. Ермилова¹, И. Бешь³, А. Готро², А.Ю. Александрова¹

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

²Политехническая школа, Национальный центр научных исследований Франции, Палезо Седекс;

³отдел генетики Института Кюри, Париж, Франция

Изменение характера клеточного движения играет ключевую роль в приобретении опухолевыми клетками способности инвазировать окружающие ткани и формировать отдаленные метастазы в процессе развития онкологических заболеваний. Исследование изменений в молекулярных путях, регулирующих клеточную подвижность, возникающих в процессе канцерогенеза, нужно для поиска новых возможных терапевтических мишеней или маркеров опухолевого роста. В частности, при развитии опухолей показано изменение экспрессии многих компонентов Рас-зависимого сигнального пути. Так, например, повышение экспрессии WAVE1/2 во многих инвазирующих опухолях, таких как гепатоцеллюлярный рак, рак легкого, меланома, коррелирует с неблагоприятным прогнозом заболевания и повышением вероятности образования метастазов (Kurisu S. et al., 2005; Yang L.Y. et al., 2006; Semba S. et al., 2006). Недавно был обнаружен новый компонент Рас-зависимого пути — арпин (Dang I. et al., 2013). Этот белок является ингибитором Arp2/3-комплекса, антагонистом WAVE и регулирует подвижность клеток в опытах *in vitro*. **Целью работы** являлось изучение возможности использования арпина в качестве прогностического маркера злокачественных новообразований.

Количественный анализ экспрессии мРНК в аденокарциномах молочной железы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени показал, что снижение уровня экспрессии арпина сопряжено с достоверным увеличением частоты формирования метастазов. Иммунофлуоресцентное исследование замороженных срезов нормальной и опухолевой тканей молочной железы человека выявило снижение экспрессии арпина в клетках аденокарциномы относительно клеток протоковых структур здоровой ткани и доброкачественных новообразований молочной железы. Уровень арпина был также снижен в метастазах в лимфатические узлы и соответствовал уровню экспрессии в первичной аденокарциноме.

Таким образом, снижение арпина в опухолях молочной железы на уровне белка ассоциировано со зло-

качественным ростом, а измерение уровня мРНК ар-пина в образце первичной опухоли может служить прогностическим маркером развития заболевания.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ и НЦНИ_a (проект № 14-04-91056).

Различные типы опухолевых сосудов при раке молочной железы: морфологическая характеристика и клиническое значение

Н.В. Никитенко¹, М.А. Сеньчукова², О.Н. Томчук²,
А.М. Дегтярев¹, Д.В. Киртбая¹, Д.П. Удовица¹,
А.А. Стадников²

¹ГБУЗ «Онкологический диспансер № 2» Минздрава
Краснодарского края, Сочи;

²ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский
университет» Минздрава России

Ключевым фактором опухолевой прогрессии является ангиогенез. Целью настоящего исследования было изучение морфологических особенностей опухолевых сосудов и их связей с клинико-морфологическими и биологическими особенностями рака молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. Исследованы образцы опухоли 59 пациенток с инвазивным РМЖ стадий T1–2 неспецифического типа. Срезы окрашивали гематоксилином Майера и эозином и иммуногистохимически с использованием антител к CD34. Оценивали морфологические особенности разных типов сосудов опухоли и сравнивали их количество с клиническими характеристиками РМЖ: стадиями T и N, степенью дифференцировки опухоли (G), статусом рецепторов к эстрогенам (РЭ) и прогестерону (РП) и HER-2/неу, наличием лимфоваскулярной инвазии (ЛВИ).

Результаты. В ткани РМЖ выделены следующие типы опухолевых сосудов: нормальные капилляры диаметром 5–40 мкм, дилатированные капилляры (ДК) перитуморальной стромы диаметром более 40 мкм и атипичные ДК (АДК) диаметром более 40 мкм, характеризующиеся хаотичным расположением эндотелиальных клеток. Количество ДК коррелировало с количеством АДК ($p = 0,0008$) и наличием ЛВИ ($p = 0,005$). При наличии множественных ДК чаще выявлялись множественные АДК (в 20,0; 28,6 и 57,9 % случаев соответственно при отсутствии единичных и множественных ДК; $p = 0,13$) и наблюдалась ЛВИ (в 40,0; 52,4 и 78,9 % случаев соответственно при отсутствии единичных и множественных ДК; $p = 0,12$). Наличие АДК коррелировало со степенью дифференцировки РМЖ ($p = 0,003$), содержанием РЭ ($p = 0,0007$) и РП ($p = 0,045$) в опухоли и наличием ЛВИ ($p = 0,0002$). Множественные АДК чаще встречались при степени дифференцировки G2–3 (0; 43,8 и 50 % случаев соответственно

при G1, G2 и G3; $p = 0,03$), негативном статусе РЭ (в 60,0 и 15,0 % случаев соответственно при негативном и позитивном статусе РЭ; $p = 0,008$) и РП (в 47,1 и 18,2 % случаев соответственно при негативном и позитивном статусе РП; $p = 0,22$). ЛВИ достоверно чаще встречалась при множественных АДК (в 30,0; 58,8 и 83,3 % случаев соответственно при отсутствии АДК, единичных и множественных АДК; $p = 0,02$). Связи плотности обычных капилляров с клиническими характеристиками РМЖ не выявлено.

Заключение. Опухолевые сосуды при РМЖ различаются по морфологии и клинической значимости. Наиболее значимыми в плане прогноза являются АДК и ДК перитуморальной стромы.

Клинические аспекты полостного типа ангиогенеза при раке желудка и молочной железы

М.А. Сеньчукова^{1,2}, О.Н. Томчук¹,
Н.В. Пучихина^{1,3}, Н.В. Зайцев^{1,2}

¹ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России;

²ГБУЗ «Оренбургский областной клинический
онкологический диспансер»;

³ГБУЗ ОД № 2 Минздрава Краснодарского края, Сочи

Ранее на примере рака желудка (РЖ) была предложена гипотеза «полостного» типа ангиогенеза (J Cancer 2014). Согласно этой гипотезе, образование опухолевых сосудов может быть связано с образованием полостных структур (ПС) в строме опухоли, последующей их выстилкой эндотелием и слиянием с сосудами органа. Мы предположили существование 2 основных механизмов образования описанных ПС. Первый механизм связан с отслойкой опухолевых клеток от подлежащей стромы и десквамацией их в просвет образовавшихся на их месте ПС, второй – с процессами образования и лизиса опухолевой стромы. Отмечено, что основным признаком «полостного» ангиогенеза 1-го типа является наличие ПС с частичной эндотелиальной выстилкой (ПС 1-го типа), 2-го типа – характерное «ячеистое» строение нежно-волокнутой соединительной ткани в перитуморальной области (ПС 2-го типа). Для оценки клинической значимости «полостного» типа ангиогенеза были исследованы образцы опухоли и прилежащих тканей 73 больных РЖ и 59 пациенток с раком молочной железы (РМЖ). Гистопрепараты окрашивали гематоксилином Майера и эозином и иммуногистохимически с использованием антител к CD34. Установлено, что наиболее значимым фактором прогноза при РЖ является наличие множественных ПС 1-го типа (SpringerPlus 2015). При их наличии достоверно чаще выявлялись T3–4 ($p = 0,008$) и N2 ($p = 0,006$) стадии РЖ. При наличии и отсутствии множественных ПС 1-го типа 3-летняя общая выживаемость составила 60,0 и 96,6 % соответственно ($p = 0,0013$),

а безрецидивная вживаемость — 36,0 и 89,4 % соответственно ($p = 0,0001$). Наличие ПС 2-го типа было связано только с диффузным типом РЖ ($p = 0,07$). При РМЖ множественные ПС 1-го типа достоверно чаще встречались при негативном статусе рецепторов к эстрогенам ($p = 0,03$) и прогестерону ($p = 0,03$) и значимо чаще ($p = 0,08$) — при наличии лимфоваскулярной инвазии (ЛВИ). Отмечена связь ПС 1-го типа с наличием атипичных дилатированных капилляров в интра-туморальной строме ($p = 0,0004$). Характерной особенностью таких капилляров было хаотичное расположение выстилающих эндотелиальных клеток. Их наличие было связано с негативным статусом рецепторов к эстрогенам ($p = 0,008$) и прогестерону ($p = 0,22$) и наличием ЛВИ ($p = 0,02$). В свою очередь, наличие ПС 2-го типа при РМЖ было связано с HER-2/neu-позитивным статусом ($p = 0,008$) и наличием ЛВИ ($p = 0,16$). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о важной роли «полостного» типа ангиогенеза в опухолевой прогрессии.

Взаимосвязь Т-хелперов и моноцитов периферической крови у больных раком молочной железы и раком желудка

М.Н. Стахеева, Н.В. Чердынцева, С.А. Тузиков,
Е.М. Слонимская, М.Р. Патышева
ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»

Исследования последних лет показали значение количественного и популяционного состава клеток иммунной системы, инфильтрирующих опухоль, для патогенеза злокачественных новообразований (ЗНО) (Galon J. et al., 2011, 2012; Stoll G. et al., 2015). Фенотипические и функциональные особенности клеток иммунной системы *in situ* определяются не только сигналами микроокружения, но и внутрисистемными влияниями, важное место среди которых занимает взаимодействие моноцитов/макрофагов и Т-хелперов (CD4⁺-лимфоцитов) (Zhu J., Paul W.E., 2010; Santarlasci V. et al., 2013). **Цель исследования** — сравнить структуру корреляционных связей между популяциями CD4⁺-лимфоцитов и моноцитов периферической крови (ПК) у больных ЗНО различного патогенеза — раком молочной железы (РМЖ) и раком желудка (РЖ).

Материалы и методы. В исследование включены 8 больных РЖ и 10 пациенток с РМЖ стадии T1N0–3M0, проходивших лечение в Томском НИИ онкологии. Диагноз верифицирован морфологически. Фенотипические особенности Т-лимфоцитов и моноцитов ПК оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител (BD Pharmingen) к поверхностным CD-маркерам и внутриклеточным цитокинам. Исследование проводили до на-

чала противоопухолевого лечения. Корреляционный анализ осуществляли с использованием программы Statistica.

Результаты. Ключевое место в структуре корреляционных связей между моноцитами и CD4⁺-лимфоцитами ПК у больных РМЖ занимает популяция CD4⁺-лимфоцитов, продуцирующих одновременно функциональные цитокины Th1- и Th2-клеток — IFN- γ и IL-4 соответственно. С данной популяцией коррелируют показатели абсолютного количества моноцитов ($r = 0,77$), а также доля моноцитов, экспрессирующих рецептор к IL-4 (CD124) ($r = 0,9$), что указывает на готовность к поляризации в M2-популяцию, обладающую свойствами содействия опухолевой прогрессии. У пациентов с РЖ выявлена более тесная связь исследуемых пулов клеток ПК, среди которых выделены 4 ключевые популяции, связанные в единый комплекс. Это провоспалительные M1- (CD68⁺) и TLR2⁺-моноциты, CD4 + IFN- γ + IL4 (Th1) лимфоциты и CD4-лимфоциты, экспрессирующие рецептор к IL-4.

Заключение. У больных РМЖ и РЖ имеются выраженные различия в структуре корреляционных связей между важными регуляторными популяциями клеток иммунной системы (моноциты и CD4⁺-лимфоциты), что может определять особенности патогенеза злокачественных новообразований данных локализаций и, соответственно, выбор патогенетически обоснованных подходов к противоопухолевой терапии.

Коллагеназа MT1-ММП, ее эндогенные регуляторы и ангиотензинпревращающий фермент как факторы деструкции и ангиогенеза при плоскоклеточной карциноме шейки матки

О.С. Тимошенко, Е.В. Кугаевская,
Т.А. Гуреева, Н.И. Соловьева

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

В основе роста и развития опухоли, ее способности к инвазии и метастазированию лежат 2 основных процесса — деструкция и ангиогенез, в которые вовлечены матриксные металлопротеиназы (ММП), их эндогенные регуляторы и ренин-ангиотензиновая система (РАС). Мембраносвязанная коллагеназа MT1-ММП наряду с другими ММП участвует в разрушении компонентов соединительнотканного матрикса. Активация про-MT1-ММП осуществляется внутриклеточно в аппарате Гольджи с помощью сериновой протеиназы — фурина. Активность MT1-ММП ингибируется эндогенным тканевым ингибитором ТИМП-2, кото-

рый, кроме того, участвует в активации про-ММП-2 — желатиназы, гидролизующей фибриллярные коллагены и коллаген базальных мембран. Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) — ключевой фермент РАС — обнаружен в различных злокачественных опухолях человека. РАС-опосредованный сигналинг направлен на пролиферацию клеток и стимуляцию ангиогенеза. При злокачественной трансформации наблюдается активация опухолевых РАС, что выражается в повышенном образовании ангиотензина II под действием АПФ и экспрессии рецептора ангиотензина II.

Исследование проведено на 11 парах образцов плоскоклеточной карциномы шейки матки (ПКШМ), включающих опухоль и прилегающую к опухоли морфологически нормальную ткань, методами полимеразной цепной реакции в реальном времени, иммуногистохимии и энзимологии. Обнаружено, что в опухолевой ткани повышена как экспрессия МТ1-ММП, так и уровни активности фурина и АПФ, а также снижена экспрессия ингибитора ТИМП-2, что направлено на увеличение инвазивного потенциала опухоли. В прилегающей к опухоли морфологически нормальной ткани обнаружена существенная экспрессия МТ1-ММП и АПФ, которая вносит свой дополнительный вклад в увеличение деструктивного и ангиогенного потенциала опухоли. Данные важны для понимания механизма деструкции матрикса, ангиогенеза, развития процессов инвазии и метастазирования, имеют прогностическое значение при ПКШМ.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы.

Влияние Е-кадгерина на проявление фенотипа опухолевых стволовых клеток

М.Д. Фармаковская, Н.В. Хромова, В.А. Рыбко,
П.Б. Копнин

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

Целью данного исследования является изучение влияния модуляции экспрессии гена Е-кадгерина на проявление черт фенотипа опухолевых стволовых клеток (ОСК) на модели аденокарциномы легкого человека.

Материалы и методы. Получены линии клеток аденокарциномы легкого человека (А549) с повышенным уровнем и с подавленной экспрессией гена Е-кадгерина. Показано, что утрата Е-кадгерина ассоциировалась с приобретением клетками аденокарциномы легкого мезенхимальных черт: веретеновидной формы и увеличенной миграционной активности. Также подавление экспрессии Е-кадгерина приводило к увеличению доли ОСК в популяции клеток аденокарциномы легкого: росту способности к колониеобразованию в неприкрепленных условиях, повышению количества клеток с увеличенной активностью АВС-транспортеров и уменьшению минимальной прививочной дозы при инъекции бестимусным мышам. Кроме того, для сублинии клеток, утратившей экспрессию гена Е-кадгерина, было показано увеличение экспрессии ряда маркеров плюрипотентности: Oct 3/4, Nestin и Sox2, что также указывает на повышение доли ОСК в популяции.

Заключение. Утрата экспрессии Е-кадгерина клетками аденокарциномы легкого человека может вызывать увеличение количества неопластических клеток, обладающих свойствами ОСК, и приводить к формированию более злокачественного фенотипа опухоли.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (соглашение № 14-15-00467).

Секция IV

СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Влияние малой ГТФазы Arf6 на динамику роста клеток глиобластомы и немелкоклеточного рака легкого

А.Ю. Журавская, А.Д. Еникеев, К.Б. Соколинский,
А.В. Комельков, И.Б. Зборовская, Е.М. Чевкина

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

Введение. Малая ГТФаза Arf6 известна своим участием в опухолевой прогрессии за счет регуляции везикулярного транспорта и изменения цитоскелета. Однако в литературных источниках отсутствуют сведения о воздействии Arf6 на пролиферацию клеток человека и ее влиянии на сигнальные пути, регулирующие пролиферативный потенциал клетки, — в частности на mTOR- и ERK1/2-зависимые сигнальные каскады. **Целью** данной работы было определение роли малой ГТФазы Arf6 в пролиферативной активности клеток глиобластомы и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) человека и участия данного белка во внутриклеточных сигнальных путях, ассоциированных с ростом клеток.

Материалы и методы. В работе использовались клеточные линии глиобластомы (LN229 и U87) и линии НМРЛ (A549 и H1299), в которых проводили направленную модификацию экспрессии Arf6. Производные линии с гиперэкспрессией белка Arf6 дикого типа (Arf6 WT), а также с экспрессией конститутивно активной формы белка Arf6 (Arf6 Q67L) получали методом ретровирусной инфекции. Производные линии с подавлением эндогенной экспрессии гена *Arf6* получали при помощи экспрессии 2 различных последовательностей малых шпилечных РНК (shRNA) с использованием метода лентивирусной инфекции. Динамику клеточного роста оценивали методом прямого подсчета в камере Горяева, способность к автономному росту — в тесте на клоногенность. Экспрессию и статус фосфорилирования исследуемых белков анализировали методом вестерн-блот-гибридизации. Анализ ак-

тивности фосфолипазы D осуществляли с помощью коммерческого кита Amplex® Red Phospholipase D Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Клеточный цикл изучали методом проточной цитофлуориметрии. Анализ активности протеиназ, расщепляющих внеклеточный матрикс, — матриксных металлопротеиназ MMP2 и MMP9, активаторов плазминогена uPA и tPA — проводили методом субстрат-специфичной зимографии в полиакриламидном геле.

Результаты. Впервые обнаружена Arf6-зависимая стимуляция пролиферации клеток глиобластомы. Показано, что гиперэкспрессия Arf6 увеличивает динамику клеточного роста как в условиях стандартного клеточного микроокружения, так и в условиях автономного роста, а подавление эндогенного Arf6 снижает пролиферацию, стимулирует апоптоз и уменьшает долю клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла. Впервые показано, что экспрессия Arf6 в клетках глиобластомы приводит к стимуляции mTOR-зависимого сигнального пути, включая активацию основной мишени mTOR — киназы рибосомального белка S6 (p70S6K), а также последующих эффекторов сигнального пути mTOR: рибосомального белка S6 и белка 4E-BP1, участвующих в инициации трансляции. Обнаруженная Arf6-зависимая стимуляция является альтернативным механизмом активации mTOR-сигнального пути, не зависящим от сигнального каскада PI3K-Akt. Белок Arf6 участвует в негативной регуляции ERK1/2 в клетках глиобластомы — уровень активирующего фосфорилирования ERK1/2 обратно пропорционален уровню экспрессии Arf6 в клетке. Конститутивная активация Arf6 в клетках глиобластомы усиливает активность фосфолипазы D (PLD). Впервые показано, что Arf6 стимулирует пролиферацию и автономный рост клеток НМРЛ и активирует в них mTOR-зависимый сигнальный путь. Выявлено усиление секреции MMP9 при гиперэкспрессии Arf6 в клетках A549 и снижение секреции MMP2 при нокдауне *Arf6* в клетках глиобластомы.

Выводы. В работе впервые обнаружено, что Arf6 стимулирует пролиферацию и автономный рост клеток

глиобластомы и НМРЛ, а также активирует mTOR-зависимый сигнальный путь. Показано, что в клетках глиобластомы Arf6 играет негативную роль в регуляции активности протеинкиназы ERK1/2. Подтверждено значение активации Arf6 в стимуляции активности фосфолипазы D. Выявлено положительное влияние Arf6 на секрецию отдельных протеиназ внеклеточного матрикса.

Влияние исследуемых цитостатиков К-1, К-2, К-30 на активность Pdr5p интактных и резистентных клеток *Saccharomyces cerevisiae* и экспрессию MDR2 саркомы 180

А.А. Ибрагимов, О. Касымов, З.М. Еникеева,
И.В. Карпышева

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

На клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (модели для изучения биологии клеток млекопитающих) были проанализированы механизмы действия цитотоксинов: камптотецина — ингибитора топоизомераз I и II; верапамила, резерпина, цефалоспоринов, являющихся модуляторами трансмембранного белка Pgp, и т. д.

Цель исследования заключалась в изучении влияния новых производных трополоновых алкалоидов К-1, К-2 и К-30 на модулирование активности лекарственного транспортера Pdr5p модельных клеток *S. cerevisiae* и саркомы 180.

Материалы и методы. Получены модели клеток *S. cerevisiae*, резистентных к К-1, К-2 и К-30 в дозах 40, 100 и 9 мкг/мл соответственно; в качестве сравнения были выбраны этопозид (15 мкг/мл) и доксорубин (1,8 мкг/мл). Рост клеток каждого исследуемого варианта анализировали в чашках Петри на твердой среде для дрожжей *S. cerevisiae*, на интактной среде и средах, содержащих указанные концентрации препарата. Уровень Pdr5p анализировали по количеству роста колоний клеток под воздействием исследуемого препарата против контрольного варианта. Для оценки межнуклеосомной деградации ДНК выделенные препараты ДНК анализировали посредством электрофореза. Для исследования влияния исследуемых препаратов на экспрессию гена *MDR2* из опухолевой ткани саркомы 180 под воздействием каждого препарата были получены тотальные препараты РНК. Затем методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) были получены мРНК и синтезированы комплементарной ДНК.

Результаты. Показано, что К-1, К-2 и К-30 ингибируют рост интактных клеток дрожжей в пределах 65–80 % (этопозид — в пределах 40 %). На резистентных клетках *S. cerevisiae* К-1 на 1-е и 3-и сутки инги-

бирует их рост на 35 и 36,7 %; К-2 — на 30 и 18,2 %; К-30 — на 55 и 37,5 %; соответственно. Этопозид как на 1-е, так и на 3-и сутки способствует росту резистентных клеток выше контроля, в пределах 20–25 %. На опухолевой ткани саркомы 180 методом ОТ-ПЦР показано, что К-1 и К-30 подавляют экспрессию *MDR2* в пределах 80 %, а К-2 и этопозид — на 65 и 70 % соответственно.

Выводы. Новые препараты К-1, К-2 и К-30 не способствуют развитию множественной лекарственной устойчивости, обусловленной как Pdr5p *S. cerevisiae*, так и геном *MDR2* саркомы 180, по-видимому, из-за межнуклеосомной деградации и фрагментации ДНК. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что *S. cerevisiae* являются удобной моделью для изучения множественной лекарственной устойчивости.

Работа поддержана грантом
Республики Узбекистан ФДСС 12.7.

Иммуногистохимический анализ экспрессии генов *p53*, *Bcl2*, *Ki-67* в опухолевых клетках больных ретинобластомой

З.С. Исламов¹, Н. Отаева¹, М.С. Гильдиева¹,
А.А. Абдувалиев²

¹РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент;

²Ташкентская медицинская академия,
Республика Узбекистан

Поиск дополнительных причин трансформации клеток способствовал проведению исследований по изучению кооперативного взаимодействия генов *p53*, *Bcl2* и *Ki-67* и их роли в процессе возникновения и развития ретинобластомы (РБ).

Ядерный белок гена *p53* является одним из регуляторов клеточного цикла, он блокирует его на стадии G1/S, что не позволяет клетке с геномными нарушениями ДНК произвести дальнейшую ее репликацию. Мутации этого гена приводят к отключению апоптоза.

Bcl2 — антиапоптотический ген митохондриальной мембраны. Он кодирует белок, который подавляет апоптоз; гиперэкспрессия онкобелка Bcl-2 ассоциируется с хромосомной транслокацией t(14.18).

Ki-67 избирательно экспрессируется на пролиферирующих клетках во время клеточного цикла (G1, S, G2 и M). Существует строгая позитивная корреляция между высоким индексом Ki-67 и гистологией неоплазий высокой степени.

Нами проведен иммуногистохимический анализ 50 образцов опухолевой ткани больных РБ. В 38 (76 %) образцах выявлена положительная реакция на наличие мутантного гена *tp53*, экспрессия гена *Bcl2* наблюдалась в 22 (44 %) образцах, положительная реакция на наличие *Ki-67* — в 92 % образцов.

Анализ полученных результатов показал, что у 76 % обследованных больных наблюдается разблокирование клеточного цикла за счет появления мутантного гена *p53* (*mtp53*). Поэтому клетки с генными и геномными нарушениями продолжают делиться, о чем свидетельствует наличие высокой экспрессии *Ki-67*.

Следовательно, пролиферативной активностью обладает подавляющее большинство опухолевых образцов больных РБ. Отсутствие нормального (дикого — *wtp53*) гена апоптоза, возможно, приводит к снижению экспрессии антиапоптотического гена *Bcl2*, который ингибирует апоптоз в клетках РБ.

Таким образом, выявлена роль генов апоптоза и пролиферации в развитии РБ, дальнейшие исследования в этой области позволят установить новые механизмы возникновения РБ, открыть новые мутации в гене-супрессоре *RBI* и генах-кандидатах, участвующих в активации опухолевого процесса в клетках сетчатки.

Экспрессия потенциальных генов-маркеров при диссеминированном раке желудка

Ф.М. Кипкеева¹, М.Н. Нариманов², Т.А. Музаффарова¹,
О.А. Малехова², А.В. Карпухин¹

¹ФГБНУ МГНЦ, Москва;

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

Среди большого количества молекулярно-генетических показателей, которые могут влиять на клиническое течение рака желудка (РЖ), особое место отводится поиску маркеров, связанных с метастазированием. Высокая частота выявления РЖ уже на поздних стадиях развития требует разработки маркеров для проведения персонализированной системной терапии.

Изучали количественные профили экспрессии набора генов — потенциальных маркеров (*VEGF*, *VEGFR1*, *VEGFR2*, *NRP-1*, *bFGF*, *FGFR2*, *TGF-β*, *HER-2/neu*, *TUBB*, *BRCA1*, *Ki-67*, *PCNA*) методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени в парных образцах опухоль—норма при диссеминированном РЖ (ДРЖ). Также анализировали наличие корреляций в уровнях экспрессии изученных генов. Наиболее часто повышенный уровень мРНК в опухоли по отношению к контролю наблюдался для генов *TGF-β* и *NRP-1* (в 41 и 32 % случаев соответственно). Экспрессия этих генов представляет существенный интерес как вследствие их значения для прогрессии и метастазирования рака, так и высокой частоты ее повышения. Впервые при РЖ обнаружена корреляция уровней экспрессии *NRP-1* и *TGF-β*. Найденная коэкспрессия может отражать в качестве некоторых вероятных механизмов необходимость ко-рецепторных взаимодействий этих генов либо связки сигналь-

ного пути *TGF-β* с путем *Hedgehog* для обеспечения прогрессирования опухоли при ДРЖ. Интересно, что экспрессия обоих этих генов коррелирует с экспрессией гена *VEGFR2*, повышенной в 32 % случаев. Как известно, рецепторы *VEGFR2* и *NRP-1* способны взаимодействовать между собой, что может усиливать ангиогенный эффект их стимуляции. Видимо, координация экспрессии генов *TGF-β*, *NRP-1* и *VEGFR2* связана с высоким метастатическим потенциалом прогрессирующей опухоли при ДРЖ.

Неожиданным было обнаружение обратной корреляции экспрессии генов *VEGF* и *bFGF*. Хотя оба эти фактора обладают стимулирующими ангиогенез свойствами, спектр экспрессирующихся под их воздействием генов различен. Данные, указывающие на непосредственную взаиморегуляцию этих генов, не найдены. Скорее всего, выявленный эффект отражает альтернативные пути стимуляции развития ДРЖ, и его необходимо учитывать при выборе средств таргетной терапии этого заболевания.

Анализ экспрессии генов системы пробелокконвертаз в опухолях легкого и пищевода человека

А.А. Комиссаров¹, С.И. Кошечкин¹, А.В. Сассе²,
А.И. Тарасова³, А.В. Шубин^{1,3}

¹ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН», Москва;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;

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

Пробелокконвертазы (ПБК) — семейство высокоспецифичных субтилизин-подобных сериновых эндопептидаз млекопитающих, основная функция которых заключается в процессинге различных белков и пептидов. Интерес к изучению данных ферментов вызван тем, что ПБК, активируя ключевые опухоль-ассоциированные белки, влияют на способность злокачественных клеток к пролиферации, миграции и преодолению межтканевых барьеров. Установлено, что уровень экспрессии генов ПБК в опухолевых клетках изменен. Кроме этого, обнаружены корреляции экспрессии некоторых ПБК с агрессивностью опухолей, нейроэндокринным фенотипом злокачественных клеток и послеоперационной выживаемостью пациентов. Эти данные позволяют рассматривать ПБК в качестве маркеров для классификации опухолей и прогноза течения онкологических заболеваний, а также как потенциальные мишени для терапии.

В данной работе впервые методом количественной полимеразной цепной реакции была определена экспрессия всех генов ПБК на уровне мРНК в опухолевых и окружающих нормальных тканях, полученных от 30 пациентов с диагнозом «рак легкого» и 19 пациентов с диагнозом «рак пищевода». Обнаружены ста-

тистически значимые изменения экспрессии генов некоторых ПБК: в опухолях легких — повышение уровня мРНК гена *FURIN* и снижение *PCSK2*, *PCSK5*, *PCSK7*, *PCSK9* и *MBTPS1*; в опухолях пищевода — повышение уровня мРНК генов *FURIN*, *PCSK9* и *MBTPS1*. При этом корреляции между экспрессией ПБК и имеющимися клиническими характеристиками опухолей не выявлены. Кластерный анализ паттернов изменений экспрессии генов ПБК в опухоли относительно нормальной ткани позволил выявить 4 типа образцов. Для 3 из них, охватывающих около 80 % всей выборки, показано наиболее сильное повышение экспрессии в опухоли 1 из 3 генов ПБК: *FURIN*, *PCSK1* или *PCSK6*. Четвертый тип более гетерогенен.

Таким образом, экспрессия генов ПБК в злокачественных опухолях легкого и пищевода человека изменена, причем изменения происходят по нескольким основным сценариям, что, по-видимому, отражает ранее неизвестные свойства опухолей.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 14-04-31395).

Роль сигнальных путей, контролируемых белком KIT, в выживании клеток нейробластомы

Т.Д. Лебедев¹, П.В. Спирин¹, А.А. Буздин², В.С. Прасолов¹

¹ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

²Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва

Протеинкиназы регулируют активность многих сигнальных путей, отвечающих за выживание клеток нейробластомы (НБ), поэтому они рассматриваются как перспективные терапевтические мишени для лечения НБ. В большинстве случаев НБ выявляется экспрессия рецепторной тирозинкиназы KIT. Ее гиперэкспрессия связана с увеличением экспрессии MYCN и, в конечном счете, неблагоприятным исходом. Тем не менее окончательно не ясна роль KIT в развитии НБ и поддержании злокачественного статуса клеток. Для установления роли KIT в выживаемости клеток НБ мы подавляли экспрессию гена *c-kit* методом РНК-интерференции в 2 линиях клеток НБ с различными уровнями экспрессии данного гена: SH-SY-5Y и SK-N-AS (в SH-SY-5Y выявлено в 10 раз больше мРНК *c-kit*, чем в SK-N-AS). Для подавления экспрессии *c-kit* использовали лентивирусные векторы, направляющие экспрессию малой шпилечной РНК (shRNA) против мРНК *c-kit* (shKIT) и неспецифической контрольной shRNA (shSCR). Было проведено транскриптомное профилирование, чтобы определить, какие сигнальные пути регулируются KIT в клетках НБ и приводят к гибели клеток после подавления гена *c-kit*, а также выявить изменения в сигнальных путях, которые могут позволить некоторым клеткам НБ выжить после

подавления *c-kit*. Мы провели профилирование на 3-й день после трансдукции лентивирусными векторами, когда еще не наблюдалось никаких существенных изменений в пролиферации трансдуцированных SH-SY-5Y; на 6-й день, когда клетки SH-SY-5Y с подавленным *c-kit* начали погибать; и через 2 нед, когда получили стабильную линию клеток SH-SY-5Y, в которых подавлена экспрессия гена *c-kit* (SH-SY-5Y shKIT). Никаких существенных изменений в пролиферации клеток линии SK-N-AS после подавления *c-kit* не наблюдалось.

Работа выполнена при поддержке

Федеральной целевой программы

«Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0030).

Белок PRAME функционирует как мембранный ауторецептор

В.А. Мисюрин¹, А.В. Мисюрин¹, Н.А. Лыжко¹, Т.В. Ахлынина¹,
А.Е. Мисюрина², Ю.П. Финашуткина¹, Л.А. Кесаева¹,
А.В. Пономарёв¹, М.А. Барышникова¹, О.С. Бурова¹

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

²ФГБУ «Гематологический научный центр»

Минздрава России, Москва

Белок PRAME является важным компонентом убиквитинкиназы Cullin2. Он участвует в убиквитинировании многих белков, в том числе RARα. Кроме того, PRAME активирует экспрессию генов, ответственных за пролиферацию и блокирующих дифференцировку клетки, и инактивирует экспрессию проапоптотического гена *TRAIL*. Экспрессия *PRAME* при онкологических заболеваниях оказывает негативное влияние на прогноз. В нескольких работах сообщается, что ген *PRAME* может быть активирован бактериальными липополисахаридами и пептидогликанами. Активацию гена связывают с наличием неизвестного мембранного рецептора, распознающего бактериальные детерминанты. В работе Williams и соавт. (1998) указано, что гонокки используют поверхностные белки OIPs человека для проникновения внутрь клеток. Ген одного из OIPs, согласно данным Williams и соавт., идентичен гену *PRAME*.

Цель работы — показать, что гипотетическим рецептором на поверхности клетки является сам белок PRAME.

Материалы и методы. Клеточные линии K562, W138 и W138, трансфицированная геном *PRAME* (W138-PRAME), были проинкубированы с анти-PRAME-антителами и вторичными окрашенными антителами. Методом проточной цитофлуориметрии на цитометре FACSCantoII была определена степень связывания анти-PRAME-антител с клетками крови 2 больных

В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом и 1 большого множественной миеломой. Клетки линий NOMO1 и THP1 были проинкубированы с анти-PRAME-антителами. Уровень экспрессии PRAME в культурах клеток K562, NOMO1, WI38, WI38-PRAME и THP1 и у больных была определен методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты и обсуждение. С помощью вторичных окрашенных антител и проточной цитометрии показано, что анти-PRAME-антитела связываются поверхностью PRAME-экспрессирующих клеток K562 и WI38-PRAME и клеток больных. Нетрансфицированные клетки WI38 не имели на поверхности белка PRAME и не связывали антитела. Таким образом, мы показали поверхностную локализацию PRAME. Связывание анти-PRAME-антител с поверхностью клеток линий NOMO1 и THP1 вызывало значительное (на порядок) повышение уровня экспрессии PRAME относительно контроля, что доказывает способность белка PRAME, находящегося на поверхности клетки, связываться с субстратом и активировать экспрессию собственного гена.

Роль сигнальной функции интегрина $\alpha 5 \beta 1$ в механизмах апоптоза и лекарственной резистентности опухолевых клеток

Г.Е. Морозевич¹, Н.И. Козлова¹, О.Ю. Сусова²,
Н.А. Ушакова¹, Н.М. Геворкян¹, А.Е. Берман¹

¹ФГБУ «ИБМХ им. В.Н. Ореховича», Москва;

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

Опухолевые клетки при злокачественной прогрессии приобретают свойства, в основе которых лежат модификации сигналов, инициируемых внеклеточным матриксом. Одним из таких свойств является резистентность к различного рода стрессам, в частности к апоптозу — апоптозу, индуцируемому нарушением матрикс-клеточных контактов, устойчивость к лекарственным препаратам и др.

Основными посредниками в проведении сигналов от матрикса в клетку являются интегрины, и их роль в ответе клеток на стрессовые ситуации продемонстрирована многими исследователями (Chiarugi P., Giannoni E., 2008; Desgrosellier J.S., Cheresh D.A., 2010; Morozovich G.E. et al., 2006). Однако пути передачи интегрин-опосредованных сигналов, контролирующих апоптоз и лекарственную резистентность, требуют дальнейшего изучения.

Ранее мы показали, что клетки резистентной к доксорубину линии MCF-7Dox, производной от доксорубин-чувствительной линии MCF-7 карциномы молочной железы человека, отличаются от последней резким снижением экспрессии интегрина $\alpha 2 \beta 1$, уве-

личением экспрессии интегрина $\alpha 5 \beta 1$, более высокой инвазивной активностью и резистентностью к апоптозу (Morozovich G.E. et al., 2008). Согласно недавним полученным нами результатам, подавление экспрессии рецептора $\alpha 5 \beta 1$ в указанных клетках специфической малой интерферирующей РНК оказывает стимулирующий эффект на субстрат-зависимый апоптоз (апоптоз) и повышает чувствительность клеток к доксорубину. Торможение экспрессии $\alpha 5 \beta 1$ сопровождается резким ингибированием активности сигнальных фосфокиназ Akt и Erk2. Полученные данные свидетельствуют об общности интегрин-опосредованных сигнальных механизмов, контролирующих апоптотическую гибель клеток при различных стрессовых воздействиях.

Исследования поддержаны РФФИ (проекты № 14-04-00783, № 15-04-05511).

Количество CD14⁺HLA-DR^{low/-}-клеток влияет на количество PRAME-положительных опухолевых клеток в крови больных онкогематологическими заболеваниями

А.В. Пономарёв¹, В.А. Мисюрин¹, Е.Н. Мисюрина²,
Л.С. Маврина², Е.Ю. Гришина², М.Н. Стрекова²,
Е.А. Пенская³, О.С. Бурова¹, А.Н. Иншаков¹,
М.А. Барышникова¹, А.В. Мисюрин¹

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

²ГБУЗ ГКБ № 52 ДЗМ;

³ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва

В норме у большинства здоровых людей на поверхности примерно 80 % моноцитов наблюдается коэкспрессия CD14 и HLA-DR. При онкогематологических заболеваниях снижается количество моноцитов, экспрессирующих HLA-DR. Описана популяция миелоидных супрессоров с фенотипом CD14⁺HLA-DR^{low/-}. Данные клетки подавляют противоопухолевый иммунитет, в связи с чем можно ожидать увеличение опухолевой массы у больных онкогематологическими заболеваниями. Поскольку опухолевые клетки часто экспрессируют белок PRAME, можно оценивать их количество по данному маркеру.

Цель работы — оценить количество миелоидных супрессоров и опухолевых клеток в крови у больных множественной миеломой и пациентов с грибовидным микозом по сравнению со здоровыми донорами.

Материалы и методы. Методом проточной цитофлуориметрии на цитометре FACSCantoII с помощью антител к HLA-DR, CD14 и PRAME было определено количество миелоидных супрессоров и опухолевых клеток у 3 первичных больных множественной миело-

мой и 2 первичных больных грибовидным микозом, а также у 5 здоровых доноров. Количество миелоидных супрессоров оценивали в моноцитарном гейте как долю (в %) клеток $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ среди $CD14^+$ -клеток. Уровень экспрессии гена *PRAME* у больных определяли методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Количественное сравнение проводили по критерию Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение. Среднемедианное количество $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ у здоровых доноров составляет 5,1 %, у больных грибовидным микозом – 6,0 %, что сопоставимо с показателями здоровых доноров ($p = 0,8576$), у пациентов с множественной миеломой – 51,2 %, что существенно больше, чем у здоровых доноров ($p = 0,0363$). Среднемедианное количество *PRAME*-экспрессирующих клеток у больных множественной миеломой составляло 8,6 %, у пациентов с грибовидным микозом – 2,0 % и у здоровых людей – 0 %. Наблюдалась четкая положительная корреляция между количеством $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ -клеток и *PRAME*-экспрессирующих клеток. Мы полагаем, что $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ -клетки супрессируют противоопухолевый ответ, что позволяет разрастаться пулу опухолевых *PRAME*-положительных клеток.

Роль Notch во взаимодействии трансформированных и нормальных клеток

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

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

Солидные опухоли человека состоят не только из трансформированных клеток, но и из стромальных элементов, к которым, в частности, относятся и опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ). ОАФ могут влиять на опухолевую прогрессию, ремоделируя внеклеточный матрикс, секретируя факторы роста и цитокины, а также формируя специфические ниши для опухолевых стволовых клеток. ОАФ по своим характеристикам сходны с нормальными миофибробластами и характеризуются экспрессией α -гладкомышечного актина.

Сигнальный путь Notch активирован во многих опухолях человека. Он стимулирует пролиферацию, дедифференцировку и инвазию клеток. Однако основной акцент в изучении этого каскада сделан на его активацию в трансформированных клетках. Он активируется при непосредственном физическом контакте лиганд- и рецептор-несущих клеток.

В данной работе показано, что активация сигнального каскада Notch в нормальных фибробластах человека необходима для приобретения ими фенотипа миофибробластов. Такие активированные мезенхимальные клетки приобретают способность стимули-

ровать рост подкожных ксенографтов клеток аденокарциномы легкого человека и рака толстой кишки человека у голых мышей, интегрируясь в опухоль и становясь, таким образом, ОАФ.

Мы показали, что взаимодействие неопластических и мезенхимальных клеток активирует в последних сигнальный каскад Notch, что стимулирует продукцию TGF β . Подавление активации рецепторов этого цитокина с помощью химических ингибиторов блокирует образование миофибробластов *in vitro* при совместном культивировании с трансформированными клетками. Более того, активации мезенхимальных клеток не происходит и в фибробластах с подавленной экспрессией p53.

Таким образом, активация Notch в нормальных фибробластах человека при контакте с трансформированными клетками приводит к усилению синтеза TGF β , активируя p53-зависимое формирование фенотипа миофибробластов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (соглашение № 14-15-00467).

Диагностический потенциал экзосом, связанных с клетками крови

С.Н. Тамкович^{1,2}, О.С. Тутанов¹, А.Е. Григорьева¹, Н.А. Кирюшина³, В.И. Пермякова⁴, В.Е. Войццкий³, Е.И. Рябчикова^{1,2}, П.П. Лактионов^{1,5}

¹ИХБФМ СО РАН, Новосибирск;

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»;

³ГБУЗ «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер»;

⁴Центральная клиническая больница СО РАН, Новосибирск;

⁵ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России

Поиск в крови маркеров, характерных для онкотрансформированных клеток, является актуальной задачей молекулярной онкологии. Поскольку в кровотоке онкологических больных циркулируют экзосомы, секретируемые клетками опухолей и содержащие биополимеры, характерные для этих клеток, циркулирующие экзосомы рассматриваются в качестве удобного источника диагностического материала для неинвазивной диагностики/мониторинга злокачественных новообразований. **Целью работы** является оценка диагностического потенциала экзосом, циркулирующих в крови больных раком молочной железы (РМЖ).

Плазму и элюаты с поверхности форменных элементов (ПФЭ) крови клинически здоровых женщин ($n = 10$) и больных РМЖ T1–2N0M0 ($n = 10$) получали, как описано ранее (Tamkovich, 2005). Препараты экзосом из плазмы и элюатов с ПФЭ получали путем последовательной ультрафильтрации и ультрацентрифугирования и характеризовали при помощи

трансмиссионной электронной микроскопии и иммуноокрашивания. Концентрацию белка в экзосомах определяли с помощью NanoOrange Protein Quantitation kit, микроРНК (let-7a, miR-103, miR-191, miR-195, miR-16) — методом количественной полимеразной цепной реакции наборами Invitrogen.

Полученные препараты микрочастиц содержат экзосомы с характерным размером 30–100 нм, экспрессирующие CD9, CD24 и CD63. Впервые установлено, что экзосомы циркулируют не только в плазме, но и будучи связанными с ПФЭ крови. Доля связанных с ПФЭ экзосом составляет 2/3 от их общего числа. Впервые обнаружено, что в крови больных РМЖ наиболее часто выявляются экзосомы диаметром 50–70 нм, в крови здоровых женщин — диаметром 30–50 нм. Показано, что наибольшей диагностической значимостью обладают микроРНК в составе экзосом, связанных с поверхностью эритроцитов: панель let-7a, miR-103 и miR-191 позволяет дискриминировать РМЖ с чувствительностью 71 % и специфичностью 89 %.

Роль нарушений экспрессии транскрипционного фактора HNF4α в прогрессии протоковой аденокарциномы поджелудочной железы человека

М.С. Чесноков¹, Д.А. Шавочкина¹, И.Ф. Кустова¹,
Н.Е. Кудашкин², Ю.И. Патютко², Н.Л. Лазаревич¹

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

²отделение опухолей печени и поджелудочной железы НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы (ПАКПЖ) отличается чрезвычайно высокой агрессивностью, быстрой прогрессией, ранним метастазированием и устойчивостью к современным методам

терапии. Для разработки новых диагностических и терапевтических подходов необходимы детальные исследования молекулярных механизмов, регулирующих развитие этого типа опухолей.

Транскрипционный фактор HNF4α является одним из важнейших регуляторов дифференцировки поджелудочной железы, печени, кишечника и ряда других органов. В клетках печени, кишечника и почки HNF4α играет роль опухолевого супрессора, однако его функции в клетках ПАКПЖ практически не исследованы. Описаны 2 независимо регулируемые группы изоформ HNF4α (HNF4αP1 и HNF4αP2), отличающиеся трансактивационными свойствами; в норме в клетках поджелудочной железы экспрессируются только изоформы группы HNF4αP2. Мы продемонстрировали, что подавление экспрессии HNF4αP2 в культуре клеток ПАКПЖ CAPAN-2 сопровождается их дедифференцировкой и усилением злокачественного потенциала, что выражается в повышении скорости пролиферации, колониеобразующего и миграционного потенциала.

Исследовав клинические образцы ткани поджелудочной железы 30 пациентов с ПАКПЖ, мы показали, что в 70 % случаев в них наблюдается снижение экспрессии HNF4αP2 по сравнению с прилегающей неопухолевой тканью. В 53 % случаев в ткани ПАКПЖ происходит активация экспрессии нехарактерной для поджелудочной железы группы изоформ HNF4αP1. Изменения экспрессии HNF4α в исследованных образцах коррелируют с изменениями экспрессии важнейших панкреаспецифических генов *PDX1*, *HNF1A*, *HNF1B*, *FOXA2*, *HNF6*.

Таким образом, нарушения экспрессии изоформ HNF4α являются частым событием в ткани ПАКПЖ и выражаются в подавлении экспрессии HNF4αP2 и активации HNF4αP1. Данные, полученные в экспериментах *in vitro* и при исследовании образцов ткани, свидетельствуют о том, что HNF4α является важным регулятором прогрессии ПАКПЖ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-02080.

Секция V

ГЕНОМИКА И ЭПИГЕНОМИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ: ОТ ЭКСПЕРИМЕНТА К ПРАКТИКЕ

Молекулярно-генетические особенности ангиомиолипомы почки

К.И. Аношкин^{1,2}, Е.Б. Кузнецова^{1,3},
К.М. Мосякова³, А.С. Танас^{1,2}, М.С. Чаплыгина¹,
Е.А. Алексеева¹, Е.В. Шпот³, Д.В. Залетаев¹⁻³,
А.З. Винаров³, В.В. Стрельников^{1,2}

¹ФГБНУ МГНЦ, Москва;

²ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

³ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России

Поражение почек при туберозном склерозе (ТС) является третьей по распространенности патологией после поражений нервной системы и кожи и затрагивает примерно 85 % пациентов. Наиболее частым повреждением почек при ТС является ангиомиолипома (АМЛ), которая присутствует примерно у 70 % пациентов с патологией почек.

Поскольку ТС является генетическим заболеванием, ассоциированным с мутациями в генах *TSC1* и *TSC2*, мутационное профилирование АМЛ до сих пор ограничивалось лишь этими 2 генами. Нами впервые проведен скрининг мутаций широкой панели генов, которые вовлечены в опухолеобразование, в крови и операционном материале больных с АМЛ методом высокопроизводительного параллельного секвенирования.

В опухолевых образцах обнаружены мутации в общей сложности в 30 генах из 409 исследованных. Выявлены мутации гена *TSC2* как герминативной, так и соматической природы. Наибольшее количество нуклеотидных замен в ДНК опухолей обнаружено в протоонкогене *ROS1*. Они представляют собой миссенс- и нонсенс-мутации и выявлены нами впервые, за исключением минорного аллеля редкого генетического полиморфизма rs34203286 (частота в популя-

ции 0,2 %). Более чем в 1 образце обнаружены генетические варианты генов *LAMP1* и *RAD50*, которые кодируют белки, участвующие в регуляции роста, метаболизма и жизнеспособности клеток.

Замечено, что все обследованные нами пациенты являются носителями полиморфизма (с.G1094A: p.R365H; частота в общей популяции не превышает 9 %) в гене системы цитохрома P450 *CYP2D6*. Белок CYP2D6 задействован в метаболизме примерно 25 % всех лекарственных средств, метаболизируемых цитохромами. Это наблюдение заставляет обратить внимание на роль соответствующего белка в этиопатогенезе заболевания, а также учитывать генетический статус CYP2D6 при назначении лекарственной терапии.

Дальнейший поиск и характеристика мутаций представляются перспективным направлением для разработки эффективной терапии АМЛ, в том числе таргетной, а также будут способствовать профилактике заболевания за счет возможности его раннего обнаружения.

Функциональная геномика в разработке биомаркеров светлоклеточного почечно-клеточного рака при анализе потенциальных генов-мишеней таргетной терапии

Н.В. Апанович¹, М.В. Петерс², А.С. Маркова²,
П.В. Апанович, Б.Ш. Камолов², В.Б. Матвеев²,
А.В. Карпунин¹

¹ФГБНУ МГНЦ, Москва;

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

Изучена экспрессия потенциальных генов-мишеней таргетной терапии почечно-клеточного рака (ПКР)

(*VEGFR1*, *VEGFR2*, *VEGFA*, *PDGFR α* , *PDGFR β* , *EGFR*, *PTEN*, *PI3K*, *AKT*, *mTOR*, *RAF1*, *STAT3*, *RPS6*) при различных характеристиках выживаемости больных. С наибольшей частотой повышали экспрессию гены сосудистого эндотелиального фактора роста (*VEGFR1*, *VEGFR2* и *VEGFA*), из них чаще всего — ген *VEGFA* (в 53 % образцов). Хотя бы один из генов, стимулирующих ангиогенез, имел повышенную экспрессию в 70 % образцов.

Около трети больных за время наблюдения умерли, причем основное число смертей произошло в течение 3,5 года. Среди отдельных частот в профиле экспрессии генов умерших в течение указанного периода и проживших дольше этого срока обнаружено значимое различие для экспрессии гена *VEGFA* ($p = 0,001$), отношение шансов 21,86. Применение регрессионной модели пропорциональных рисков Кокса также продемонстрировало значимую связь выживаемости больных ПКР с экспрессией гена *VEGFA*. Относительный риск ранней смерти, связанный с уровнем экспрессии гена *VEGFA*, оказался значимо повышенным: отношение рисков 3,09; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,60–5,95; $p = 0,0008$. Чувствительность такого маркера 3,5-летней выживаемости составила 90 % (95 % ДИ 55,50–99,75). С высокой вероятностью, составляющей 94,44 %, потенциальный маркер может предсказывать выживаемость более 3,5 года (95 % ДИ 72,71–99,86).

Проанализированы характеристики координации действия генов на уровне транскрипции. Прежде всего, обращает на себя внимание более высокая степень координации экспрессии генов в опухолях рано умерших больных. В частности, наблюдается координированная экспрессия генов рецепторов *VEGFR1*, *VEGFR2* и *PDGFR β* , которая отсутствует у долгоживущих пациентов. Что касается гена лиганда *VEGFA*, уровень экспрессии которого ассоциирован с продолжительностью жизни, то в опухолях рано умерших больных этот ген экспрессируется координированно с геном рецептора *PDGFR β* , в то время как среди долгоживущих — с *VEGFR1*. Следовательно, в опухолях больных ПКР имеются существенные различия в координации действия генов на уровне транскрипции.

Поиск ассоциации полиморфных локусов генов *CCR5*, *CXCL12*, *CCL2* с риском развития рака мочевого пузыря

Л.З. Ахмадишина¹, А.А. Измайлов², Р.В. Плотницкий³,
С.М. Измайлова², Т.В. Викторова^{1,2}

¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук;

²ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

³ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы», Уфа

Хемокины не только индуцируют хемотаксис и воспалительные и иммунные реакции, но и вносят свой вклад в прогрессию опухоли: так, хемокины, секретируемые солидной опухолью либо метастатическими очагами, могут вести себя подобно ростовым факторам и усиливать распространение метастазов и ангиогенез (Aldinucci, Colombatti, 2014). Предполагается, что хемокиновый рецептор *CCR5* принимает участие в опухолевой прогрессии путем контроля противоопухолевого иммунного ответа (de Oliveira et al., 2014). Известен полиморфизм гена *CCR5*, связанный с мутацией в результате делеции 32 пар нуклеотидов (п.н.) в кодирующей области гена, приводящей к сдвигу рамки считывания и синтезу укороченного и функционально неактивного варианта рецептора. В нашем исследовании показана ассоциация риска развития рака мочевого пузыря (РМП) с сочетанием генотипов ID + DD (модель доминирования; отношение шансов (ОШ) 1,58; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,01–2,47; $p = 0,046$). Анализ выборок с учетом клинического течения выявил ассоциацию с неинвазивным РМП в доминантной модели (ОШ 1,97; 95 % ДИ 1,1–3,37; $p = 0,015$). Имеются литературные данные о том, что при раке толстой кишки экспрессия SDF-1 (*CXCL12*) ассоциирована с метастазированием опухоли и неблагоприятным прогнозом течения болезни (Федянин и соавт., 2013). В нашем исследовании локуса rs1801157 гена *CXCL12* было показано, что присутствие генотипа AA является протективным фактором при развитии РМП (рецессивная модель AA против AG + GG; ОШ 0,46; 95 % ДИ 0,22–0,97; $p = 0,035$). Отдельный анализ неинвазивного и инвазивного РМП выявил протективную ассоциацию с дозой аллеля A в аддитивной модели при неинвазивной форме опухоли (ОШ 0,60; 95 % ДИ 0,41–0,89; $p = 0,0092$). Имеются данные о том, что *CCL2* обладает ангиогенным эффектом в опухоли (Яшин, Медяник, 2014). Анализ полиморфизма –2518A>G гена *CCL2* в исследуемых выборках показал, что генотип GG встречался чаще в выборке практически здоровых индивидов — 20,9 % по сравнению с группой больных РМП — 8,5 %, различия достигли статистической значимости в рецессивной модели GG против

AG + AA (ОШ 0,35; 95 % ДИ 0,19–0,66; $p = 0,0005$). Причем ассоциация с генотипом GG в рецессивной модели сохранилась как для инвазивного (ОШ 0,42; 95 % ДИ 0,20–0,91; $p = 0,019$), так и для неинвазивного РМП (ОШ 0,30; 95 % ДИ 0,12–0,74; $p = 0,0033$). Таким образом, показана значимость изученных полиморфных локусов rs333 гена *CCR* и rs1801157 гена *CXCL12* в развитии мышечно-неинвазивного РМП. Тогда как локус rs1024611 гена *CCL2* ассоциировал и с инвазивной, и с неинвазивной формами РМП.

Динамика иммунофенотипа от первичной опухоли к локальному рецидиву у больных раком молочной железы

И.Г. Гатауллин, М.О. Дружков, О.Б. Дружков

ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Минздрава России;

ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Татарстан, Казань

В связи с увеличением числа органосохраняющих операций при раке молочной железы (РМЖ) актуальной является не только проблема выбора объема оперативного вмешательства по поводу местных рецидивов, но и дальнейшей лучевой и лекарственной терапии. **Цель исследования** — сравнительный анализ фенотипов первичной опухоли и локального рецидива РМЖ.

Материалы и методы. Проанализированы истории болезни 5808 пациентов, получавших комбинированное лечение по поводу РМЖ в РКОД МЗ РТ за период с 2000 по 2011 г., из них 4891 — после радикальной мастэктомии и 917 — после органосохраняющей операции на молочной железе. Локальные рецидивы выявлены у 108 больных, что составляет 1,85 % от их общего количества. После радикальной мастэктомии локальный рецидив возник в 1,2 % случаев, после органосохраняющей операции — в 4,9 %. Все удаленные локальные рецидивы подвергались гистологическому и иммуногистохимическому исследованию с использованием моноклональных антител к эстрогеновым и прогестероновым рецепторам, белку онкогена *HER-2/neu*. Полученные результаты сравнивали с соответствующими показателями первичных опухолей у данных пациентов.

Результаты. При сравнении основных иммуногистохимических показателей первичной опухоли и локального рецидива фенотип отличался в 57,69 % случаев. Изменениям не подвергались только опухоли HER-2-типа. Изменение от гормононегативных к гормонопозитивным опухолям отмечено в 46,7 % наблюдений, а от гормонопозитивных к гормононегативным — в 40 % случаев. У пациентов с РМЖ HER-2-типа фенотип рецидивной опухоли не менялся. При возникновении локального рецидива число больных

с опухолями HER-2-типа увеличилось с 11 до 23 %. У пациентов с опухолями люминального А-типа фенотип рецидивной опухоли менялся в 13,3 % случаев, люминального В-типа — в 60 %. Базальный тип первичной опухоли изменился при рецидиве в 33,3 % случаев.

Заключение. Таким образом, обосновано положение об изменении фенотипа РМЖ при возникновении локального рецидива. В связи с изменением фенотипа рецидивной опухоли должны изменяться и принципы лекарственного лечения локального рецидива.

Иммуногистохимический полиморфизм первичного и метастатического рака молочной железы

И.Г. Гатауллин, А.И. Хасанова

ГБОУ ДПО КазГМА Минздрава России;

ГАУЗ РКОД Минздрава Республики Татарстан, Казань

Цель исследования — сравнительный анализ фенотипов первичной и вторичной (метастатической) опухолей молочной железы.

Материалы и методы. Иммуногистохимические исследования проводили с помощью набора моноклональных антител к эстрогеновым и прогестероновым рецепторам, белку онкогена *HER-2/neu*. Фенотипирование первичной опухоли выполнено у 400 больных раком молочной железы на основании определения стероидных рецепторов эстрогенов и прогестерона, а также экспрессии гена *HER-2/neu*.

Результаты. Реакция на рецепторы эстрогенов оценивалась как позитивная (1 балл и более) и негативная (0 баллов). У 20 больных с наличием отдаленных метастазов проведено фенотипирование как первичной, так и вторичной (метастатической) опухолей на гормональные рецепторы и статус *HER-2/neu*. Отдаленные метастазы: у 2 пациентов — в головной мозг, у 10 — в легкие, у 7 — в печень и у 1 — кожная диссеминация. Все метастазы морфологически и фенотипически верифицированы. Только в 12 % случаев отмечалось полное совпадение фенотипа первичной и метастатической опухолей. В 18 % случаев фенотип первичной опухоли не совпадал с вторичной по экспрессии гена *HER-2/neu*. В 19,4 % отмечалось несоответствие по экспрессии эстрогеновых рецепторов и в 31 % — по рецепторам прогестерона.

Заключение. Учитывая выявленный фенотипический полиморфизм первичной и вторичной опухолей молочной железы, метастатический рак молочной железы целесообразно лечить после оценки фенотипа метастатической опухоли.

Клиническо-морфологическая оценка мутации гена *KRAS* у пациентов с колоректальным раком

И.Г. Гатауллин, Р.К. Шакиров,
М.Г. Гордеев, Б.И. Гатауллин

ГБОУ ДПО КазГМА Минздрава России;
ГАОУ РКОД Минздрава Республики Татарстан, Казань

Одной из важнейших соматических мутаций, обнаруженных в опухолях толстой кишки, является мутация в гене *KRAS*, выявляемая с частотой 30–50 %. Мутация в этом гене может стать новым фактором прогноза в рамках даже одной и той же стадии заболевания.

Цель исследования — выявление частоты мутации в гене *KRAS* у больных колоректальным раком в Республике Татарстан и оценка влияния мутации на течение и прогноз заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены 120 больных колоректальным раком, получивших комбинированное лечение в ГАОУ РКОД МЗ РТ. Пациентам был проведен генетический анализ на наличие мутации в гене *KRAS* на материале, полученном в результате оперативного вмешательства.

Результаты. У 35 из 120 пациентов выявлена мутация в гене *KRAS*, у 85 имелся «дикий» тип гена *KRAS* (частота мутаций составила 26,7 %). При этом 25 мутаций обнаружено в 12-м и 13-м кодонах, 7 мутаций в 61-м кодоне и 3 — в 146-м кодоне. Результаты исследования показали, что у русского населения мутантный тип гена *KRAS* выявляется чаще (38,9 %), чем у татарского населения (21,2 %; $p = 0,045$). Мутация в гене *KRAS* чаще встречалась у женщин, чем у мужчин (37,7 и 20,3 % соответственно; $p = 0,045$). Опухоли толстой кишки с мутантным геном *KRAS* более склонны к лимфогенному метастазированию (54,2 %), чем опухоли с «диким» типом (45,8 %; $p = 0,004$), что косвенно свидетельствует о более агрессивном течении опухолевого процесса при мутантном типе гена. Больные с мутантным типом гена чаще имеют отдаленные синхронные метастазы (63,6 %), чем больные с «диким» типом (36,4 %; $p = 0,0001$). Одногодичная выживаемость пациентов с «диким» типом гена *KRAS* составила 96,5 %, с мутантным типом гена — 88,6 % ($p = 0,0012$).

Заключение. Таким образом, опухоли с мутантным типом гена *KRAS* обладают агрессивным течением и высоким потенциалом к метастазированию. Мутация в данном гене является независимым значимым прогностическим признаком.

Роль микроРНК в развитии почечно-клеточного рака

И.Р. Гилязова¹, Е.А. Климентова¹, А.А. Измаилов²,
И.М. Султанов², В.Н. Павлов², Э.К. Хуснутдинова¹

¹Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН;
²ФГБОУ ВПО «Башкирский государственный университет», Уфа;

В целях анализа роли микроРНК в развитии почечно-клеточного рака (ПКР) проведена оценка экспрессии 758 микроРНК в 16 парных образцах опухолей ПКР, а также исследование 30 полиморфных вариантов в 13 генах биогенеза микроРНК у 231 пациента с ПКР (106 русских, 86 татар, 39 башкир) и 1042 здоровых лиц (443 русских, 457 татар, 142 башкир) с использованием TaqMan-технологии и системы OpenArray QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR. Для анализа данных по экспрессии микроРНК использовали ExpressionSuite Software. Применяли глобальную нормализацию данных. Ассоциацию однонуклеотидных полиморфизмов с болезнями анализировали при помощи пакета программ PLINK 1.07. Поправку на множественное тестирование вводили, используя метод FDR. В качестве статистически значимых принимали результаты при $FDR < 0,05$. Для метаанализа результатов по 3 выборкам — русских, татар и башкир — использовали программу WinPepi v. 11.32.

В результате анализа экспрессии микроРНК в опухолевой ткани почки обнаружена повышенная экспрессия miR-642 (fold change (FC) 4,177; $p = 0,021$) и miR-210 (FC 6,529; $p = 0,033$). miR-210 является наиболее часто активируемой микроРНК в нескольких раковых клеточных линиях в условиях гипоксии (Ho et al., 2010; McCormick et al., 2010). Она активируется, предположительно, из-за гипоксического характера опухолей, поскольку нарушенный ангиогенез не способен поддерживать адекватное кровоснабжение при развитии заболевания (Kulshreshtha et al., 2007). Повышенная экспрессия miR-642 при раке почки ранее не описана. В результате анализа генов биогенеза микроРНК наиболее высокий уровень ассоциации с развитием светлоклеточного рака почки у русских и татар выявлен по локусу rs1057035 в гене *DICER1* ($p = 3,026 \times 10^{-5}$ и $p = 0,03$ соответственно). Метаанализ результатов исследования полиморфных локусов генов биогенеза микроРНК у русских, татар и башкир показал значимые различия между выборками больных ПКР и здоровых по полиморфному локусу rs1057035 гена *DICER1* ($P^2 = 0,0$ %; $p = 1,643 \times 10^{-9}$), показатель отношения шансов для rs1057035*С составляет 2,13 (95 % доверительный интервал (ДИ) 1,55–2,93), а для rs2292832*Т — 0,47 (95 % ДИ 0,34–0,65). Результаты анализа экспрессии микроРНК и полиморфных вариантов некоторых генов биогенеза микроРНК свидетельствуют о необходимости изучения микроРНК в развитии злокачественных новообразований почки.

Клональная эволюция опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии и гематогенное метастазирование

М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, Н.В. Литвяков

ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский
Томский государственный университет»

Актуальность. Опухолевые клоны (ОК) могут характеризоваться различными генетическими нарушениями, образованными в процессе клональной эволюции. Дополнительные изменения в клональное разнообразие могут быть внесены при использовании химиотерапевтических средств, которые обладают мутагенным эффектом и могут приводить к возникновению генетических нарушений и новых ОК.

Целью данного исследования являлось изучение клональной эволюции опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии (НХТ).

Материалы и методы. Исследовано 26 парных образцов биопсийного материала до лечения и операционного материала после проведения НХТ для каждого пациента. ДНК из исследуемого материала выделена при помощи набора QIAamp DNA mini Kit. Для изучения клональной эволюции мутантных ОК использовали микроматрицу CytoScan HD Array (Affymetrix, USA). Проводили сравнение количества цитобэндов с CNA (copy number aberration — амплификациями и делециями) у каждого больного до лечения и после НХТ, анализировали число мутантных клонов в каждой опухоли и их изменение в процессе НХТ.

Результаты. Установлено, что в процессе НХТ у 50 % (13 из 26) больных уменьшалось количество мутантных клонов (вплоть до полной элиминации — 1 случай), в 19 % случаев химиотерапия не оказывала никакого влияния на количество мутантных ОК и частоту хромосомных аномалий. У 31 % (8 из 26) больных наблюдались случаи появления в процессе НХТ новых мутантных клонов, при этом у всех 8 пациентов появлялись клоны, содержащие новые делеции различных участков генома, и у 6 пациентов отмечалось появление клонов, содержащих амплификации. У 83 % (5 из 6) этих пациентов наблюдались отдаленные метастазы, у всех остальных больных с элиминацией ОК, отсутствием действия НХТ на клоны или с появлением делеционных клонов не было гематогенных метастазов в 5-летний период наблюдения (метод Каплана—Майера; $p = 0,00001$; log-rank test).

Заключение. Установлено, что селекция или новообразование ОК может происходить в результате воздействия на опухоль НХТ. Метастазирование опухоли молочной железы связано с появлением новых ОК

с амплификациями. Появление новых амплификационных клонов в процессе НХТ является неблагоприятным прогностическим фактором РМЖ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-03091А и выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности НИТГУ.

Поиск химерных генов в опухолевых клетках при лейкозах у детей с помощью высокопроизводительного секвенирования

А.Ю. Иконникова¹, Г.С. Краснов¹, А.В. Снежкина¹,
Ю.И. Амму², А.В. Кудрявцева¹, Т.В. Наседкина^{1,2}

¹ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

²ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России,
Москва

Для лейкозов очень характерны структурные перестройки генома с образованием экспрессирующихся химерных генов, идентификация которых играет важную роль для уточнения диагноза, определения прогноза течения заболевания, выбора терапии и дальнейшего мониторинга минимальной остаточной болезни. Современные методы молекулярной диагностики, как правило, направлены на определение уже известных химерных генов. Для поиска новых химерных генов в опухолевых клетках больных лейкозом эффективным подходом является высокопроизводительное секвенирование транскриптома.

Проведено исследование транскриптомов клеток костного мозга 6 пациентов с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и 1 больного с миелодиспластическим синдромом (МДС). Образцы подготовлены в рамках исследования «Генетическая диагностика острого миелобластного лейкоза у детей в России», проводимого ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Высокопроизводительное секвенирование транскриптомов осуществляли по технологии SOLEXA компании Illumina. В образцах пациентов были выявлены редкие варианты химерных транскриптов, в том числе в 1 случае ОМЛ М4 выявлены 2 химерных транскрипта *ETV6-MECOM* t(3;12) и *MN1-ETV6* t(12;22). В другом случае у пациента с ОМЛ обнаружен химерный транскрипт *MLL-SEPT6* с 2 вариантами слияния с участием 10-го и 11-го экзонов гена *MLL* и 2-го экзона гена *SEPT6*. Для каждого химерного транскрипта были синтезированы специфичные праймеры для обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции, наработаны продукты и проведена верификация результатов секвенированием по Сэнгеру.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы Минобрнауки России (соглашение № 14.604.21.0117, RFMEFI60414X0117).

Роль полиморфизма p.E429A (rs1801131) гена *MTNFR* в увеличении риска развития спорадического рака молочной железы

В.Н. Кипень

Лаборатория молекулярных маркеров экологического воздействия УО «Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

Введение. Метаболизм фолатов — важное звено первичного метаболизма клетки. Он является поставщиком одноуглеродных фрагментов для таких жизненно важных клеточных процессов, как регенерация метионина, биосинтез пуриновых нуклеотидов и превращение уридинмонофосфата в тимидилат, метилирование ДНК и РНК и др. Нарушения метаболизма фолатов влияют на стабильность ДНК — данные процессы лежат в основе канцерогенеза. Нами была предпринята попытка оценить роль полиморфизма p.E429A (rs1801131) гена *MTNFR* в увеличении риска развития рака молочной железы (РМЖ) среди пациентов Республики Беларусь.

Материалы и методы. В исследование были включены 169 больных со спорадической формой РМЖ. Критериями отбора пациентов для исследования были: 1) отсутствие основных патогенетически значимых мутаций в генах *BRCA1* (с.5238insC, с.185delAG, с.300T>G, с.4153delA), *BRCA2* (с.6174delT), *TP53* (p.R273C, p.248W, p.R175H, p.R282W, p.R337H), *CHEK2* (с.1100delC, с.IVS2+1G>A) и *NBS1* (с.657del5); 2) отсутствие в личном анамнезе случаев билатеральных (как синхронных, так и метасинхронных) форм РМЖ; 3) отсутствие ранней манифестации. Медиана возраста на момент возникновения опухоли составила 45 лет (25-я перцентиль — 40,2 года; 75-я перцентиль — 48,2 года; возрастной интервал 29,1—54,1 года). В группу сравнения вошли 185 условно здоровых пациентов без онкологической патологии в анамнезе на момент забора крови. Группа сравнения соответствовала по возрасту и этническому составу выборке больных РМЖ. Все участники подписали информированное согласие на проведение молекулярно-генетических исследований. Образцы ДНК выделяли с помощью метода водно-метанольной экстракции по протоколу Johanson с модификациями. Анализ полиморфизма проводили с помощью ПДРФ-метода (рестриктаза MboII, NEB, USA). При сравнении результатов анализа генетического полиморфизма в группах использовали критерий Фишера или критерий χ^2 . Анализ ассоциации генотипов с риском развития заболевания проводили с использованием базового аллельного теста и расчета показателя отношения шансов (ОШ) для минорной аллели каждого анализируемого локуса (с расчетом 95 % доверительного интервала (ДИ)).

Результаты. Для однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) p.E429A найдены статистически значимые различия в исследуемых группах ($p = 0,04$): генотип AA чаще встречается среди пациентов с РМЖ, чем в группе сравнения, — 49,7 % (84 из 169) и 36,8 % (68 из 185) соответственно. Основываясь на результатах сравнения частот распространенности генотипов по ОНП p.429A в группах, для генотипов/аллелей рассчитывали значения ОШ. К протективным генотипам (снижающим риск развития заболевания) относятся CC/AC (ОШ 0,59; 95 % ДИ 0,38—0,90; $p = 0,01$). Патогенетическим генотипом (увеличивающим риск развития заболевания) является AA (ОШ 1,70; 95 % ДИ 1,11—2,60; $p = 0,01$).

Закключение. Полиморфизм p.E429A (rs1801131) гена *MTNFR* может быть отнесен к ОНП, модифицирующим риск развития спорадических форм РМЖ.

Анализ мутаций и полиморфизмов расширенной панели генов при раке желудка

К.И. Кириллова^{1,2}, И.И. Быков³, А.С. Танас^{1,2},
М.В. Немцова^{1,4}, В.В. Стрельников^{1,2}

¹ФГБНУ МГНЦ, Москва;

²ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва;

³ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России;

⁴ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России, Москва

В структуре онкологической заболеваемости в России рак желудка (РЖ) занимает 2-е место после рака легкого у мужчин и рака молочной железы у женщин. **Цель работы** — охарактеризовать спектр мутаций и полиморфизмов генов, вовлеченных в канцерогенез, при РЖ.

Материалы и методы. Материал опухоли получен от 50 больных РЖ в возрасте 35—59 лет: 28 образцов с диффузным и 22 образца с интестинальным типом РЖ. Поиск мутаций и полиморфизмов в 51 гене, вовлеченном в канцерогенез, проводили высокопроизводительным параллельным секвенированием ДНК (IonTorrent PGM).

Результаты. В исследуемой выборке мутации и полиморфизмы обнаружены в 22 генах. Соматические мутации в гене *TP53* (p.R116W, p.E298X, p.R26H, p.R248Q, p.V41L, p.G113D, p.A86fs, p.H179R, p.I100T, p.R273H) выявлены у 20 % пациентов (14 % — в образцах с интестинальным и 6 % — с диффузным типом РЖ); в гене *CDH1* (с.-71C>G, p.K182N, p.T303P, p.R38G, с.1320+2T>G) — у 10 % (8 % — с диффузным и 2 % — с интестинальным типом РЖ); в гене *PIK3CA* (p.K111E, p.E545K, p.H1047R) — у 6 % (4 % — с интестинальным и 2 % — с диффузным типом РЖ); в гене *STK11* (p.289K, с.-311C>T, с.-127T>C, p.S283fs) — у 8 %

(4 % — с интестинальным и 4 % — с диффузным типом РЖ); в гене *SMAD* мутации (p.V158A, p.R445X) обнаружены у 4 % пациентов с диффузным типом РЖ. В других генах, вовлеченных в канцерогенез, мутации выявлялись в единичных случаях: *ATM* (p.S1691R), *CDKN2A* (p.R103W), *EGFR* (p.V292M), *FBXW7* (p.R387C), *FGFR3* (p.F348L), *KRAS* (p.G12D), *MET* (p.N375S), *NOTCH* (с.5019-50G>A), *PTEN* (p.L265fs), *RBI* (p.H686N) и *SMO* (p.W206X). Частые полиморфизмы обнаружены в генах: *KDR* (p.Q472H) — у 52 %, *KIT* (p.M541L) — у 10 %, *KIT* (p.M373L) — у 6 % и *MET* (p.S178S) — у 6 % пациентов.

Известно, что к развитию наследственного диффузного РЖ приводят врожденные мутации в гене *CDH1*. Нами выявлены новые мутации в *CDH1* (с.-71C>G, p.K182N, p.T303P, p.S838G, с. 1320+2T>G). Кроме того, у 3 пациентов обнаружены врожденные мутации в генах, вовлеченных в канцерогенез: *MET* (p.N375S), *RBI* (p.H686N) и *EGFR* (p.V292M).

Заключение. Выявление у лиц без онкологической патологии мутаций и полиморфизмов в генах, ассоциированных с канцерогенезом, может переводить этих пациентов в группу повышенного риска развития заболевания. Наша работа поможет усовершенствовать методы диагностики, что, в свою очередь, послужит профилактикой развития РЖ.

Минимальная остаточная болезнь у детей с лимфомой/лейкозом Беркитта как фактор прогноза развития рецидива

В.А. Лавриненко, А.С. Федорова

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии»
Минздрава Республики Беларусь, Минск

Введение. При лимфоме/лейкозе Беркитта приблизительно в 75 % случаев выявляется транслокация t(8;14)(q24;q32) и специфическая перестройка *MYC-IgH*, которая может служить мишенью для оценки минимальной остаточной болезни (МОБ). В некоторых исследованиях показано неблагоприятное прогностическое значение наличия МОБ при лимфоме/лейкозе Беркитта (Mussolin L., 2003; 2011). **Цель работы** — оценить прогностическое значение МОБ у детей с лимфомой/лейкозом Беркитта.

Материалы и методы. Обследованы 12 пациентов: 7 с лимфомой Беркитта высокого риска (4 — с III стадией, 3 — с IV стадией) и 5 с лейкозом Беркитта. Все больные получили лечение по протоколу В-НХЛ 2004/2010М, медиана наблюдения для выживших пациентов — 3,3 (1,3–6,1) года. Наличие перестройки *MYC-IgH* определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) длинных фрагментов, участок

слияния *MYC-IgH* секвенировали и подбирали праймеры для каждого больного. Уровень МОБ определяли количественно методом ПЦР в реальном времени с использованием пациент-специфических праймеров (ПС-ПЦР) в костном мозге (КМ) и/или периферической крови (ПК) до начала лечения, после профазы и перед последующими блоками химиотерапии (чувствительность метода 10^{-5} – 10^{-6}).

Результаты. У всех 5 пациентов с лейкозом Беркитта без морфологического поражения КМ (2 — с III стадией, 3 — с IV стадией) до лечения выявлялось наличие минимальной диссеминированной болезни в КМ и/или ПК с помощью ПС-ПЦР. Наличие МОБ после профазы отмечено у 6 (66,6 %) из 9 обследованных пациентов, перед 2-м блоком химиотерапии — у 2 (18,2 %) из 11. Таким образом, 10 (83 %) пациентов стали МОБ-негативными после 1-го блока химиотерапии. Двое (17 %) пациентов (1 — с лимфомой Беркитта III стадии и 1 — с лейкозом Беркитта) оставались МОБ-позитивными на протяжении всего лечения, у обоих, и только у них, в дальнейшем развился рецидив ($p = 0,015$).

Выводы. Наличие МОБ перед 2-м блоком химиотерапии — неблагоприятный фактор в плане высокого риска развития рецидива у детей с лейкозом/лимфомой Беркитта. ПС-ПЦР является высокочувствительным методом для количественного определения МОБ.

Полиморфизмы регуляторной области гена *TNF* и биологические подтипы рака молочной железы

Т.Ф. Маливанова, Е.В. Алферова, Н.Н. Мазуренко

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

Введение. Фактор некроза опухолей (tumor necrosis factor, TNF) — это центральный медиатор иммунного ответа, способный также индуцировать (в зависимости от физиологического контекста) как апоптоз, так и пролиферацию опухолевых клеток. Ген *TNF* имеет ряд однонуклеотидных замен, из которых наиболее известны полиморфизмы –238(G/A)TNF и –308(G/A)TNF, ассоциированные соответственно со снижением и повышением продукции цитокина в экспериментах *in vitro* и в клинических исследованиях. Ранее нами выявлена зависимость общей выживаемости больных раком молочной железы (РМЖ) с положительными по рецепторам эстрогенов опухолями от этих полиморфизмов. В связи с современной концепцией гетерогенности РМЖ представляется актуальным изучение влияния полиморфизмов гена *TNF* на биологические подтипы РМЖ.

Материалы и методы. Исследовали геномную ДНК 165 первичных больных РМЖ и 82 больных РМЖ, получавших химиотерапию. Для определения полимор-

физмов —308(G/A)TNF и —238(G/A)TNF использовали методы сайт-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР-ПДРФ. В статистическом анализе использовали критерии Фишера, χ^2 и log-rank test.

Результаты. Для первичных больных РМЖ впервые выявлена ассоциация аллеля —238(A)TNF с индексом пролиферации Ki-67, причем при HER-2-отрицательных опухолях низкий индекс пролиферации имели все пациентки с аллелем —238(A)TNF и только 45,6 % — с другими генотипами ($p < 0,002$). При анализе группы больных РМЖ, получавших химиотерапию, обнаружено, что больные с первично-метастатическим РМЖ достоверно чаще имеют аллели —238(A)TNF и —308(A)TNF, чем пациентки без отдаленных метастазов ($p = 0,03$). Сравнительное изучение биологических подтипов РМЖ показало, что в группе больных с люминальным В-подтипом РМЖ без отдаленных метастазов меньшую медиану безрецидивной выживаемости имели носители аллелей —238(A)TNF и —308(A)TNF (18,5 и 27 мес соответственно) по сравнению с распространенным GG-генотипом (76 мес; $p = 0,02$).

Заключение. В совокупности с нашими ранее полученными данными результаты настоящего исследования свидетельствуют о способности полиморфизмов гена *TNF* оказывать свое действие в рамках определенных биологических подтипов РМЖ.

Эпигенетические маркеры для жидкой биопсии: достоинства, недостатки, рациональный дизайн диагностических систем

Е.С. Морозкин^{1,2}, Е.Ю. Рыкова¹, А.А. Бондарь¹, Т.Э. Скворцова¹, И.А. Запороженко¹, А.М. Курильщикова¹, О.Ю. Аникеева², Н.П. Краснова², Е.С. Половников², О.А. Пашковская², Е.А. Покушалов², А.А. Пономарева³, Н.В. Чердынцева³, П.П. Лактионов^{1,2}

¹ИХБФМ СО РАН, Новосибирск;

²ФГБУ «Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России;

³ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»

Одним из способов диагностики наличия/состояния опухолевого процесса является анализ онкоассоциированных циркулирующих нуклеиновых кислот (циркННК) крови — его сейчас принято называть жидкой биопсией. Однако выявление опухоль-специфических нуклеиновых кислот осложняется их низким содержанием в крови, фрагментацией циркННК и ДНК, наличием значительного количества циркННК из нормальных клеток, тканеспецифическими и возрастными особенностями нуклеиновых кислот нормальных тканей. При этом эпигенетические маркеры опухолевых клеток, такие как аберрантно-метилованные ДНК (амДНК) и микроРНК, циркулирующие в крови,

обладают рядом очевидных преимуществ. Эти маркеры часто встречаются в клетках опухолей, появляются в клетках и в крови уже на ранних стадиях опухолевого процесса, стабильны в циркулирующей крови; проработана эффективная аналитическая процедура их определения, в том числе и в избытке молекул, генерируемых нормальными тканями. Несмотря на вышеперечисленные преимущества эпигенетических маркеров, на европейском рынке представлена только 1 диагностическая система компании Epigenomics AG, направленная на выявление колоректального рака по циркулирующей амДНК крови. Для разработки диагностических систем мы использовали 2 подхода: 1) иррациональный — основанный на переборе известных маркеров, разработке требований включения/исключения образцов и аналитических систем с абсолютной чувствительностью и специфичностью и 2) рациональный, основанный на локус-специфическом секвенировании циркулирующей ДНК крови здоровых и больных на платформе MySeq или анализе потенциальных маркеров — 176 микроРНК на платформе Exiqon с последующим биоинформационным анализом данных, а также на разработке требований к аналитической и диагностической платформам.

С использованием иррационального подхода нами разработана диагностическая система для рака легкого, основанная на анализе циркулирующих ДНК крови и имеющая специфичность и чувствительность более 85 %. Методом массового параллельного секвенирования найдены потенциальные маркерные участки, построены биоинформационные модели и варианты аналитических систем, позволяющие со специфичностью более 95 % и чувствительностью более 88 % диагностировать рак предстательной железы. Анализ данных профилирования циркулирующих микроРНК выявил маркеры, позволяющие детектировать рак легкого с чувствительностью более 85 % и абсолютной специфичностью. Все системы находятся на стадии верификации.

Варианты генетического полиморфизма, влияющие на риск развития рака легкого

А.Ф. Мукерия¹, В.А. Драудин-Крыленко¹, М.В. Гаас², Д.Г. Заридзе¹

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

²ГБУЗ «Онкологический клинический диспансер № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы»

Полногеномный анализ случаев рака легкого (РЛ) выявил локусы повышенного риска на длинном плече хромосомы 15 (15q25) и коротком плече хромосомы 5 (5p15). Связь с риском была наиболее выражена для 2 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) —

rs1051730 и rs8034191. Риск развития РЛ наиболее высок у лиц, гомозиготных (С/С) по rs8034191. На идентифицированном участке хромосомы 15q25 расположены несколько генов, а именно гены ацетилхолиновых рецепторов никотина (*CHRNA2–4*), которые взаимодействуют с никотином и другими токсинами, содержащимися в табачном дыме. Вторым участком (5p15) содержит два ОНП высокого риска. У лиц, гетерозиготных и гомозиготных по этим ОНП, повышен риск развития РЛ. Однако величины отношения рисков ниже, чем для ОНП, расположенных на длинном плече хромосомы 15. Локус 5p15 содержит ген *hTERT*, который регулирует образование теломеразы и поддерживает сохранность теломера. Полученные результаты могут быть использованы для разработки маркеров для ранней диагностики и профилактики РЛ. В результате последующего полногеномного метаанализа, проведенного для изучения новых возможных генетических изменений, влияющих на риск РЛ, получены еще более убедительные подтверждения роли ранее уже идентифицированных локусов на хромосомах 5p15, 6p21 и 15q25 в этиологии РЛ. Более того, продемонстрированы специфические эффекты в зависимости от гистологического типа опухоли для локусов на хромосомах 5p15, 6p21 и 12p13, но не для 15q25. Был обнаружен неизвестный ранее локус на хромосоме 9p21, влияющий на риск плоскоклеточного рака. Полученные результаты еще раз подтверждают существование наследственной генетической предрасположенности к РЛ, а также различий в процессе легочного канцерогенеза в зависимости от гистологического типа опухоли.

Влияние последовательности ДНК на способность узкобороздочных лигандов ингибировать активность белка PARP-1 *in vitro*

Д.С. Набережнов¹, В.Ю. Глазунов^{1,2},
Е.А. Лесовая^{1,3}, А.В. Шубин^{1,4}, Г.А. Белицкий¹,
М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов¹

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

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»;

³ГБОУ ВПО «РязГМУ им. акад. И.П. Павлова»

Минздрава России;

⁴ФГБУН «Институт молекулярной генетики»
Российской академии наук, Москва

Актуальность. ДНК-связывающиеся соединения обладают широким спектром биологического действия. Считается, что их свойства в значительной мере определяются типом взаимодействия с ДНК и аффинностью к определенным структурным детерминантам, формируемым биополимером. В настоящее время большой интерес вызывают так называемые узкобороздочные лиганды (УБЛ), представляющие довольно

большой класс агентов различной химической природы, для которых общим свойством является способность формировать комплексы с ДНК по малой бороздке за счет водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий без образования ковалентной связи.

Применительно к онкологической практике изучение УБЛ представляет как теоретический, так и практический интерес в связи с широким спектром их биологического действия, имеющего как про-, так и антиканцерогенную направленность.

Задачи. 1) Провести сравнительный анализ взаимодействия ряда УБЛ с ДНК, используя футпринтинг ДНКазой I; 2) провести сравнительный анализ способности ряда «классических» и новосинтезированных УБЛ ингибировать белок PARP-1 *in vitro*; 3) оценить зависимость активации белка PARP-1 от наличия АТ-богатого сайта, одноцепочечного разрыва и их взаимного расположения в гантелеобразном дуплексе ДНК; 4) изучить способность УБЛ ингибировать белок PARP-1, используя гантелеобразные дуплексы, содержащие одноцепочечный разрыв и сайт «узнавания» УБЛ при их различной взаимной локализации.

Результаты и выводы. Методом футпринтинга ДНКазой I мы показали, что в присутствии каждого из проанализированных УБЛ наблюдался специфический профиль расщепления ДНКазой I, причем общим свойством зон, не подвергшихся расщеплению, являлось наличие последовательностей АТ и АА. Эти данные свидетельствуют о сиквенс-специфичности взаимодействия УБЛ с ДНК. Увеличение аффинности УБЛ к АТ-богатым последовательностям наблюдалось в ряду DAPI < Pentamidine < Diminazene < Hoechst 33258 < Hoechst 33342. Наибольшей способностью ингибировать ДНК-зависимую активацию PARP-1 обладали DAPI, Diminazene и Hoechst 33258, а их концентрации полумаксимального ингибирования реакции (IC_{50}) составили 0,062; 0,133 и 13,2 мкМ соответственно. Введение АТ-богатого региона в последовательности гантелеобразного ДНК-дуплекса значительно увеличивало ингибирующую способность Diminazene.

Работа поддержана грантом РФФИ № 15-04-09216.

Деметилирование ДНК в лечении детей с острыми миелоидными лейкозами

В.С. Немировченко, Е.В. Флейшман,
О.И. Сокова, И.Н. Серебрякова, Б.В. Курдюков,
Ф.А. Махачева, А.В. Попа

НИИ детской онкологии и гематологии, НИИ канцерогенеза,
НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Выживаемость детей с острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ) остается низкой (55–67 %). Известно, что при лейкозах, как и при других злокачествен-

ных новообразованиях, происходят не только генетические, но и выраженные эпигенетические нарушения. В исследованиях НИИ ДОГ ОМЛ 2007 и НИИ ДОГ ОМЛ 2012 наряду с химиопрепаратами применялись деметилирующий ДНК децитабин (Дакоген®), а также ингибиторы деацетилазы — вальпроевая кислота (Депакин®) и полностью трансретиноевая кислота (АТРА, Весаноид®).

По данным протокола ОМЛ НИИ ДОГ 2007 ($n = 70$), в котором к химиотерапии были добавлены Депакин® и АТРА, достигнута 5-летняя безрецидивная выживаемость (БРВ) в $52,4 \pm 6,4$ % случаев, бессобытийная выживаемость (БСВ) — $50,7 \pm 6,2$ % и общая выживаемость (ОВ) — $52,8 \pm 6,1$ %. У пациентов стандартной группы риска ($n = 13$) БРВ составила $74,1 \pm 12,9$ %; ОВ — $75,0 \pm 12,5$ %; средней ($n = 22$) — $42,9 \pm 10,8$ и $50,1 \pm 11,3$ % соответственно; высокой ($n = 35$) — $45,7 \pm 8,9$ и $48,5 \pm 8,7$ % соответственно. Протокол не показал увеличения токсичности терапии при добавлении эпигенетических препаратов.

В протокол НИИ ДОГ ОМЛ 2012 был добавлен еще один эпигенетический препарат — децитабин. Лечение децитабином получили 18 больных ОМЛ. Средний возраст пациентов составил $5,7 \pm 1,3$ года. В группу стандартного риска был включен 1 больной (5,6 %), среднего — 4 (22,2 %) и высокого — 13 (72,2 %) детей. Пять (27,8 %) пациентов получали децитабин в режиме «окна» — до первого курса индукции. Существенного снижения уровня бластных клеток в пунктате костного мозга на 6-й день у них не наблюдалось ($64,4 \pm 28,9$ % исходно и $53,5 \pm 36,1$ % на 6-й день; $p = 0,9$). Тринадцать (72,2 %) больных получали децитабин после 1-го индукционного курса с 16-го по 20-й дни. Все пациенты были инициально отнесены к группе среднего (2 ребенка) и высокого риска (11 детей). Ремиссия достигнута у всех 13 пациентов после проведения 1-го индукционного курса. Высокодозная химиотерапия и трансплантация гемопоэтических стволовых клеток данным больным не проводились. Ни у одного из пациентов не развился рецидив (средний срок наблюдения $12,0 \pm 6,1$ мес).

Таким образом, включение препарата, обладающего непосредственным деметилирующим воздействием на ДНК опухолевой клетки, в период с 16-го по 20-й дни от начала 1-го курса индукции позволило достичь ремиссии у всех больных без увеличения органной токсичности. Кроме того, удалось избежать timing-режима химиотерапии в индукции ремиссии, что существенно сократило токсичность. При среднем сроке наблюдения 12 (6–36) мес рецидивов у пациентов, включенных в исследование, не отмечалось. Возможно, деметилирование ДНК в сочетании с химиотерапией позволит существенно увеличить выживаемость детей, больных ОМЛ.

МикроРНК в эпителиальной ткани лиц с предопухолевыми заболеваниями и карциномой гортани

Е.Г. Никитина, Д.Е. Кульбакин,
О.В. Черемисина, Н.В. Литвяков

ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»

Цель исследования — анализ экспрессии микроРНК в патологически измененной ткани гортани пациентов с предопухолевыми состояниями и карциномами гортани.

Материалы и методы. Использовали парный операционный либо биопсийный материал (измененная и прилежащая нормальная ткань) от пациентов с диагнозом дисплазии 0–III степени (Д0 — III; $n = 25$) и плоскоклеточного рака гортани (РГ; первичный диагноз, $n = 46$). Диагноз верифицировали морфологически. Тотальную фракцию РНК выделяли набором реагентов miRvana™. Уровень экспрессии miR-18a, -21, -155, -200a, -200c, -205, -221 и -494 в ткани рассчитан согласно методу Pfaffl, в качестве гена-рефери выбрана miR-103. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 8.0.

Результаты. Показана тенденция aberrантного повышения экспрессии онкогенных miR-21, -155, -200c и -205 в ряду патологических состояний от Д0 к ДIII (Д0 — I ($n = 15$) vs ДII–III ($n = 10$); $p = 0,019$; $p = 0,045$; $p = 0,020$ и $p = 0,038$ соответственно). У пациентов с РГ значимо гиперэкспрессированы miR-205, -155, -200c и -21 (15 vs 46; $p = 0,0002$; $p = 0,008$; $p = 0,009$ и $p = 0,013$ соответственно) в сравнении с группой без диспластических изменений. Интересно отметить, что показатели экспрессии в подгруппах лиц с ДII–III и РГ были схожими и статистически не различались, что позволяет судить о близости этих подгрупп на молекулярном уровне. В группе больных РГ в сравнении с группой пациентов с диспластическими изменениями количество случаев с гиперэкспрессией miR-205 в 2,98 раза выше, чем с гипоекспрессией (95 % доверительный интервал (ДИ) 1,41–16,26; $p = 0,007$). Это свидетельствует о том, что риск прогрессии заболевания возрастает при повышении экспрессии miR-205 (отношение шансов (ОШ) 4,79). Также показано, что частота случаев с повышенным уровнем экспрессии miR-155 в 2 и более раза в патологически измененной ткани наблюдается значимо чаще у больных РГ, чем у пациентов без диспластических изменений (ОШ 6,82; 95 % ДИ 1,68–27,66; $p = 0,004$), а риск прогрессии заболевания возрастает в 3,2 раза.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что пациенты с предопухолевой патологией составляют гетерогенную группу по молекулярно-генетическим показателям, таким как паттерн экспрессии микроРНК. Выявлено, что miR-21, -155, -200c и -205, вероятно, принимают немаловажное участие в канце-

рогенезе опухолей гортани в силу сопряженности повышения их экспрессии в ряду патологического состояния «отсутствие дисплазии → дисплазия II степени → дисплазия III степени → РГ». Вычислено, что частота случаев с гиперэкспрессией miR-205 и miR-155 при РГ выше, чем при предопухолевых патологиях, что позволяет сделать предположение о перспективности использования данного показателя для оценки риска развития онкопатологии.

Одновременное подавление экспрессии онкогенов путем стабилизации G-квадруплексов в промоторных областях

А.М. Оглоблина¹, Я.А. Жуликов², А.В. Алексеевский²,
М.Г. Якубовская¹

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

²ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России

Новым направлением молекулярной онкологии является изучение механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов неканоническими структурами ДНК, среди которых наиболее важным является стабилизация/дестабилизация G-квадруплексов (G4) — единственной неканонической формы нуклеиновых кислот, существование которой *in vivo* строго доказано. Промоторы онкогенов значительно обогащены G4-образующими последовательностями (G4-мотивами), в то время как гены-супрессоры опухолей обеднены данными мотивами.

При локализации G4-мотива в промоторной области гена уровень его экспрессии определяется закономерностями перехода В-ДНК в неканоническую форму. Химические соединения способны модулировать процесс функционально значимого перехода В-ДНК в G4. Возможности использования потенциальных противоопухолевых препаратов, способных стабилизировать G4 и таким образом подавлять экспрессию онкогенов, в настоящее время активно изучаются.

В целях обнаружения онкогенов, содержащих G4-мотив в промоторной области и подверженных данному типу регуляции, выполнен биоинформатический анализ генома. Работа проводилась методами компьютерного анализа баз данных генома человека (Human Genome GRCh39/hg39). В результате исследования выявлены гены, содержащие QFS на расстоянии до 500 пар нуклеотидов от сайта старта трансляции.

Обнаружено более 50 онкогенов, содержащих G4-мотивы в промоторах, ранее не описанных в литературе. Пять из них (*CSK*, *REL*, *CERK*, *RELA* и *PBX*) были протестированы на наличие G4-зависимой регуляции экспрессии. Для этого клетки линии MCF-7 обраба-

тывали классическим стабилизатором G4 — лигандом TmPyP4 в концентрациях 50, 100 и 300 мкМ. Концентрации подбирали исходя из IC₅₀, определяемой МТТ-тестом, которая составила 450 мкМ. Методом количественной полимеразной цепной реакции обнаружено подавление экспрессии всех перечисленных генов, нормализация образцов проводилась по отношению к количеству мРНК генов домашнего хозяйства *Rpl27*. Наблюдали дозозависимый эффект подавления транскрипции: при максимальной концентрации TmPyP4 (300 мкМ) экспрессия *CSK* снизилась в 2 раза, *REL* — в 5 раз, *CERK* — в 5,6 раза, *RELA* — в 5,2 раза и *PBX* — в 5,6 раза. Таким образом, данные гены могут служить мишенями при разработке противоопухолевых препаратов — стабилизаторов G4.

Анализ характера изменений уровня циркулирующих микроРНК в ответ на противоопухолевое лечение

А.А. Пономарева^{1,2}, Е.С. Морозкин^{3,4}, Е.Ю. Рыкова³,
И.А. Запорожченко^{3,4}, Т.Э. Скворцова³, А.Ю. Добродеев¹,
А.А. Завьялов¹, С.А. Тузиков¹, В.В. Власов³,
Н.В. Чердынцева^{1,5}, П.П. Лактионов^{3,4}

¹ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ИХБФМ СО РАН, Новосибирск;

³ГБОУ ВПО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет»;

⁴ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский
институт патологии кровообращения
им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России;

⁵ГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский
государственный университет»

Введение. Показано, что уровень экспрессии опухолевых ассоциированных микроРНК существенно изменяется в плазме/сыворотке крови больных раком легкого (РЛ) по сравнению со здоровыми донорами. **Целью исследования** явилась оценка значимости изменений уровня 5 выбранных микроРНК плазмы крови как маркеров ответа на противоопухолевую терапию и прогноза выживаемости у больных РЛ.

Материалы и методы. Анализ экспрессии miR-19b, -12b, -25, -205, -125b проводился с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией при использовании контрольной miR-16 на 23 образцах плазмы крови от больных РЛ. Образцы плазмы крови получены от пациентов до лечения, на 30-е сутки после проведения 2 курсов химиотерапии и на 15-е сутки после резекции опухоли.

Результаты. Анализ методом ANOVA показал, что изменения уровня экспрессии miR-19b в плазме крови пациентов на этапах динамического наблюдения при проведении противоопухолевой терапии характеризуются значимым квадратичным трендом ($p = 0,03$). Уровень экспрессии miR-125b значимо повышается

и характеризуется линейным трендом ($p = 0,03$). Отношение miR-125b/19b значимо изменяется в образцах плазмы крови, собранных после химиотерапии и после операции, и при этом характеризуется линейным трендом ($p = 0,04$). В ходе анализа отдельных групп пациентов в зависимости от ответа на химиотерапию (с частичной регрессией и со стабилизацией или прогрессией) выявлены также разные тренды экспрессии miR-19b, -125b и miR-125b/19b между этими группами. Показана ассоциация изменений отношения miR-125b/19b с безрецидивной выживаемостью у больных РЛ ($p < 0,1$). Таким образом, динамические изменения трендов уровня экспрессии miR-19b, miR-125b и miR-125b/19b свидетельствуют о потенциальной возможности использования данных показателей как маркеров предсказания ответа на противоопухолевое лечение. Представляются перспективными дальнейшие исследования в целях оценки прямой связи уровня экспрессии микроРНК в плазме крови с ответом на терапию и выживаемостью у больных РЛ.

Работа поддержана РФФИ (гранты № 14-04-01881 и № 15-34-51142).

Определение мутаций киназного домена *BCR-ABL* у больных хроническим миелолейкозом, резистентных к терапии ингибиторами тирозинкиназ: данные наблюдений за 2013–2015 гг.

В.В. Тихонова¹, Л.А. Кесаева¹, А.А. Крутов²,
Е.Н. Мисюрина³, А.Г. Туркина⁴, Е.Ю. Челышева⁴,
Н.В. Новицкая⁵, Е.А. Османов¹, А.В. Мисюрин¹

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

²ООО «ГеноТехнология», Москва;

³ФГБУ «Гематологический научный центр»

Минздрава России, Москва;

⁴ГБУЗ ГКБ № 52 ДЗМ;

⁵ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина»
Департамента здравоохранения г. Москвы

Введение. Основной причиной резистентности больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ) к терапии ингибиторами тирозинкиназ (ИТК) являются мутации, затрагивающие киназный домен химерного онкогена *BCR-ABL*. Определение мутационного статуса этого участка является обязательным видом анализа для больных ХМЛ с недостаточным ответом на терапию иматинибом, а также при переходе на терапию нилотинибом и дазатинибом. Анализ наиболее значимых точечных мутаций, определяющих резистентность к ИТК, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени может способствовать выбору наиболее эффективной терапии больных ХМЛ.

Материалы и методы. Изучен спектр мутаций киназного домена *BCR-ABL* у 925 больных ХМЛ, резистентных к терапии ИТК, наблюдавшихся в период с 2013 по 2015 г. Мутационный анализ участка мРНК *BCR-ABL* проводился методом прямого секвенирования. Наличие наиболее значимых точечных мутаций выявлялось с помощью ПЦР с обратной транскрипцией, уровень экспрессии мРНК *BCR-ABL* с этими мутациями — методом ПЦР в реальном времени.

Результаты и обсуждение. Мутации гена *BCR-ABL* выявлены у 24 % больных ХМЛ, резистентных к терапии иматинибом. У 9,5 % пациентов выявлены двойные мутации, у 0,6 % — тройные; общее количество обнаруженных мутаций составило 198 (43 различных варианта). У 9 человек с течением времени обнаружено появление новой мутации или смена одной мутации на другую. Анализ соотношения доли мутаций за отдельные периоды времени (2006–2012, 2013, 2014, 2015 гг.) не выявил статистических различий. Спектр мутаций, резистентных к нилотинибу и дазатинибу, был следующим: T315I — 18,4 %; Y253H — 8,9 %; F317L — 8,9 %; F359V — 6,7 %; E255K — 3,9 %; Y253F — 2,8 %; E255V — 2,2 %. Распределение наиболее часто встречающихся мутаций, резистентных к иматинибу: M244V — 10,6 %; G250E — 8,9 %; H396R — 4,5 %. Значительная доля мутаций, приводящих к резистентности к дазатинибу и нилотинибу у больных ХМЛ, получавших терапию иматинибом, подчеркивает важность проведения мутационного анализа при смене терапии, а использование панелей для наиболее важных мутаций позволяет снизить затраты по сравнению с полным секвенированием киназного домена.

*Работа выполнена в рамках темы НИР № 0507-2014-0185 «Исследование мутаций гена *BCR-ABL* у больных хроническим миелолейкозом, резистентных к терапии ингибиторами тирозинкиназной активности».*

Выявление герминальных мутаций при злокачественных новообразованиях желудочно-кишечного тракта с помощью таргетного секвенирования

М.Г. Филиппова^{1,2}, И.С. Абрамов^{1,2}, А.В. Семьянихина¹,
Т.С. Дубровина¹, Т.В. Наседкина², Л.Н. Любченко¹

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

²ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Введение. Существует ряд наследственных заболеваний, при которых риск развития злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) значительно превышает общепопуляционный, в патогенезе которых лежат герминальные мутации в генах предрасположенности. Так, наследственный неполи-

позный колоректальный рак (синдром Линча) ассоциирован с мутациями в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* и *PMS2*; семейный аденоматозный полипоз — с мутациями в гене *APC*, а МУН-ассоциированный полипоз — с мутациями в гене *MUTYH*.

Материалы и методы. В целях оценки вклада герминальных мутаций и полиморфных вариантов в генах *APC*, *MLH1*, *PMS2*, *PMS1*, *MSH2*, *TP53*, *MSH6*, *CDH1*, *BMPRIA*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MUTYH*, *PTEN*, *SMAD4*, *STK11* проведено молекулярно-генетическое исследование геномной ДНК 36 пациентов со злокачественными новообразованиями ЖКТ. Отягощенный семейный анамнез отмечался в 90 % случаев. Отбор целевой последовательности проводили с помощью технологии жидких чипов NimbleGen Sequence Capture. Библиотека зондов включала 2,1 млн олигонуклеотидов длиной 50–105 нуклеотидов, комплементарных кодирующим участкам исследуемых генов. Секвенирование проводили на платформе GS Junior (454/Roche).

Результаты. Выявлено 50 полиморфизмов и мутаций, включая описанные ранее патогенные варианты. Редкие варианты были представлены синонимичными заменами (p.Tyr214= в гене *MSH6*, p.Asn751= в гене *CDH1*), миссенс-мутациями (p.Gly256Asp в гене *MSH2*, p.Val22Met в гене *MUTYH*, p.Thr511Ala в гене *PMS2*, p.Ile157Thr в гене *CHEK2*). Также обнаружены нонсенс-мутации, приводящие к формированию преждевременного стоп-кодона (p.Gln816Ter, p.Arg406Ter, p.Leu744Ter в гене *MSH2*). Данные NGS были подтверждены секвенированием по Сэнгеру.

Выводы. Высокопроизводительное секвенирование является эффективным методом выявления герминальных мутаций и может быть применено в диагностике наследственных форм злокачественных новообразований ЖКТ.

Прогностическое значение локализации точек разрыва в гене *MLL* при острых лейкозах детей первого года жизни

Г.А. Цаур¹⁻³, К. Майер⁴, А.М. Кустанович⁵, А.М. Попов⁶,
Т.О. Ригер¹, Е.В. Флейшман⁷, О.И. Сокова⁷,
Ю.В. Ольшанская⁶, Е.А. Матвеева⁶, Е.В. Шориков¹,
Л.И. Савельев¹⁻³, Р. Маршалек⁴, Л.Г. Фечина¹

¹ГБУЗ «Областная детская клиническая больница № 1», Екатеринбург;

²ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург;

³ГБОУ ВПО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург;

⁴Диагностический центр острых лейкозов, Институт фармацевтической биологии,

Франкфуртский университет им. И.В. Гете, Франкфурт-на-Майне, Германия;

⁵ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии» Минздрава Республики Беларусь, Минск;

⁶ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва;
⁷ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Цель. Оценить взаимосвязь между локализацией точек разрыва в геномной ДНК гена *MLL* и результатами терапии острых лейкозов (ОЛ) у детей первого года жизни.

Материалы и методы. Обследованы 87 детей в возрасте от 0 до 24 месяцев с перестройками гена *MLL*: у 63 из них был острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), у 22 — острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), у 2 — острый лейкоз смешанной линейности. Точка разрыва в геномной ДНК гена *MLL* и генов-партнеров была определена методом длинной инвертированной полимеразной цепной реакции.

Результаты. Наиболее частой точкой разрыва в ДНК гена *MLL* у пациентов с ОЛЛ являлся интрон 11 (31 из 63; 49 %), реже разрывы локализовались в интронах 10 (13 из 63; 21 %) и 9 (9 из 63; 14 %). У пациентов с ОМЛ самой частой точкой разрыва в геномной ДНК гена *MLL* являлся интрон 9 (10 из 22; 45 %), реже обнаруживались точки разрыва в интронах 10 (5 из 22; 23 %) и 11 (4 из 22; 18 %). При оценке прогностической значимости локализации точек разрыва в ДНК гена *MLL* у 46 детей первого года жизни с ОЛЛ, включенных в исследование MLL-Baby, было показано, что 5-летняя бессобытийная выживаемость у пациентов с точкой разрыва в интроне 11 ($n = 29$) была достоверно ниже, чем у пациентов с локализацией точек разрыва с интрона 7 по экзон 11 ($n = 17$; $0,16 \pm 0,07$ и $0,38 \pm 0,14$ соответственно; $p = 0,039$). Одновременно с этим кумулятивная вероятность развития рецидива была значительно выше в группе с точкой разрыва в интроне 11 ($0,74 \pm 0,09$ и $0,52 \pm 0,17$; $p = 0,045$). При проведении многовариантного регрессионного анализа по методу Кокса с включением в модель точки разрыва в интроне 11, возраста, иммунофенотипа, инициального лейкоцитоза, инициальной нейтролейкемии, типа перестройки гена *MLL*, абсолютного количества бластных клеток на 8-й день профаза и минимальной остаточной болезни (МОБ) в точке наблюдения 4 (ТН4) было показано, что единственным значимым фактором остается сохранение МОБ в ТН4 (отношение рисков 5,994; 95 % доверительный интервал 2,209–16,263; $p < 0,001$). Для пациентов с ОМЛ подобной взаимосвязи не выявлено.

Заключение. Локализация точки разрыва в интроне 11 гена *MLL* достоверно ухудшала прогноз детей первого года жизни с ОЛЛ при терапии по протоколу MLL-Baby. Однако данный прогностический фактор нивелировался в многофакторном анализе, где единственным значимым фактором оставалось сохранение МОБ в ТН4 протокола MLL-Baby.

Молекулярная диагностика и мишени таргетной терапии меланомы

Н.Н. Мазуренко, И.В. Цыганова, А.А. Лушникова

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

Введение. Меланома подразделяется на несколько клинико-морфологических подтипов, которые различаются по типу активирующих генетических нарушений. Персонализированная терапия метастатической меланомы направлена на ингибирование сигнальных путей генов, активированных в результате соматических мутаций. **Цель исследования** — анализ мутаций генов *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *PDGFRA*, *GNAQ* и *GNA11* в образцах меланомы различной локализации для характеристики подтипов меланомы и определения чувствительности к препаратам таргетной терапии.

Материалы и методы. Исследовали ДНК, выделенную из парафиновых срезов первичных опухолей или метастазов меланомы от 281 пациента с меланомой кожи ($n = 202$), слизистых оболочек ($n = 24$) или глаза ($n = 55$). Мутации определяли методом полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием.

Результаты. В 202 образцах меланомы кожи выявлены мутации *BRAF* (59 %), *NRAS* (15 %) и *KIT* (1 %). Мутации *BRAF* присутствовали в 69 % опухолей на закрытых для постоянного ультрафиолетового (УФ) облучения участках тела и значительно реже встречались на коже головы, шеи или верхних конечностей (42 %). Мутации *NRAS* и *KIT*, напротив, достоверно чаще выявлялись в опухолях на открытых для УФ-облучения участках кожи (25 и 7 % соответственно). Мутации *BRAF* представлены заменами V600E/K (96,5 %), чувствительными к ингибиторам *BRAF* вемурафенибу или дабрафенибу, тогда как меланомы с мутациями *BRAF* L597 (2,5 %) и K601 (1 %) чувствительны к ингибиторам MEK. Наибольшая частота мутаций *BRAF* отмечена у пациентов в возрасте до 30 лет. Особую группу составили 6 случаев акрально-лентигинозной меланомы кожи, в которых доминировали мутации *NRAS* (33 %).

В меланомах слизистых оболочек обнаружены мутации *KIT* (35 %), *BRAF* (17 %) и *NRAS* (13 %). Спектр мутаций варьировал в зависимости от локализации опухоли. В частности, мутации в экзоне 11 *KIT* выявлены в 50 % случаев синоназальной меланомы и меланомы вульвы; все мутации были чувствительны к ингибиторам тирозинкиназ. При анализе 48 образцов меланомы хориоидеи в 78 % выявлены мутации *GNAQ* и *GNA11* и в 4 % — мутации *KIT*. В 7 образцах меланомы конъюнктивы выявлены мутации *BRAF* (57 %) и *NRAS* (14 %).

Выводы. Мутационный статус строго ассоциирован с локализацией, гистологическим типом меланомы и УФ-облучением. Определение мутаций онкогенов важно для выбора тактики лечения и персонализированной таргетной терапии больных различными вариантами меланомы.

Роль 2p21 и 11q13.3 в этиологии рака почки

О.В. Шаньгина, А.Ф. Мукерия, В.А. Юрченко, Д.Г. Заридзе

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

В рамках мультицентрового молекулярно-эпидемиологического исследования рака почки проведены полногеномные исследования в целях идентификации геномных вариантов, влияющих на риск развития заболевания, и их взаимодействия с факторами окружающей среды. В результате идентифицированы 2 локуса на хромосомах 2p21 и 11q13.3, которые встречались значительно чаще у больных, чем у здоровых лиц. Два варианта: rs11894252 и rs7579899, расположенные в локусе на коротком плече хромосомы 2 (2p21), соответствуют расположению гена *EPAS1*, который кодирует HIF-2 α — транскрипционный фактор, участвующий в VHL—HIF-механизме канцерогенеза в почке. Второй локус rs7105934 на хромосоме 11q13.3 не содержит известных генов. Риск рака почки повышен среди индивидов с вариантом полиморфизма rs7579899 на хромосоме 2 (2p21) только у курильщиков или прекративших курить (относительный риск (ОР) 1,3; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,1–1,4; ОР 1,2; 95 % ДИ 1,1–1,3 соответственно), но не у никогда не куривших (ОР 1,0; 95 % ДИ 0,9–1,1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что ген *EPAS1* является ключевым в канцерогенезе рака почки и что влияние полиморфизма этого гена на риск возникновения рака почки зависит от фактора курения. Дальнейший анализ участка на коротком плече хромосомы 2 (2p21), который ассоциирован с почечно-клеточным раком, позволил идентифицировать еще несколько аллелей (однонуклеотидных полиморфизмов) высокого риска для почечно-клеточного рака. На участке rs9679290 (ОР 1,27; 95 % ДИ 1,17–1,39) были выявлены 2 новых часто встречающихся локуса rs4953346 и rs12617313, которые, как выяснилось, не связаны с ранее обнаруженными rs11894252 и rs7579899. Генотипирование участка хромосомы 2 (2p21), содержащего rs12617313, подтвердило наличие его связи с риском почечно-клеточного рака (ОР 1,28; 95 % ДИ 1,18–1,39). Таким образом, установлено и подтверждено, что изменения на коротком плече хромосомы 2p21 играют немаловажную роль в этиологии почечно-клеточного рака и необходимы дальнейшие исследования в этой области.

Генетические и эпигенетические нарушения гена *AURKA* у больных хроническим лимфоцитарным лейкозом

Т.Г. Шкаврова, Г.Ф. Михайлова,
В.В. Цепенко, В.В. Павлов

Медицинский радиологический научный центр
им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский
исследовательский радиологический центр» Минздрава
России, Обнинск

Введение. В настоящее время исследователи уделяют много внимания изучению генетических и эпигенетических нарушений у онкологических больных. Хотя хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) является одним из наиболее изученных заболеваний, до сих пор остается неизвестной его этиология. Поиск генов, играющих ключевую роль в онкогенезе, ведется активно. В последнее время вызвал научный интерес ген *AURKA*, который играет существенную роль в регуляции митоза и регулирует кинетическую активность клеток. Метод интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) одновременно позволяет не только выявлять потерю или увеличение количества копий генов, но и оценивать частоту обнаружения клеток с асинхронной репликацией (АР). Время репликации генов — четко запрограммированный процесс, коррелирующий со стабильностью генома.

Работ по изучению асинхронной репликации и потери гена *AURKA* у больных ХЛЛ не проводилось.

Цель исследования — изучить АР и потерю копии гена *AURKA* у больных ХЛЛ.

Материалы и методы. Исследование выполнено на архивных образцах нестимулированных лимфоцитов 8 больных ХЛЛ и 8 клинически здоровых доноров методом I-FISH. Группа больных подобрана таким образом, что в нее вошли 4 человека (подгруппа 1), имевших высокую (73,5–93,0 %) частоту встречаемости клеток с del17p13, т. е. относившихся к группе плохого прогноза; и 4 человека (подгруппа 2), имевших del13q14 как единственное нарушение, т. е. относившихся к группе благоприятного прогноза. В работе использованы коммерческие молекулярные зонды фирмы Vysis (USA).

Результаты. Частота клеток с асинхронной репликацией гена *AURKA* у больных ХЛЛ колебалась в пределах 31,1–50,7 %, что достоверно выше контрольного показателя — $15,6 \pm 0,6$ %. В подгруппах 1 и 2 средняя частота клеток с АР составляла $46,4 \pm 1,5$ и $42,7 \pm 1,5$ % соответственно и достоверно не различалась. Частота клеток с потерей копии гена *AURKA* у 7 из 8 обследованных больных достоверно превышала контрольный уровень ($1,0 \pm 0,1$ %); в подгруппе 1 она была достоверно выше, чем в подгруппе 2, и в среднем составила $17,2 \pm 1,1$ и $6,1 \pm 0,6$ % соответственно.

Заключение. Предварительные данные показывают, что АР у больных ХЛЛ отражает нестабильность генома, а ген *AURKA* представляет интерес для дальнейшего исследования.

Секция VI

НОВЫЕ МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

Стресс-индуцированные молекулы МІСА в сыворотке крови онкологических больных

Е.В. Абакушина, Ю.В. Маризина, И.А. Пасова, Г.С. Неприна
МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИРЦ
Минздрава России, Обнинск

Цель работы — сравнить субпопуляционный состав NK-клеток и рецептора NKG2D на NK-клетках, а также оценить уровень стресс-индуцированных молекул МІСА в сыворотке крови у больных со злокачественными новообразованиями кишечника и меланомой.

Материалы и методы. Оценен фенотип NK-клеток (CD16⁺CD56⁺CD3⁻) периферической крови и рецептор NKG2D (CD314) на всех лимфоцитах и на NK-клетках (CD314⁺CD16⁺) у 43 онкологических больных колоректальным раком и 26 больных меланомой. Контрольную группу составляли 20 здоровых доноров. Для определения sMICA в сыворотке крови использовали иммуноферментный анализ.

Результаты. Больные были разделены на 3 группы в зависимости от содержания sMICA: низкое — 0–1500 пг/мл (1-я группа), среднее — 1500–4000 пг/мл (2-я группа) и высокое — более 4000 пг/мл (3-я группа). В сыворотках крови здоровых доноров sMICA обнаруживались в минимальных количествах (менее 100 пг/мл). При меланоме среднее содержание sMICA составило 2436 пг/мл; в 1-ю группу были отнесены 34,6 % пациентов, во 2-ю — 42,3 % и в 3-ю — 23,1 %. При раке кишечника среднее содержание sMICA составило 790 пг/мл; в 1-ю группу вошли 90,7 % пациентов, в 3-ю — 9,3 %, группы со средним содержанием МІСА не выявлено. Показано, что у всех онкологических больных по сравнению с группой контроля повышено содержание рецептора NKG2D на NK-клетках, что говорит об их активации. Отмечается увеличение количества NK-клеток у больных раком кишечника

1-й группы, также у них повышено содержание рецептора NKG2D на всех лимфоцитах.

Выводы. Количество sMICA в сыворотке крови больных возрастает в несколько раз, что может служить одним из ранних диагностических маркеров наличия онкологического заболевания. С повышением sMICA в сыворотке крови больных меланомой в крови увеличивается количество NK-клеток. У больных раком кишечника наблюдается обратная тенденция: содержание рецептора NKG2D и количество NK-клеток уменьшаются с увеличением уровня sMICA, что, вероятно, свидетельствует о различном иммунопатогенезе данных заболеваний.

Изучение мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* у больных раком молочной железы с отягощенным семейным анамнезом в Узбекистане

А.Н. Абдихакимов, М.Т. Тухтабоева,
Б.Ш. Адылов, Ш.У. Турдикулова

Ташкентский областной онкологический диспансер,
Республика Узбекистан;
Центр медицинской генетики Института биохимии
АН Республики Узбекистан, Ташкент

В настоящее время рак молочной железы (РМЖ) во всем мире занимает лидирующее место. Население Узбекистана растет быстрыми темпами, и в связи с этим актуален вопрос ранней диагностики и профилактики РМЖ.

Наследственные факторы играют важную роль в развитии РМЖ. Значимым открытием онкологии последних 2 десятилетий явилось обнаружение генов наследственного РМЖ и рака яичника — *BRCA1* и *BRCA2*. *BRCA*-обусловленный РМЖ составляет 5–10 % всех случаев рака данной локализации. Вклад наследствен-

ных генных дефектов в заболеваемость РМЖ в Узбекистане практически не изучался. Настоящая работа направлена на изучение частоты и клинической значимости мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* у больных с отягощенным семейным анамнезом в Узбекистане.

В исследование была включена группа пациенток с РМЖ ($n = 24$), отобранных по наличию семейного анамнеза. Контрольная группа состояла из 103 практически здоровых женщин. Для выявления мутаций 5382insC, 4153delA, 185delAG и 300T>G в гене *BRCA1*, а также 6174delT в гене *BRCA2* использовалась аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. В результате генотипирования обнаружено, что 3 (12,5 %) пациентки имеют гетерозиготную мутацию *BRCA1* 5382insC. Мутации *BRCA1* 4153delA, 185delAG, 300T>G и *BRCA2* 6174delT не выявлены ни в одном из проанализированных случаев. Исследованные мутации не обнаружены и в контрольной группе.

Результаты исследования указывают на целесообразность включения генотипирования мутации *BRCA1* 5382insC в качестве предиктивного онкогенетического теста в массовое обследование здоровых женщин Узбекистана с отягощенным семейным анамнезом, что будет способствовать значительному увеличению выявляемости РМЖ на ранней стадии, а также проведению эффективных профилактических медицинских вмешательств.

Выявление мутаций в образцах меланомы с помощью биочипов и массового параллельного секвенирования

И.С. Абрамов^{1,2}, М.А. Емельянова^{1,2}, Л.Г. Гукасян¹,
Е.В. Степанова², О.О. Рябая², Н.С. Петрович²,
Л.Н. Любченко², Т.С. Бельшева², А.С. Заседателев^{1,2},
Т.В. Наседкина^{1,2}

¹ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

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

Меланома является наиболее агрессивной формой рака кожи. В настоящее время разработан ряд препаратов направленного действия, которые подавляют рост опухоли при определенном генотипе ее клеток. Для выявления клинически значимых соматических мутаций, определяющих выбор терапии, разрабатываются практические методы, способные значительно улучшить персонализированные подходы в лечении меланомы. Также необходимо осуществлять поиск новых мутаций, которые обуславливают устойчивость либо чувствительность опухоли к различным таргетным препаратам.

Проведен анализ мутационного статуса 6 клеточных линий меланомы, 6 меланоцитарных невусов и 15 клинических образцов меланомы с помощью

2 методов: массового параллельного секвенирования (NGS) и биологических микрочипов. Секвенирование выполняли на платформе GS Junior (454/Roche). Отбор кодирующих участков генов *NRAS*, *PDGFRA*, *KIT*, *RASA1*, *RAC1*, *MET*, *BRAF*, *PTEN*, *AKT1*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *CDKN2A* и *TP53* проводили с помощью технологии жидких чипов NimbleGen Sequence Capture (Roche). Параллельно были проанализированы 27 соматических мутаций в генах *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *MAP2K1* и *MAP2K2* методом мультиплексной LNA-блокирующей полимеразной цепной реакции и гибридизации на биочипе.

Выявлены соматические мутации в генах *NRAS*, *BRAF*, *MAP2K1*, *TP53*. Также с помощью секвенирования обнаружены редкие герминальные варианты нуклеотидных замен в генах *CDKN2A*, *KIT*, *PDGFRA*, *MAP2K1*. Герминальный статус миссенс-мутаций в гене *CDKN2A* подтвержден с помощью секвенирования по Сэнгеру геномной ДНК, выделенной из лимфоцитов крови соответствующих пациентов. В результате исследования биочипы показали себя надежной, простой и высокочувствительной системой для анализа известных мутаций в генах *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *MAP2K1* и *MAP2K2*, для более широкого исследования мутационного статуса опухолевых клеток меланомы высокую эффективность показало массовое параллельное секвенирование.

Работа выполнена при поддержке РНФ (грант № 14-35-00107).

Оценка генокорректирующей активности К-48, Дэкоцина (К-18), К-42 как новых средств терапии

Н.А. Агзамова, З.М. Еникеева, А.Ч. Абдирова,
Н.Б. Юсупова, М.С. Гильдиев

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

Цель исследования — изучение изменений генетической информации в клетках костного мозга у мышей с разными генотипами (C57BL/6, BALB/c и беспородных) и с разными опухолями, как интактных, так и опухоленосителей; оценка генокорректирующей и иммуномодулирующей активности К-18, К-42, К-48 как новых средств терапии.

Материалы и методы. Использованы цитогенетический и иммунологические методы исследования с применением фитогемагглютинаина, питательной среды, эмбриональной телячьей сыворотки, моноклональных антител, антисывороток (фирмы «ПанЭКО», ДАКО, Санкт-Петербургский НИИ гематологии).

Результаты. Анализ результатов изучения фенотипа иммунокомпетентных клеток у мышей линий BALB/c, C57BL/6 и беспородных и создание модельной тест-системы для изучения коррекции иммунного и генетического статусов позволили констатировать наличие у К-48 при внутрибрюшинном (в дозах

100 и 1 мг/кг) и К-42 при пероральном применении в терапевтических дозах после проведенного лечения животных с опухолями АКАТОЛ и меланомы В-16 иммуномодуляции (активации и совершенствования функциональной активности клеток иммунной системы) и индукции апоптоза. При использовании К-18 наблюдалось снижение уровня иммунологических показателей по сравнению с группой нелеченых животных, однако он способствовал сохранению активности клеток иммунной системы, что проявляется в реакциях как с митогеном конканавалином А, так и с АгМ, в усилении апоптоза (CD95⁺). Цитогенетический анализ показал, что структурные изменения хромосом увеличиваются вне зависимости от линии животных и от трансплантируемой опухоли. При воздействии на животных с опухолями меланомы В-16 и АКАТОЛ К-48 в дозах 100 и 1 мг/кг снижает уровень хромосомных aberrаций в клетках костного мозга опухоленосителей с меланомой В-16 до 60 %, с АКАТОЛ — до 54 % по сравнению с нелечеными животными. При воздействии К-18 и К-42 наблюдалось снижение aberrаций хромосом опухоленосителей с меланомой В-16 на 54 и 23 %, с АКАТОЛ — на 26 (недостаточно) и 44 % соответственно.

Выводы. К-48 обладает наиболее выраженным иммуно- и генокорректирующим действием в дозе 1 мг/кг, Дэкоцин и К-42 — в меньшей степени. Следовательно, применение К-48 может быть перспективным для коррекции онкологических заболеваний.

Работа поддержана грантом Республики Узбекистан ФДСС 12.7.

Исследование цитотоксической активности нового комплекса биологически активных веществ эриксина в отношении клеток рака молочной железы

У.С. Акбаров, А.А. Абдувалиев, А.Х. Рахманов

Межвузовская научно-исследовательская лаборатория Ташкентской медицинской академии, Республика Узбекистан

Эриксин — водный раствор комплекса биологически активных веществ (полипептидов и свободных аминокислот), а также микроэлементов, получаемых из биомассы змей *Eryx*. Нами определена цитотоксическая активность препарата эриксин в отношении временной культуры опухолевых клеток.

Временную культуру опухолевых клеток рака молочной железы получали из биопсийного материала пациентов, проходивших лечение в Республиканском онкологическом научном центре (Ташкент). Воздействие на опухолевые клетки препаратом эриксин проводили в дозах 200, 100, 50, 10 мкг/10 × 10⁶ клеток в течение 60 мин с последующим определением коли-

чества живых, погибших и апоптозных клеток в сравнении с контрольной группой клеток, не подвергшихся воздействию препарата.

Проведенные исследования показали, что препарат эриксин обладает цитотоксическим эффектом в отношении клеток рака молочной железы во всех исследованных дозах. Наибольшую эффективность подавления жизнедеятельности раковых клеток (48 %) мы наблюдали при воздействии препарата в дозе 100 мкг/10 × 10⁶ клеток, количество апоптозных клеток составило 1,0 ± 0,31 %. С учетом фоновой гибели клеток в контроле, препарат эриксин ингибирует рост раковых клеток на 23,0 % в дозе воздействия 100 мкг/10 × 10⁶ клеток.

Обращает на себя внимание отсутствие у препарата дозозависимого эффекта цитотоксических свойств: с повышением дозы гибель раковых клеток увеличивается незначительно. По-видимому, это связано с механизмом действия препарата на метаболизм опухолевых клеток: взаимодействие активных веществ, входящих в его состав, с опухолевыми клетками происходит на уровне рецепторов, отсюда и отсутствие эффекта «высокой дозы». Соединяясь с рецепторами на поверхности опухолевых клеток, активные вещества в составе препарата вызывают нарушение пролиферирующего сигнального раковых клеток, что приводит к их гибели и индукции апоптоза.

Молекулярная патология гена *MGMT* при глиобластоме

Е.А. Алексеева, А.С. Танас, В.В. Стрельников, Д.В. Залетаев

ФГБНУ МГНЦ, Москва

Наиболее изученным молекулярным изменением при глиобластоме является аномальное метилирование промоторной области гена *MGMT*, расположенного на хромосоме 10q26.3. В настоящее время метилирование промоторной области этого гена считается основным клиническим маркером чувствительности опухоли к терапии темозоломидом. Другим событием, приводящим к инактивации гена *MGMT*, может быть потеря гетерозиготности (ПГ) области его расположения. **Целью работы** явилась комплексная характеристика молекулярной патологии гена *MGMT* при глиобластоме.

Образцы опухолевой ткани и образцы периферической крови получены от 163 пациентов с глиобластомой. Для исследования метилирования промотора гена *MGMT* разработаны системы мультилокусных метилчувствительных полимеразных цепных реакций (ПЦР) с использованием рестриктаз HpaII и HhaI. Частота метилирования промотора *MGMT* составила 39,3 % (64 из 163). Исследование ПГ в локусе 10q26.3 осуществляли с помощью микросателлитного анализа. Система микросателлитных маркеров включала 10 ми-

кросателлитных повторов. Доля образцов с ПГ области расположения гена *MGMT* составила 60,2 % (74 из 123).

С помощью нового подхода для определения изменения копийности геномных локусов — количественного микросателлитного анализа (КМА) — в образцах с выявленной ПГ исследован характер аллельного дисбаланса. Принцип КМА основан на TaqMan-ПЦР в реальном времени. В этом подходе в качестве зонда для детекции продукта используется олигомер, состоящий из 21 нуклеотида, комплементарный к (CA)_n-повтору. Эндогенным контролем служила одновременная амплификация в одной лунке набора пар праймеров к 6 геномным локусам, содержащим (CA)_n-повторы и расположенным на различных хромосомах, нарушения копийности которых не характерны для глиобластомы. С помощью КМА были проанализированы 63 образца глиобластомы с выявленной ПГ *MGMT*. В 46,0 % (29 из 63) образцов выявлена только 1 копия исследованной области (делеция), в 49,2 % (31 из 63) — 2 копии (однородительская дисомия) и в 4,8 % (3 из 63) образцов присутствовали как участки делеции, так и участки однородительской дисомии.

С помощью двустороннего теста Фишера не выявлено ассоциации между метилированием промотора гена *MGMT* и ПГ области его расположения.

Таким образом, ПГ области расположения гена *MGMT* может рассматриваться как потенциальный дополнительный маркер прогноза течения заболевания и ответа на терапию.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-31832 мол_а.

Провоспалительные цитокины и миелоидные супрессорные клетки как мишени терапии рака

К.-С.Н. Атретханы, М.А. Носенко, Р.В. Зварцев, А.А. Круглов, Г.А. Ефимов, С.А. Недоспасов, М.С. Друцкая
ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Миелоидные супрессорные клетки (myeloid derived suppressor cells, MDSC) представляют собой гетерогенную популяцию, состоящую из незрелых миелоидных клеток. В нормальных условиях они благополучно проходят все стадии дифференцировки и образуют макрофаги, гранулоциты и дендритные клетки. При патологических состояниях, таких как воспаление, рак или инфекции, происходит ингибирование дифференцировки незрелых миелоидных клеток, что приводит к их накоплению в крови и поврежденной ткани. MDSC осуществляют супрессорную функцию за счет экспрессии аргиназы 1 (ARG1) и индуцируемой синтазы оксида азота (iNOS). Эти подавляющие иммунную систему факторы способствуют росту опухоли,

ингибируя противоопухолевый Т-клеточный ответ. Интерлейкин-6 (IL-6) и GM-CSF необходимы для получения MDSC *in vitro* из клеток костного мозга (Marigo I. et al., 2010). Недавно было показано, что сигнальный каскад TNF и его рецептора TNFRII обеспечивает выживание MDSC, регулируя клеточный белок — ингибитор FLICE (с-FLIP) и активность каспазы-8 (Xueqiang Zhao et al., 2012).

Разработана экспериментальная модель для изучения влияния системной противовоспалительной терапии на индуцированное опухолевым ростом накопление MDSC в крови. Для блокировки TNF мышам линии C57BL/6, трансплантированным клетками фибросаркомы MCA205, вводили этанерцепт, слитный белок растворимого рецептора TNFRII и константного участка иммуноглобулина G1 человека. Контрольная группа мышей получала контрольное антитело, не связывающее мышинный TNF (Knight D. et al., 1993). Антитела вводили внутривентриально из расчета 10 мкг/г каждые 3 дня. Опухолевые клетки инъецировали через неделю после начала анти-TNF-терапии. Рост опухоли и накопление MDSC в крови оценивали регулярно на протяжении 3 нед. Анализ MDSC проводили методом проточной цитометрии с использованием эпитоп-специфических антител против CD11b и GR-1 мыши.

Показано, что системная антицитокиновая терапия приводит к значительному замедлению роста фибросаркомы MCA205 *in vivo*. Мыши, леченные этанерцептом, имели существенно меньший объем опухоли и пониженное содержание MDSC в крови через 3 нед после инокуляции опухолевых клеток. Наши данные свидетельствуют о том, что терапия, основанная на блокировке одного из ключевых провоспалительных цитокинов, способствует уменьшению опухолевого роста и накоплению MDSC у мышей с фибросаркомой MCA205. В будущем такие же эксперименты будут проведены с анти-IL-6-антителами.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 14-25-00160).

Интерлейкин-6 и другие провоспалительные цитокины в модели спонтанной В-клеточной лимфомы

К.-С.Н. Атретханы¹, М.А. Носенко¹, Р.В. Зварцев¹, Д. Хозер², Г. Вильямский², Т. Бланкенштайн², С.А. Недоспасов¹, М.С. Друцкая¹

¹ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;
²Центр молекулярной медицины им. Макса Дельбрюка, Берлин, Германия

Хроническое воспаление может играть важную роль в процессах канцерогенеза. Показано, что в усло-

виях хронического воспаления происходит запуск сигнальных каскадов и транскрипционных факторов, которые могут дать селективное преимущество опухолевым клеткам. Интерлейкин-6 (IL-6) является одним из главных провоспалительных цитокинов, экспрессия которого повышается на фоне инфекций, повреждения ткани, аутоиммунных патологий и развития опухолей. TNF — многофункциональный цитокин, физиологические функции которого связаны с защитой организма от инфекций, контролем воспаления и иммунорегуляцией. LTα — родственник TNF цитокин, ответственный за формирование вторичных лимфоидных органов и поддержание микроокружения лимфоидных ниш, для которого недавно была показана проонкогенная роль в нескольких экспериментальных моделях канцерогенеза (рак простаты, гепатоклеточная карцинома) при передаче сигнала через LTβR. Основная цель настоящей работы — изучить экспрессию генов провоспалительных цитокинов IL-6, TNF и LTα опухолевыми клетками на модели В-клеточной лимфомы.

В качестве экспериментальной модели были выбраны генетически модифицированные мыши, у которых происходила активация онкогена *Tag* вируса SV40 в В-клетках (за счет вырезания ингибирующей транскрипцию *Tag* последовательности при активации Cre-рекомбиназы), что приводило к спонтанному возникновению В-клеточных лимфом у этих животных в возрасте 5–8 месяцев. Клетки первичной лимфомы от таких мышей пересаживали RAG-дефицитным мышам, у которых развивались вторичные лимфомы в течение 2–3 нед. В полученных образцах лимфом экспрессию генов *IL6*, *TNF* и *LTA* оценивали методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. При этом анализировали как исходный образец спленоцитов, так и обогащенную опухолевыми клетками фракцию В-лимфоцитов, полученную методом магнитной сепарации.

В ходе работы проанализировано 18 образцов В-клеточных лимфом и показано, что уровень экспрессии *TNF* и *LTA* в них более чем на порядок снижен по сравнению с контрольными образцами, в качестве которых были выбраны наивные или активированные спленоциты и В-клетки. Полученные данные показывают, что в клетках лимфомы происходит значительное снижение уровня экспрессии цитокинов TNF и LTα, при этом опухолевые образцы имеют дифференциальный профиль экспрессии IL-6. В некоторых образцах лимфом происходит повышение уровня экспрессии IL-6, тогда как другие образцы имеют неактивированный статус и экспрессия IL-6 в них соответствует экспрессии в В-клетках и спленоцитах здоровых мышей. При этом известно, что IL-6 необходим для развития и пролиферации В-клеток. Кроме того, для него показана проонкогенная роль в развитии различных видов лимфом как на мышинных моделях, так и в клинике, а также начаты клинические испытания с при-

менением блокаторов IL-6 у людей с В-клеточной и неходжкинской лимфомами. Снижение уровня экспрессии TNF и LTα в опухолевых образцах свидетельствует о том, что, несмотря на их значимую роль в формировании воспалительного микроокружения при развитии солидных опухолей, по-видимому, роль этих цитокинов в развитии опухолей гематологического происхождения незначительна.

Работа осуществлена при поддержке РНФ (грант № 14-25-00160).

Возможности иммуноцитохимии в диагностике узловых образований щитовидной железы

И.С. Березкина¹, Т.В. Саприна¹, А.П. Зима¹, А.В. Исаева¹,
В.Н. Латыпова¹, И.Н. Ворожцова¹, М.Р. Мухамедов^{1,2},
Л.Р. Базилевич³, О.С. Попов¹

¹ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск;

²ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

³ОГАУЗ «Томская областная клиническая больница»

Распространенность рака щитовидной железы (РЩЖ) увеличилась с 2003 до 2014 г. почти в 2 раза — с 55,0 до 97,1 на 100 тыс. населения. Проблема дифференциальной диагностики узловых образований щитовидной железы (ЩЖ) остается актуальной и является причиной выполнения большого количества «лишних» оперативных вмешательств, доходящего до 71 %.

Цель исследования — изучение возможности использования иммуноцитохимического определения экспрессии маркеров галектина-3, нуклеофозмина, Ki-67 в пунктате из узлов ЩЖ для дифференциальной диагностики злокачественного и доброкачественного процессов. Клиническая группа представлена 28 пациентами с узловым зобом. На этапе гистологического исследования представлены следующие заключения: коллоидный зоб — 12 случаев, аутоиммунный тиреоидит — 7 (из них 4 случая являлись фоном узлового коллоидного зоба), фолликулярная аденома — 2, папиллярный рак — 11 (из них 1 случай папиллярного рака с фокусами фолликулярного). Мы определяли связь Histochemical score (HS) экспрессии маркеров Ki-67, нуклеофозмина, галектина-3 с наличием РЩЖ. HS рассчитывали по формуле:

$$HS = \sum P(i) \times i,$$

где *i* — интенсивность окрашивания в баллах (от 0 до 3); *P(i)* — процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

HS Ki-67 продемонстрировал сильную положительную корреляцию ($r = 0,8$; $p < 0,001$) со злокачественным потенциалом образования ЩЖ. С помощью бинарной логистической регрессии была выведена

формула, которая на основании HS Ki-67 позволяет предположить злокачественный процесс:

$$P = \frac{1}{1 + 2,718^{(-2,737 + 0,084 \times \text{HS Ki-67})}}$$

При $P > 0,5$ наиболее вероятно, что образование является злокачественным. Таким образом, при HS Ki-67 $> 32,6$ вероятность того, что образование щитовидной железы будет злокачественным, $> 50\%$. Чувствительность данного метода — $81,8\%$, специфичность — $93,8\%$; положительная предсказательная ценность — 90% , отрицательная — 88% . Чувствительность и специфичность экспрессии остальных маркеров, как по отдельности, так и в совокупности, была ниже, чем определение только HS Ki-67. При совместном же проведении жидкостной цитологии и определении HS Ki-67 чувствительность и специфичность метода достигают 100% . Выведена формула для расчета принадлежности к группе злокачественной или доброкачественной патологии методом бинарной логистической регрессии:

$$P = \frac{1}{1 + 2,718^{(-177,6 + 0,366 \times \text{HS Ki-67} + 37,5) \times \text{ЖЦ по классиф. Бетесда}}}$$

В случае постановки заключения фолликулярной аденомы узел с наибольшей вероятностью является злокачественным при HS Ki-67 $> 82,4$. Однако наше исследование имеет ограничение, так как среди пациентов с подозрением на фолликулярный рак диагноз не подтвердился гистологически ни в одном из случаев.

*Исследования выполнены при поддержке
Гранта совета при Президенте РФ для поддержки
ведущих научных школ (№ НШ-4184.2014.7),
Гранта совета при Президенте РФ для поддержки
молодых докторов наук (№ 16.120.11.1233-МД).*

Использование технологии CPP (cell penetrating peptides) для создания таргетных противоопухолевых пептидов. Исследование противоопухолевой активности химерного пептида – ингибитора Ras-киназы

**В.К. Боженко, Т.М. Кулинич, А.М. Шишкин,
Е.А. Кудинова, А.В. Иванов**

*ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва*

Введение. Разрабатываемый нами подход к созданию новых противоопухолевых препаратов основан на использовании инновационной технологии внутриклеточной доставки высокомолекулярных соединений на основе CPP (cell penetrating peptides), или ин-

тернализуемых пептидов. В рамках этой технологии нами исследован спектр химерных пептидных конструкций, включающих в составе одной полипептидной цепи транспортные последовательности и функциональные последовательности, таргетно ингибирующие целевые внутриклеточные мишени, такие как cyclin D/CDK4, Ras/Raf и др.

Материалы и методы. Синтезирована библиотека пептидов, отличающихся транспортной и функциональной последовательностью. Синтезированы флуоресцентные аналоги. Флуоресцентная и конфокальная микроскопия использовались для изучения внутриклеточной локализации вариантов синтезированных пептидов. Цитотоксические и цитостатические свойства изучались на различных клеточных линиях: SCOV, A549, HT29, HCT116, MCF-7 и др., как в экспериментах *in vitro* с применением стандартных тестов (МТТ, проточная цитофлуориметрия), так и с использованием технологии online-мониторинга iCelligence. *In vivo* эксперименты проводили на моделях ксенографтов.

Результаты. Показано, что применение технологии CPP позволяет эффективно доставлять пептиды различной молекулярной массы как в цитоплазму клетки, так и в ядро. Короткие пептидные последовательности могут реализовать отдельные функции полноразмерных белков. Последовательность из белка p16INK4a ингибировала комплекс cyclin D/CDK4 и останавливала клеточную пролиферацию на этапе перехода G1–S при концентрации $5–10\text{ мкМ}$ для различных клеточных линий. Последовательность, ингибирующая взаимодействие Ras/Raf, также подавляла активацию клеточной пролиферации. Обе последовательности активировали клеточную гибель по механизму апоптоза при повышении концентрации в 2 и более раза по сравнению с концентрацией, вызывающей торможение деления. Показано также, что возможно получение последовательностей, ингибирующих активность транскрипционных факторов, таких как E2F и Мус. В экспериментах *in vivo* на моделях ксенографтов показано, что внутривенное введение малотоксично и вызывает торможение роста опухоли на $50–70\%$ для разных линий.

*Работа поддержана Минобрнауки России
(грант № 14. N08.11.0057) и Минпромнауки России
(грант № 11411.1008700.13.131).*

Исследование противоопухолевой активности лимфоцитов, генномодифицированных искусственным Т-клеточным рецептором (CAR), специфичным к раково-эмбриональному антигену

В.К. Боженко, А.М. Шишкин,
А.В. Иванов, Т.М. Кулинич

ФГБУ РНЦРР Минздрава России, Москва

Цель исследования — разработка генетических конструкций искусственного Т-клеточного рецептора, специфичного к раково-эмбриональному антигену (РЭА); отработка технологии получения генномодифицированных лимфоцитов и доклиническая проверка их противоопухолевой активности.

Материалы и методы. Создана панель генетических конструкций Т-клеточного рецептора, включающая различные варианты внутриклеточной последовательности на основе генов *CD8*, *CD28*, *CD137* и *CD247* и внеклеточную распознающую часть — мономолекулярные scFv моноклональных антител мыши к РЭА человека. Цитотоксичность лимфоцитов, трансформированных плазмидами, содержащими гены химерных рецепторов, проверялась *in vitro* на клеточных линиях опухолей человека A549, HT29 и *in vivo* на модели ксенографтов. Фармакокинетика исследовалась на 2 видах животных.

Результаты. Трансфекция *in vitro* лимфоцитов человека плазмидами, содержащими химерный Т-клеточный рецептор, приводит к стойкой экспрессии на их поверхности соответствующей белковой конструкции, что подтверждается исследованием с антителами к ζ -цепи химерного рецептора и связыванием ФИТЦ-меченного РЭА. В экспериментах *in vitro* цитотоксическая активность трансформированных лимфоцитов составила 50 % и более, что превышает соответствующие показатели для аналогичных конструкций, описанных в литературе. Показано, что цитотоксические свойства лимфоцитов, экспрессирующих искусственный Т-клеточный рецептор, *in vitro* проявляются только в отношении РЭА-позитивных клеток и минимальны в отношении РЭА-негативных. На модели ксенографтов колоректального РЭА-позитивного рака человека (HCT116) показано, что адоптивная иммунотерапия с использованием генномодифицированных плазмидой pCI/3C1-3g лимфоцитов имеет высокую противоопухолевую активность. При введении генномодифицированных лимфоцитов в режиме 1 млн клеток в неделю внутрибрюшинно на момент гибели 100 % контрольных животных ($n = 10$) в экспериментальной группе остались живы 80 % ($n = 8$). Исследована фармакокинетика генномодифицированных лимфоцитов и пока-

зана длительная персистенция их в кровотоке *in vivo* (более 2 нед).

Работа поддержана Минобрнауки России (грант № 14. N08.11.0018).

Модулирование функциональной активности глюкокортикоидного рецептора с избирательной активацией транскрепрессии с помощью иммуносупрессора рапамицина

О.И. Борисова (Задорожная)¹, А.В. Савинкова^{1,2},
Л.Р. Тилова¹, Е.М. Жидкова², К.И. Кирсанов¹,
Е. Винокур³, Г.Е. Байда³, И.В. Будунова³,
М.Г. Якубовская¹, Е.А. Лесовая^{1,4}

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

²ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова»;

³North-Western University, Chicago, USA;

⁴ГБОУ ВПО «РязГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России

Глюкокортикоиды (ГК) широко используются при лечении гемобластозов, однако их длительное применение вызывает ряд серьезных осложнений. Глюкокортикоидный рецептор (ГКР) регулирует экспрессию генов по 2 механизмам: трансактивации и транскрепрессии. Транскрепрессия представляет собой белок-белковое взаимодействие ГКР с регуляторами пролиферации и апоптоза. В результате происходит подавление активности этих факторов и, следовательно, снижение жизнеспособности опухолевых клеток. Побочные эффекты ГК связывают с запуском трансактивации, которая реализуется посредством образования гомодимера ГКР и его взаимодействия с респонсивными элементами в промоторах и энхансерах пропролиферативных и антиапоптотических генов.

Показано, что ключевую роль в развитии побочных эффектов ГК играет ГК-зависимый белок REDD1, ингибитор белкового комплекса mTORC1. С помощью виртуального докинга протестировано около 1500 известных лекарственных препаратов — потенциальных ингибиторов REDD1. Четыре препарата были отобраны для тестирования *in vitro*. Наиболее значительное ингибирование REDD1 продемонстрировано на клеточных линиях СЕМ и лимфомы Granta для иммуномодулятора рапамицина. Показано значительное снижение базального и ГК-индуцированного уровня REDD1 после обработки клеток рапамицином, на уровне белка и на уровне мРНК. Рапамицин существенно подавлял фосфорилирование ГКР, его транслокацию в ядро, а также ГК-индуцированную активность люциферазы при проведении репортерного анализа с использованием плазмиды с множественными сайтами связыва-

ния ГКР в промоторной области. Экспрессия ГКР-зависимых генов была также подавлена. В то же время рапамицин усиливал транскрепрессорную функцию ГКР, что показано с помощью NF-κB-репортерного анализа и количественной полимеразной цепной реакции NF-κB-зависимых генов. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования комбинации рапамицина с ГК в химиотерапии гемобластозов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 13-04-01707 и № 15-04-04006) и фонда «Династия».

Математическое моделирование структурной организации лимфатического узла

Г.А. Бочаров¹, А.А. Кислицын^{1,2}, Р.С. Савинков^{1,2}

¹Институт вычислительной математики РАН, Москва;

²ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»

Метастазирование регионарных лимфатических узлов (ЛУ) является ключевым этапом в диссеминации опухолевых клеток для ряда вариантов злокачественных опухолей, таких как карцинома и меланома. Механизмы локального метастазирования опухолевых клеток в ЛУ и их роль в развитии системного метастазирования недостаточно изучены. Для исследования процессов популяционной динамики опухолевых клеток в ЛУ необходимо построение анатомически корректных и структурно содержательных моделей лимфатического узла. В докладе представлены исследования по разработке вычислительной модели геометрической структуры лимфатического узла. Применение современных технологий высокоразрешающей флуоресцентной микроскопии и антител для иммуногистохимической визуализации структур и клеток лимфоидных органов открыло новые возможности в построении на основе экспериментальных данных анатомически корректных геометрических моделей ЛУ. При моделировании трехмерной структуры лимфатического узла использовалось обобщенное построение его макроэлементов. ЛУ представляется как совокупность следующих компонентов: субкапсулярный синус, В-клеточные фолликулы, медуллярная область, сеть фибробластных ретикулярных клеток (ФРК), система кровеносных сосудов, включая высокоэндотелиальные вены. Использовались оригинальные данные, полученные от коллег (М. Novkovic, L. Onder) в Институте иммунобиологии Кантонального госпиталя г. Санкт-Галлен (Швейцария), о геометрических и топологических характеристиках следующих структурных элементов ЛУ: сети ФРК (распределение ФРК по числу связей между ними и длинам контактирующих выступов), В-клеточных фолликулов, субкапсулярного синуса. В результате проведенных исследований разработана твердотельная модель ЛУ (Kislitsyn A. et al.,

2015), которая будет использоваться для моделирования транспортных процессов в ЛУ, а также взаимодействия клеток в ходе развития иммунного ответа.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (грант № 14-31-00024).

Трихинеллы на службе у человека

В.А. Бритов

Первомайск, Нижегородская область

Проведены исследования по изучению лечебного воздействия молока, полученного от лактирующих животных (коров, коз), предварительно прошедших иммунизацию вакциной Бритова. Получены положительные результаты при употреблении молока пациентами, страдавшими различными хроническими болезнями, в том числе: туберкулез, язва желудка и двенадцатиперстной кишки, простатит, импотенция, рак различной локализации (III–IV стадии), меланома, импотенция и др. Все больные говорили об улучшении своего состояния после приема иммунизированного молока в течение 3–4 нед. Они упоминали о повышении активности, снижении или исчезновении болей, приливе сил, увеличении трудовых возможностей, уменьшении объема патологических очагов в органах и тканях.

Большим потенциалом лечебного воздействия обладает и сыворотка крови вакцинированных животных, а также кровь вакцинированных доноров.

Трихинеллы выделяют антигены, в ответ на которые восстанавливается функция клеточного иммунитета, и благодаря неспецифичности он защищает от всевозможных заболеваний, в том числе и от рака. Ведь рак является следствием иммунодефицита. Клеточный иммунитет многофакторный, в этом его особенность и сила. Поэтому крылатая фраза Р.В. Петрова: «Тот, кто научится лечить иммунодефицит, научится лечить рак», — воплощена в реальность.

Трихинеллы как биотерапевтический препарат по своему лечебному воздействию на организм человека превосходят пиявок, пчел и змеиный яд.

Молекулярные механизмы противоопухолевого действия новых антрафурандионов

Ю.Л. Володина¹, Л.Г. Деженкова², В.Б. Цветков³,
В.В. Татарский (мл.)¹, Д.Н. Калужный⁴, А.А. Калинина¹,
А.Е. Щекотихин², А.А. Штиль¹

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

²ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

³ФГБУН «Институт нефтехимического синтеза
им. А.В. Топчиева РАН», Москва;

⁴ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Производные антрахинона — один из важнейших классов современных противоопухолевых препаратов. Однако используемые в клинике антрациклиновые антибиотики (доксорубин, даунорубин и др.) менее эффективны при лечении опухолей, устойчивых к ряду химиопрепаратов. В НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе проводится многолетняя работа по оптимизации структуры гетероциклических производных антрахинона. Среди новой серии антрафурандионов стереоизомеры ЛХТА-2033 (производное (R) — 3-аминопирролидина, R-изомер) и ЛХТА-2034 (производное (S) — 3-аминопирролидина, S-изомер) показали высокую антипролиферативную активность на линиях опухолевых клеток разного тканевого и видового происхождения, в том числе сублиниях с экспрессией Р-гликопротеина и инактивацией проапоптотического белка p53 (Щекотихин А.Е. и др., Патент РФ № 2554939, 2015). Оба изомера не являются субстратами Р-гликопротеин-зависимого транспорта. В микромолярных концентрациях соединения вызывают задержку клеточного цикла в фазе G2/M и последующий апоптоз. Внутриклеточная мишень антрафурандионов — двухцепочечная ДНК, с которой соединения образуют стабильные интеркаляционные комплексы, регистрируемые спектрометрически и подтверждаемые молекулярным докингом. Оба соединения тормозят релаксацию суперскрученной ДНК, осуществляемую топоизомеразы I и II. ЛХТА-2034 ингибирует ряд серин-треониновых протеинкиназ. Таким образом, новые производные антрафурандионов перспективны как соединения-кандидаты для доклинических исследований.

Работа поддержана грантом Минпромторга России (госконтракт № 12411.1008799.13.007).

Анализ белков микровезикул плазмы крови больных немелкоклеточным раком легкого

С.А. Галецкий, А.Ю. Журавская, И.Б. Зборовская,
А.В. Комельков, М.С. Шогенов, Е.М. Чевкина

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

Введение. Работа посвящена анализу белкового состава секретируемых микровезикул в плазме крови больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). В исследование включена группа представителей семейства белков липидных микромонов, играющих важную роль в поддержании структуры липидной мембраны, включая флотиллины (Flot1 и Flot2) и кавеолин (Cav-1), роль которых в секреции микровезикул, в частности экзосом, показана ранее, а также белок стоматин (Stom-1), участие которого в данном процессе ранее не изучалось. Вторая группа белков включала RalA, RalB и Arf6, входящие в суперсемейство малых ГТФаз Ras и известные своим активным участием в различных процессах внутриклеточного везикулярного транспорта, однако практически не исследованные в аспекте секреции внеклеточных микровезикул. Кроме того, в анализ был включен белок сурвивин из семейства ингибиторов апоптоза, данные о возможном участии которого в исследуемом вопросе очень малочисленны и противоречивы.

Материалы и методы. Использовали замороженные препараты плазмы, ранее полученные из образцов периферической крови больных НМРЛ, проходивших лечение в НИИ клинической онкологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина, в том числе «парные» образцы, полученные до и после удаления первичной опухоли. Препараты выделяли с помощью серийного центрифугирования и ультрацентрифугирования (110 000g/3 ч). Полученный материал анализировали по стандартной методике вестерн-блот-гибридизации.

Результаты. Во всех препаратах микровезикулярной фракции плазмы крови регистрировался высокий уровень белка CD9 (маркера экзосом), при этом данный белок не детектировался в лизатах культивируемых клеток опухолей НМРЛ (негативный контроль). Исследована продукция ряда белков, возможное присутствие которых в составе экзосом было предположено на основе литературных данных. Определена группа белков, отсутствующих в экзосомах, включая Arf6, сурвивин и Cav-1. Показано, что белки Stom-1, Flot1 и Flot2, RalA и RalB конститутивно присутствуют в исследуемых образцах. Более того, при сравнении «парных» препаратов, полученных от одного и того же пациента, было обнаружено, что уровень белков Stom-1, Flot1 и Flot2, RalA и RalB в микровезикулярной фракции снижается после удаления первичного опухолевого узла. Важно отметить, что это снижение происходит параллельно с падением уровня CD9. Это

свидетельствует о том, что оно обусловлено, по-видимому, уменьшением общего количества секретируемых в кровь экзосом после хирургического лечения. Для подтверждения этого предположения в дальнейшем планируется увеличить выборку исследуемых образцов, а также провести количественный анализ изменения содержания экзосом и соотнести его результаты с изменением уровня исследуемых белков.

Выводы. Обнаружено, что белки липидных микроомов дифференциально представлены в микровезикулярной фракции образцов крови больных НМРЛ — перманентно присутствуют белки Stom-1, Flot1 и Flot2 и отсутствует белок Cav-1. Также впервые показано присутствие в составе секретируемых микровезикул малых ГТФаз RalA и RalB и отсутствие малой ГТФазы Arf6.

Разработка адресного терапевтического средства для лечения костных метастазов

С.Г. Гамалей, Е.Д. Даниленко, Г.М. Сысоева,
А.В. Батенева, Е.А. Волосникова, Г.М. Левагина

Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ
«Вектор», Бердск

Костные метастазы являются одним из часто встречающихся осложнений опухолевых заболеваний, таких как миеломная болезнь, рак молочной железы, предстательной железы и ряда других. Очевидно, что эффективный препарат для лечения костных метастазов, помимо высокой противоопухолевой активности и селективности воздействия на опухолевые клетки, должен обладать способностью ингибировать разрушение костной ткани, индуцированное опухолевым процессом, и инициировать ее восстановление. Кроме того, существенной проблемой, которую требуется решить в ходе разработки такого препарата, является способ доставки лекарственного вещества в патологический очаг кости.

Для решения этих задач мы использовали рекомбинантный фактор некроза опухоли альфа (ФНО- α) человека и аллендроновую кислоту. ФНО- α — белок-цитокин, обладающий прямым цитотоксическим и апоптогенным действием в отношении опухолевых клеток. Бисфосфонат аллендроновая кислота отличается высоким сродством к костной ткани, активирует процесс ремоделирования кости и, следовательно, может быть использована в качестве векторной молекулы и средства восстановления костной ткани.

Целью исследования являлась разработка метода получения препарата рекомбинантного ФНО- α человека, ковалентно связанного с аллендроновой кислотой, оценка его физико-химических и биологических свойств.

В ходе исследования разработан метод твердофазного синтеза конъюгата ФНО- α с аллендроновой

кислотой с использованием сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилата. Исследование конъюгата методами электрофореза, гель-хроматографии, иммуноферментного анализа и анализ его специфической активности свидетельствуют о том, что введение в структуру ФНО- α остатка аллендроновой кислоты не приводит к нарушению конформационных свойств белка и существенному снижению его биологической активности. ФНО- α в составе конъюгата отличается повышенной тропностью к костной ткани и опухолевой ткани костных метастазов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России, в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение о предоставлении субсидии № 14.604.21.0061; уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60414X0061).

Изменение иммунорфологического фенотипа рака прямой кишки под влиянием лучевой терапии с радиомодификацией вихревыми магнитными полями

И.Г. Гатауллин, А.В. Жинов, С.В. Городнов

ГБОУ ДПО КазГМА Минздрава России;
ГУЗ «Областной клинический онкологический диспансер»,
Ульяновск

Актуальность. Дальнейший прогресс в результатах лечения больных раком прямой кишки (РПК) связан с использованием комбинированного метода лечения с неoadъювантным компонентом.

Материалы и методы. Проведена оценка результатов лечения 123 больных РПК II–III стадии. Выделены 2 группы: 1-я ($n = 64$) — радикальная операция; 2-я ($n = 59$) — неoadъювантное лечение по 2 схемам: 30 пациентов получили предоперационную лучевую терапию средними фракциями, у 29 больных предоперационная лучевая терапия сочеталась с использованием магнитотерапии как радиомодифицирующего фактора. Иммуногистохимические исследования проведены с помощью набора моноклональных антител к белкам Ki-67, Bcl-2, p21, раково-эмбриональному антигену, Е-кадгерину, CD68, антигену CD45RO, CD95/Fas.

Результаты. При анализе широкого спектра биомаркеров РПК отмечен высокий уровень экспрессии раково-эмбрионального антигена и маркера клеточной пролиферации Ki-67. Отмечены слабая и умеренная положительная экспрессия CD68 и инфильтрация Т-лимфоцитами во всех случаях; слабopоложительная экспрессия p21 в половине наблюдений; слабopоло-

жительная экспрессия Е-кадгерина в 33,3 %; отрицательная реакция на Bcl-2 и CD95 во всех наблюдениях. Применение предоперационной лучевой терапии с радиомодификацией вихревыми магнитными полями изменяет иммуноморфологический фенотип РПК, что проявляется в снижении пролиферации опухоли (слабая активность Ki-67 в 100 %), уменьшении экспрессии p21 (отрицательная реакция в 100 %), усилении дифференцировки опухоли (экспрессия Е-кадгерина в 88,9 %) и повышении внутритканевого иммунитета (Т-клеточная инфильтрация в 88,9 %).

Заключение. Предоперационная лучевая терапия средними фракциями до суммарной очаговой дозы 25 Гр в сочетании с радиомодификацией вихревыми магнитными полями оказывает выраженное воздействие на структуру опухоли. Это проявляется в снижении ее пролиферативной активности, усилении дифференцировки и Т-клеточной инфильтрации опухоли.

Патч-кламп-спектроскопия как потенциальный инструмент диагностирования в молекулярной онкологии и анализе активности ионных каналов как вероятных молекулярных мишеней

О.В. Градов

ФГБУН «Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН», Москва

Известна корреляция между некоторыми молекулярно-онкологическими дескрипторами и состоянием ионных каналов. В частности, известны роли потенциал-зависимых ионных каналов в пролиферации, апоптозе, фармакологической резистентности раковых клеток. Обсуждается связь липидома и канала в механизмах канцерогенеза, а также функция каналомии хондриома в малигнизации и смежных процессах. Роль ионного транспорта в канцерогенезе прослеживается от инициальных до метастатических состояний, в связи с чем некоторые авторы рассматривают канцерогенез как патологию канала (channelopathy) (Litan A., Langhans S.A., 2015). Как следствие, возникают перспективы использования самих ионных каналов как молекулярных мишеней в терапии (в частности — иммунотерапии) рака (Arcangeli A., Becchetti A., 2015). На данный момент простейшими молекулярными мишенями такого рода являются калиевые каналы. Вполне очевидно, что необходимо создание средства контроля состояния молекулярных мишеней при внешних фармакологических и иных воздействиях, базирующегося на принципах функционирования ионных каналов. Использование методов локальной фиксации потенциала (patch-clamp, voltage-clamp), ча-

сто используемых в исследованиях на линиях раковых клеток, в случае перехода к мониторингу эффективности фармакохимических агентов (так называемой patch-clamp pharmacology) требует многофакторного анализа данных, так как система содержит много возможных источников специфического отклика. В настоящее время интерпретация вариаций экспрессии ионных каналов как онкологических маркеров и идеология каналомной верификации действия онкофармакологических препаратов в целом дают возможность подобного исследования при привязке отдельных дескрипторов (например, частот открытия каналов) к характерным особенностям действия фармакологических средств в базе данных. В связи с этим нами предлагается создание средств патч-кламп-спектроскопии, в которой с каждой из релевантных частот отклика можно сопоставить определенный молекулярно-биологический процесс (Градов О.В., 2015), и их использование как потенциального инструмента диагностики в молекулярной онкологии и анализа активности ионных каналов как вероятных молекулярных мишеней для подбора адекватных онкофармакологических средств (как комплементарный валидационный подход).

Изучение новых перспективных систем доставки противоопухолевых препаратов на основе наночастиц нитрида бора

И.Ю. Житняк¹, Н.А. Глушанкова^{1,2}, И.В. Сухорукова²,
А.М. Ковальский², А.Т. Матвеев², Д.В. Штанский²

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

²ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»

Современные исследования в области разработки высокоэффективных способов лечения онкологических заболеваний включают в себя такое важное и перспективное направление, как разработка систем доставки противоопухолевых препаратов. Использование наноносителей позволяет преодолеть ряд ограничений, присущих традиционным схемам лечения злокачественных новообразований химиотерапевтическими препаратами, решить одну из главных проблем при лечении онкологических заболеваний — множественную лекарственную устойчивость неопластических клеток, возникающую в результате опухолевой прогрессии. Кроме того, технологии, использующие наноматериалы, позволяют увеличить время циркуляции препарата в крови, что повышает фармацевтическую эффективность препарата, и позволяет значительно снизить его дозу и уменьшить побочные эффекты.

Нанотранспортеры на основе гексагонального нитрида бора являются одной из новейших и наиболее

перспективных систем доставки противоопухолевых препаратов в опухолевые клетки. Исследуя наночастицы нитрида бора с развитой поверхностью, мы обнаружили, что они эффективно насыщаются доксорубицином и поглощаются трансформированными эпителиальными клетками. Наночастицы нитрида бора сами по себе не имели токсического действия, а их наноконъюгаты с доксорубицином оказывали значительный цитотоксический эффект на трансформированные эпителиальные клетки. Был изучен pH-зависимый механизм высвобождения химиопрепарата доксорубицин из наноконъюгатов внутри клетки и определены условия стабильности наноконъюгатов вне клеток.

Актуальность данного исследования продиктована отсутствием на сегодняшний день универсального носителя лекарственного препарата, обладающего как высокой терапевтической эффективностью, так и биосовместимостью. Поэтому изучение нанотранспортеров на основе нитрида бора представляется перспективным направлением.

Теломеразные ингибиторы на основе модифицированных химерных олигонуклеотидов для разработки противоопухолевых препаратов и диагностики

М.Э. Зверева¹, Д.М. Ажибек^{1,2}, Д.А. Скворцов¹,
М.П. Рубцова¹, Т.С. Зацепин^{1,2}, О.А. Донцова^{1,3}

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

²Сколковский институт науки и технологий;

³НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»

Теломераза является сложным РНК-белковым комплексом и ключевым ферментом системы поддержания длины теломер, которая определяет пролиферативный потенциал клетки. В клетках многих типов опухолей человека происходит активация теломеразы, в то время как в соматических клетках активность теломеразы практически не обнаруживается. Ингибиторы теломеразы служат основой для разработки противоопухолевых препаратов. Мы использовали химерные олигонуклеотиды, которые имеют две олигонуклеотидные части, комплементарные разным функциональным областям теломеразной РНК. Эти части соединены ненуклеотидным линкером в различных ориентациях. Химеры ингибируют теломеразу в клетке в наномольных концентрациях, преимущественно за счет их влияния на сборку и димеризацию теломеразы (Azhibek D. et al., 2014). Сравнение эффективности химерных олигонуклеотидов с другими известными теломеразными ингибиторами этой природы показало

их преимущества, а анализ использования существующих теломеразных ингибиторов позволил определить их потенциальную пригодность для визуализации опухолевых клеток (Ажибек Д.М. и соавт., 2015). Обсуждается возможность применения химерных олигонуклеотидных теломеразных ингибиторов для визуализации опухолевых клеток и повышение эффективности их проникновения с помощью дополнительных модификаций.

Анализ возможности использования ингибиторов теломеразы олигонуклеотидной природы для разработки противоопухолевых препаратов и диагностики был проведен при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-24-00061).

Влияние К-21, К-23, К-26 и этопозида на активность нуклеиновых кислот, топоизомеразы II и экспрессию гена лекарственной устойчивости MDR1 интактных клеток саркомы 180

А.А. Ибрагимов, О. Касымов, З.М. Еникеева,
А.Ч. Абдирова, Н.Б. Юсупова

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) — это невосприимчивость клеток или организма к целому ряду лекарственных препаратов. Механизмы формирования МЛУ разные; известно, что в клетке включается сразу несколько механизмов (Ставровская А.А., 2000; Красильников М.А., 2000), такие как: активация ферментов системы глутатиона, активация трансмембранных транспортных белков, выводящих токсические вещества из клетки (например, Р-гликопротеина), изменения в системе генов и белков, которые осуществляют контроль за апоптозом и клеточной пролиферацией, усиление репарации лекарственно индуцированного повреждения ДНК, повреждение лекарственных мишеней (топоизомеразы II).

Целью исследования было изучение влияния новых производных трополоновых алкалоидов К-21, К-23 и К-26 на синтез нуклеиновых кислот, активность топоизомеразы II и экспрессию мышинного гена лекарственной устойчивости *MDR1* на опухоли саркома 180.

Материалы и методы. К суспензии клеток саркомы 180 в 96-луночных планшетах добавляли препараты в концентрации 9 (К-21), 20 (К-23) и 22 (К-26) мкг/мл и инкубировали 2 ч при 37 °С и 5 % CO₂ в CO₂-инкубаторе. Затем количество выделенных ДНК и РНК измеряли на СФ-26. Межнуклеосомную деградацию ДНК оценивали посредством электрофореза ДНК в 1,5 % агарозном геле. Из опухолевой ткани под воздействием каждого препарата получены тотальные препараты РНК,

затем методом обратной транскриптазы получены мРНК и синтезированы комплементарные ДНК (экспрессия *MDR1*/ОТ-ПЦР).

Результаты. На клетках саркомы 180 показана высокая активность ингибирования синтеза ДНК и РНК исследуемых препаратов: у К-26 — 90 и 96 %; у К-23 — 70 и 90 % и у К-21 — 70 и 80 % соответственно; этопозид ингибировал синтез ДНК и РНК на 75 и 85 %. Самый высокий процент межнуклеосомной деградации ДНК был у К-26 — 85 %, у К-23 — 75 %, у К-21 — 55 % (у этопозиды — 65 %). К-26 ингибировал топоизомеразу II на 80 %, К-23 — на 70 %, К-21 и этопозид — на 50 %. Под влиянием К-21, К-23 и К-26 наблюдается низкий уровень экспрессии гена *MDR1* — 15–20 % по сравнению с более высоким уровнем экспрессии этого гена (в пределах 35 %) под воздействием этопозиды.

Вывод. Противоопухолевые препараты К-21, К-23 и К-26 способствуют низкому уровню развития МЛУ, 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.

Кандидатный маркер 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
ФГБНУ Томский НИИ онкологии

Актуальность. Плоскоклеточный рак головы и шеи (ПРГШ) отличается долгим бессимптомным течением и высокой агрессивностью. Развитие ПРГШ в большом проценте случаев происходит на фоне диспластических изменений эпителия верхних дыхательных путей. Актуален поиск новых маркеров для ранней диагностики и прогноза течения этого заболевания.

Цель исследования — провести поиск кандидатных маркеров ранней диагностики и прогноза течения ПРГШ на основе протеомного анализа сыворотки крови больных ПРГШ.

Материалы и методы. Материалом для протеомного анализа явилась сыворотка крови 20 первичных больных ПРГШ (T1–4N0–3M0) и 10 здоровых добровольцев. Протеомный анализ осуществляли на базе института ТМЦ СО РАН (Новосибирск). Подтверждение результатов протеомного анализа проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) выбранного кандидатного маркера — аденилилциклаза-ассоциированного протеина 1 (CAP1) в сыворотке и ткани 46 первичных больных ПРГШ (T1–4N0–3M0), 12 пациентов с хроническим гиперпластическим ларингитом (ХГЛ)

и 15 здоровых добровольцев. Статистическую обработку выполняли с помощью программы Statistica 6.0.

Результаты. Протеомный анализ сыворотки крови всех исследуемых групп выявил различия белковых бэндов в диапазоне масс 10–150 кДа. Анализ и сопоставление результатов работы с данными литературы позволили выделить в качестве кандидатного маркера для ранней диагностики и прогноза течения ПРГШ CAP1. Изучение содержания CAP1 в сыворотке крови методом ИФА показало достоверные различия во всех группах ($p = 0,008$). Содержание сывороточного CAP1 в группе пациентов с ХГЛ было в 2 раза выше, чем в группах здоровых лиц и больных ПРГШ стадии T1N0M0 ($p \leq 0,05$). Рост первичной опухоли сопровождался увеличением содержания сывороточного CAP1 ($p \leq 0,05$). В группе больных ПРГШ с лимфогенными метастазами содержание CAP1 в сыворотке крови было выше в 6 раз ($p \leq 0,01$) по отношению к группе пациентов без метастазов. Анализ содержания CAP1 в опухолевой ткани показал более сложную зависимость уровня маркера от стадии заболевания. Обнаружено значительное повышение уровня CAP1 в опухолевой ткани ПРГШ на стадии заболевания T1N0M0 по сравнению с группой ХГЛ и на стадиях T3–4N0M0 по сравнению с группой T2N0M0.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования определения CAP1 в сыворотке крови как для ранней диагностики, так и для прогноза течения и прогрессирования ПРГШ. Увеличение тканевого содержания CAP1 в группе T1N0M0 по сравнению с группой больных ХГЛ может иметь важное значение для ранней диагностики ПРГШ.

Скрининг биологической активности новых препаратов, предположительно блокирующих взаимодействие p53–MDM2

М.А. Калинина¹, Д.А. Скворцов², Я.А. Иваненков^{2,3},
С.В. Василевский², А.Г. Мажуга², О.А. Донцова^{2,4}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики;

²химический факультет ФГБОУ ВО

«МГУ им. М.В. Ломоносова»;

³Московский физико-технический институт, Долгопрудный;

⁴НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО

«МГУ им. М.В. Ломоносова»

Онкосупрессор p53 вовлечен во многие клеточные процессы, такие как арест клеточного цикла, репарация ДНК, апоптоз, старение. В здоровых клетках количество p53 тонко регулируется и поддерживается на низком уровне, в то время как при стрессе оно резко возрастает. Это достигается в том числе за счет того, что в норме p53 взаимодействует со своим негативным регулятором — E3-убиквитинлигазой MDM2. Низко-

молекулярные органические соединения могут конкурировать с p53 за связывание с MDM2. **Целью работы** была разработка высокопроизводительной системы тестирования и оценка новых соединений спирооксипиридина ряда на предмет способности реактивировать p53.

Была создана автоматизированная тест-система для оценки активации p53 и клеточной токсичности на основе станции автопипетирования Janus, МТТ-теста и любезно предоставленной П.М. Чумаковым клеточной линии с репортерной системой, экспрессирующей галактозидазу в ответ на активацию p53. Возможно параллельное скринирование клеточной токсичности и активации p53 с производительностью до 50 препаратов в день.

Протестировано 60 соединений спиротиогидантоинового ряда, синтезированных на кафедре органической химии химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, для части из которых ранее было предсказано сродство к связыванию с MDM2 молекулярным докингом (Ivanenkov Y.A. et al., 2015). Три спиротиогидантоиновых производных (s400-0026, s400-0038 и NB-169) оказались активаторами p53. При этом действующая концентрация (приводящая к увеличению активности p53-зависимого репортера в 2 и более раз) всех лидерных соединений составила 27 мкМ, в то время как 50 % клеточная токсичность (IC₅₀) не достигалась даже при 133 мкМ. В результате анализа структуры этих соединений предложен ряд дальнейших направленных модификаций для усиления активирования p53.

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

Экспрессия рецептора факторов роста эндотелия сосудов VEGFR3 в популяциях клеток множественной миеломы, различающихся по CD138: корреляции с прогнозом

**А.Ф. Карамышева, М.Н. Костюкова,
И.В. Буравцова, Н.Н. Тупицын**

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

Сигнальные системы, связанные с факторами роста эндотелия сосудов, играют важную роль в неоангиогенезе солидных опухолей. Менее исследована роль этих систем в развитии гемобластозов, в том числе множественной миеломы (ММ). В отличие от многих солидных опухолей, в которых одним из важных показателей неоангиогенеза является экспрессия VEGFR2 (KDR) — основного рецептора фактора роста VEGF-A, в плазматических клетках ММ этот рецептор экспрессирован редко. Наиболее активно в плазмочитах ММ

экспрессирован рецептор VEGFR3 и, соответственно, связанная с ним сигнальная система VEGF-C, -D/VEGFR3. Вместе с тем при исследовании экспрессии мРНК *VEGFC*, *VEGFD* и *VEGFR3* в мононуклеарной фракции аспиратов костного мозга больных ММ была выявлена группа пациентов, у которых экспрессия *VEGFR3* отсутствовала. Общая выживаемость в этой группе оказалась меньшей, чем у больных с коэкспрессией *VEGFC*, *VEGFD* и *VEGFR3* (медианы выживаемости составили соответственно 24 и 38 мес). Анализ плазматических клеток больных ММ с помощью проточной цитометрии показал, что *VEGFR3* активно экспрессируется в популяции CD138-положительных клеток и полностью отсутствует в клетках, негативных по CD138. Полученные нами данные о различиях в выживаемости больных ММ, различающихся по экспрессии мРНК *VEGFR3* и связанных с этим рецептором факторов роста, а также данные о корреляции экспрессии VEGFR3 и одного из основных маркеров плазматических клеток CD138 указывают на необходимость учета CD138-отрицательных клеток при анализе больных ММ.

МикроРНК и малые интерферирующие РНК – функционирование в опухоли и использование для разработки биомаркеров и средств терапии рака

**А.В. Карпунин¹, А.А. Алимов¹, А.А. Коротаева¹,
А.Ю. Кузванова¹, В.А. Хайленко², Т.А. Музаффарова¹,
Н.И. Поспехова¹, К.А. Музыкина¹, Е.Г. Зенит-Журавлева¹**

¹ФГБНУ МГНЦ, Москва;

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

Рассмотрены характеристики микроРНК и малых интерферирующих РНК (миРНК), особенности их функционирования в клетках злокачественных опухолей. Как и микроРНК, миРНК относятся к классу коротких не кодирующих белок РНК, имеют сходные с микроРНК размеры и биогенез. Коренное отличие заключается в высокой специфичности взаимодействия миРНК с мРНК гена-мишени, которое приводит к ее деградации. Это свойство обусловило использование искусственно синтезированных миРНК для изучения функционального значения генов и развития новых средств терапии. Пока не в полной мере охарактеризована картина функционирования микроРНК, их взаимодействия с генами, в том числе в клинически различных образцах опухоли одной локализации. В последнее время внимание исследователей все больше обращается к «неканоническим» формам функционирования микроРНК.

В экспериментальной работе проанализирована экспрессия набора микроРНК и генов, участвующих в прогрессии рака молочной железы (РМЖ). Результаты указывают на преобладание ко-транскрипционных процессов микроРНК и генов в опухолях молочной железы. Выявлено различие процессов, в которые вовлечены разные по характеру связи с экспрессией генов группы микроРНК при РМЖ, что может отражать функциональное значение ко-корреляции экспрессии микроРНК и генов. Найдены различия взаимодействия микроРНК и генов при метастатическом и неметастатическом РМЖ.

Проведено исследование по выявлению перспективных с точки зрения терапевтического эффекта генов-мишеней микроРНК для ингибирования их функции. Получены данные по функциональным характеристикам изучаемых генов в раковых клетках. Выявлены гены, блокирование которых с помощью микроРНК позволяет достичь эффективного действия химиопрепарата при дозах приблизительно в 15 раз меньше стандартных или увеличить эффект низкой дозы примерно на порядок.

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 14-04-32074.

Экспрессия гена *BCR-ABL* при миелопролиферативных заболеваниях

Л.А. Кесаева, А.В. Мисюрин, В.А. Мисюрин,
Ю.П. Финашуткина, В.В. Тихонова, Н.А. Лыжко,
И.Н. Солдатов, А.А. Крутов

ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва

Введение. Значимым этапом в понимании молекулярного патогенеза миелопролиферативных заболеваний (МПЗ) стало обнаружение мутации *JAK2V617F*, делеции в 12-м экзоне гена *JAK2*, мутации *MPL W515L/K* и открытых позднее мутаций в гене *CALR*. Тем не менее остаются вопросы, касающиеся молекулярного механизма, лежащего в основе прогрессирования этой группы заболеваний. Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) относится к группе МПЗ. Мутации генов *JAK2* затрагивают регуляторные пути, зависящие от тирозинкиназной активности. Известные на сегодняшний день молекулярные механизмы патогенеза данной группы заболеваний связаны с гиперактивацией тирозинкиназ. Расшифровка этих механизмов началась с выявления при ХМЛ патогенетической роли химерного гена *BCR-ABL*, обладающего аномальной тирозинкиназной активностью. Мы предположили, что появление экспрессии гена *BCR-ABL* у больных МПЗ может свидетельствовать о прогрессии данных заболеваний.

Цель работы — изучение экспрессии гена *BCR-ABL* у больных МПЗ с явными признаками прогрессии,

которые проявлялись в недостаточном ответе на проводимую терапию, гепатоспленомегалии, высоких показателях при проведении морфологического анализа крови, а также выраженном миелофиброзе.

Материалы и методы. Качественное и количественное определение гена *BCR-ABL* (типы транскриптов p190, p210, p230) проводили с помощью двустадийной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в реальном времени; определение мутаций *JAK2*, *JAK-e12*, *MPL* — с помощью прямого секвенирования, аллель-специфичной ПЦР. В качестве биологического материала использовали кровь и костный мозг.

Результаты и обсуждение. Проанализированы 175 больных МПЗ с признаками прогрессии: 35 (20 %) — истинная полицитемия (ИП), 38 (22 %) — эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), 102 (58 %) — идиопатический миелофиброз (ИМФ). Экспрессия гена *BCR-ABL* выявлена у 47 (27 %) из 175 больных МПЗ: в 44 случаях — *BCR-ABL* (p210), в 3 — *BCR-ABL* (p190); *BCR-ABL* (p230) найден не был. Мутация *JAK2V617F* обнаружена у 139 пациентов, делеции в 12-м экзоне гена *JAK2* — у 2, мутация *MPL W515L* — в 1 случае.

В группе первичных больных МПЗ ($n = 67$; 26 (47 %) — ИП, 21 (38 %) — ЭТ, 8 (15 %) — ИМФ) мутация *JAK2V617F* была найдена в 55 (82 %) случаях; экспрессия гена *BCR-ABL* (p210) выявлена только у 2 (3,6 %) из 55 пациентов.

Таким образом, экспрессия гена *BCR-ABL* (p210) у больных МПЗ с признаками прогрессии — явление достаточно частое (27 %; $p = 0,0002$).

Оценка позднего эффекта воздействия фотемустина на клетки глиобластомы T98G

Л.Н. Киселева, А.В. Карташев, Н.Л. Вартанян,
М.П. Самойлович

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

Целью исследования была оценка поздних эффектов воздействия фотемустина, производного нитрозомочевина, на клетки мультиформной глиобластомы линии T98G.

Клеточную культуру T98G в логарифмической фазе роста инкубировали в течение 1 ч в среде, содержащей фотемустин в концентрациях 100–750 мкг/мл. После удаления препарата каждые 2–3 дня проводили замену ростовой среды. Клетки, возобновившие пролиферацию после первого действия препарата, пересевали, а затем повторно инкубировали с фотемустином. В течение 1,5 мес оценивали состояние клеточных культур, определяли дозы фотемустина, вызывающие прекращение пролиферации. Через 16–30 дней после инкубации в клетках определяли экспрессию генов ростовых факторов.

Первичное воздействие фотемустина в концентрации от 200 мкг/мл и выше останавливало пролиферацию клеток, в культуре оставались переживающие клетки, которые сохраняли жизнеспособность более 1,5 мес. После инкубации клеток с фотемустинном в концентрации 100 мкг/мл оставалась популяция резистентных, возобновлявших пролиферацию клеток. Резистентные клетки сохраняли способность к пролиферации после повторной обработки фотемустинном в концентрации 300 мкг/мл. При увеличении его концентрации до 400 мкг/мл в культуре оставались только переживающие клетки. После инкубации с фотемустинном в клетках была многократно увеличена экспрессия генов *TNC*, *FAP*, *HGF* и *FGF-2* (b). Уровень экспрессии названных генов находился в прямой зависимости от концентрации фотемустина, как после первичного, так и после повторного воздействия препарата. В переживающих клетках, сохранившихся после воздействия 400 мкг/мл фотемустина, экспрессия этих генов была выше, чем в пролиферирующих клетках после его действия в концентрациях 100 или 200 мкг/мл.

В результате исследования одно- и двукратного действия фотемустина на культивируемые клетки линии T98G было установлено, что: 1) популяция мультиформной глиобластомы гетерогенна и включает клетки, которые прекращают пролиферацию, но длительное время остаются жизнеспособными, а также резистентные клетки, которые возобновляют пролиферацию; 2) каждая обработка клеток фотемустинном приводит к возрастанию их резистентности к следующему действию препарата; 3) как пролиферирующие, так и переживающие клетки экспрессируют гены ростовых факторов, при этом уровень их экспрессии находится в прямой зависимости от концентрации фотемустина.

Соотношение факторов активации лимфоцитов и показателей апоптоза в периферической крови больных с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями III степени и микроинвазивным раком шейки матки

П. И. Ковчур, Л. И. Белова,
О. В. Курмышкина, Т. О. Волкова

ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

Рак шейки матки (РШМ) развивается как результат вируса папилломы человека (ВПЧ) и сопровождается активацией иммунных механизмов. Выяснение изменений между процессами активации и подавления Т-клеточного звена иммунитета может определять

риск развития РШМ и тактику дальнейшей комплексной терапии.

Материалы и методы. Изучали уровень экспрессии CD95 и активности каспаз, содержание регуляторных Т-клеток в крови больных с ВПЧ, цервикальными интраэпителиальными неоплазиями (ЦИН) и ранними стадиями РШМ. Исследованы образцы периферической крови 155 пациенток с ДНК ВПЧ (95,6 %), в том числе 110 — с ЦИН III степени и 45 — с плоскоклеточным РШМ IA1 стадии. Контрольную группу составили 30 здоровых женщин (без ВПЧ и патологии шейки матки). Иммунофенотипирование лимфоцитов крови проводили методом проточной цитофлуориметрии; определение активности каспаз-3, -6, -8 и -9 — спектрофлуориметрическим методом с использованием AFC-меченных тетрапептидных субстратов (BioRad, США).

Результаты. Проанализирована численность лимфоцитов с фенотипами CD95⁺, CD3⁺95^{+/high}, CD3⁺4⁺95^{+/high}, CD3⁺8⁺95^{+/high}. Выявлено повышение экспрессии CD95 в суммарной фракции лимфоцитов крови больных ЦИН и микроинвазивным РШМ ($p < 0,05$) и увеличение CD3⁺95^{+/high} Т-клеток (эффекторов) и CD3⁺4⁺95^{+/high} Т-хелперов ($p < 0,05$), в сравнении с группой контроля. В популяции Т-киллеров изменений не выявлено. Количество CD25-позитивных Т-лимфоцитов в крови больных было выше ($p < 0,05$); их идентифицировали по фенотипам CD4⁺25^{+/high} и CD4⁺25⁺127^{dim/neg}FoxP3⁺ ($p < 0,05$). Обнаружено увеличение активности CD95-регулируемой каспазы-8 и эффекторной каспазы-3 в лимфоцитарной фракции больных ЦИН и РШМ. Увеличение активности каспазы-6 наблюдали в 25 % случаев ЦИН и в большинстве случаев РШМ IA1 стадии. Для каспазы-9 показано снижение активности.

Выводы. Развитие РШМ на самых ранних этапах сопровождается увеличением экспрессии активационных Т-маркеров и одновременным повышением уровня апоптоза лимфоцитов и численности регуляторных Т-клеток.

Работа выполнена при поддержке грантов № НК-1404-32098 (РФФИ), № 11.G34.31.0052 (Постановление 220), Программы стратегического развития ПетрГУ на 2012–2016 гг. и госзадания в сфере научной деятельности № 1713.

Фенотипические особенности лимфоцитов периферической крови у больных преинвазивным раком шейки матки

П.И. Ковчур, Л.И. Белова, О.В. Курмышкина, Т.О. Волкова
ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

Изучение показателей клеточного иммунитета служит для оценки иммунного статуса пациентки, определения индивидуальных рисков и оптимизации методов лечения. **Цель работы** — изучить изменения содержания регуляторных CD4⁺/8⁺-Т-лимфоцитов, субпопуляций естественных киллеров (ЕК), ЕК-Т-лимфоцитов в периферической крови пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями III степени (ЦИН 3) в сравнении с группой здоровых доноров.

Материалы и методы. Изучены образцы крови 35 пациенток с ЦИН 3 (100 % — с ДНК ВПЧ) в сравнении с образцами крови здоровых женщин (без ВПЧ и патологии шейки матки). Иммунофенотипирование лимфоцитов крови проводилось методом проточной цитофлуориметрии на приборе MACSQuant (Германия): CD3⁺ (Т-лимфоциты), CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперы), CD3⁺CD8⁺ (Т-киллеры), CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/neg}, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (регуляторные Т-хелперы), CD8⁺CD25⁺, CD8⁺CD25⁺CD127^{dim/neg}, CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ (регуляторные Т-киллеры), CD3⁺CD16⁺, CD3⁺CD56⁺, CD3⁺(CD16⁺/-)CD56^{bright}, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD16^{low/neg}CD56⁺ (субпопуляции ЕК-клеток), CD3⁺CD56⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (ЕК-Т-лимфоциты).

Результаты. В крови больных с ЦИН 3 достоверно повышается численность CD4⁺CD25⁺-лимфоцитов, в том числе фракций CD4⁺CD25^{high} и CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/neg}, относительно группы контроля. Численность CD4⁺FoxP3⁺-лимфоцитов достоверно не различалась. Отмечена тенденция к повышению численности регуляторных CD8⁺-Т-клеток (CD8⁺CD25⁺CD127^{dim/neg}FoxP3⁺) в группе ЦИН 3. Достоверных изменений в содержании цитотоксических ЕК и других функциональных групп ЕК-клеток при ЦИН 3 обнаружено не было, в то же время установлено увеличение численности ЕК-Т-лимфоцитов. Общая численность CD3⁺CD4⁺ (Т-хелперов) и CD3⁺CD8⁺ (Т-киллеров) была сопоставима между анализируемыми группами.

Выводы. Развитие РШМ на самых ранних этапах сопровождается увеличением численности регуляторных Т-лимфоцитов и ЕК-Т-клеток, обладающих иммуносупрессорными свойствами.

Работа выполнена при поддержке грантов
№ НК-1404-32098 (РФФИ), № 11.G34.31.0052
(Постановление 220),

Программы стратегического развития ПетрГУ
на 2012–2016 гг. и госзадания на НИР.

Экспрессия генов раннего ответа в опухолевой ткани при развитии цервикальных интраэпителиальных неоплазий и рака шейки матки

П.И. Ковчур, О.В. Курмышкина, Л.Л. Белова, Т.О. Волкова
ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

Перспективными маркерами и мишенями ранних стадий развития рака шейки матки (РШМ) являются транскрипционные факторы c-Myc, c-Fos и c-Jun, входящие в состав генома человека — генов раннего ответа. Гены *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* рассматривают как протоонкогены, и изменение их экспрессии является одним из центральных событий канцерогенеза. **Цель исследования** — изучить экспрессию генов *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* в опухолевой ткани больных РШМ в зависимости от степени тяжести процесса.

Материалы и методы. Экспрессию генов анализировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, идентификацию белков проводили вестерн-блоттингом с использованием мышиных моноклональных антител. Обследованы 130 пациенток в возрасте от 20 до 69 лет (средний возраст — 45,3 ± 3,2 года): 55 — с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями III степени (ЦИН 3) (дисплазия тяжелой степени — 25, карцинома *in situ* — 30), 30 — с РШМ I стадии, 25 — II стадии, 20 — III–IV стадии. Контролем служили 30 здоровых женщин (без вируса папилломы человека и патологии шейки матки).

Результаты. Выявлены достоверные изменения экспрессии в опухолевой ткани для гена *c-fos*. Увеличение уровня экспрессии мРНК данного гена наблюдалось в 50 % образцов ткани ЦИН 3 и 100 % образцов микроинвазивного РШМ в сравнении с образцами нормального эпителия и резко увеличивалось в образцах РШМ III–IV стадии. Индукция экспрессии мРНК гена *c-myc* наблюдалась в 55 % случаев РШМ IA стадии; в 45 % образцов РШМ IA стадии отмечено незначительное подавление экспрессии *c-myc*. В 70 % образцов ЦИН 3 отсутствовали изменения уровня мРНК *c-myc* в сравнении с соответствующим контролем. Начиная с I стадии РШМ и далее наблюдается резкое повышение экспрессии *c-myc*. Для гена *c-jun* выявлена активация экспрессии мРНК при ЦИН 3 и РШМ I–IV стадий, но в значительно меньшей степени ($p > 0,05$). Результаты блот-анализа уровня экспрессии *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* при ЦИН 3 и микроинвазивном РШМ подтверждают результаты оценки экспрессии мРНК этих генов.

Выводы. Гены *c-myc*, *c-fos* и *c-jun* определяют индивидуальный профиль их экспрессии при развитии РШМ и могут рассматриваться в качестве дополнительного диагностического маркера, что имеет значение при выборе тактики лечения.

Работа выполнена при поддержке грантов
№ НК-1404-32098 (РФФИ), № 11.G34.31.0052

(Постановление 220), Программы стратегического развития ПетрГУ на 2012–2016 гг. и госзадания в сфере научной деятельности № 1713.

Молекулярно-генетические и иммунологические особенности преинвазивного и микроинвазивного рака шейки матки до и после лечения

П.И. Ковчур, О.В. Курмышкина, Л.Л. Белова, Т.О. Волкова

ФГБОУ ВПО «Петрозаводский государственный университет»

Развитие рака шейки матки в каждом индивидуальном случае определяется молекулярно-генетическим профилем опухоли и возможностями иммунной системы элиминировать вирус-инфицированные и злокачественно перерожденные клетки. Цель исследования — оценить экспрессию лимфоцитарных маркеров CD3, CD4, CD4⁺CD25⁺, CD8, CD16, CD95 и предрасположенности их к апоптозу по уровню экспрессии генов каспаз-3, -6, -8, -9 в клетках цервикального эпителия и лейкоцитах крови у пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями III степени (ЦИН 3) и микроинвазивным раком шейки матки (РШМ) до и через 1 и 3 мес после лечения.

Материалы и методы. Выделено 3 группы. В основную вошли 120 пациенток: 75 — с ЦИН 3 (средний возраст $32,9 \pm 7,4$ года) и 45 — с РШМ IA1 стадии (средний возраст $31,3 \pm 6,0$ года) с выявленной ДНК вируса папилломы человека (ВПЧ) в 95,6 %. В этой группе проведено хирургическое и вторым этапом — иммуномодулирующее лечение (Аллокин-альфа 1,0 мг 6 раз через день подкожно). Контрольную группу 1 составили 30 больных с ЦИН 3 и РШМ IA1 стадии, которым проводилось только хирургическое лечение (с ДНК ВПЧ в 100 %); контрольную группу 2 — 45 здоровых женщин (без ВПЧ и без патологии шейки матки).

Результаты. Показано, что при комплексном лечении в течение 3 мес происходит более эффективная нормализация численности НК-клеток, В-лимфоцитов, популяции Т-хелперов, регуляторных Т-клеток, супрессорного цитокина TGF- β 1 и FOXP3 в циркулирующих лимфоцитах в сравнении с только хирургическим лечением. Показано восстановление уровня экспрессии CD95 ($p < 0,05$) и активности каспаз-3, -6, -8 и -9 в циркулирующих лимфоцитах больных ЦИН 3 и микроинвазивным РШМ ($p < 0,05$). Отмечено снижение ВПЧ-позитивных пациенток в основной группе (1,7 %) и отсутствие онкобелка E7 в сравнении с контролем ($p < 0,01$). В контрольной группе 1 зафиксирована тенденция к постепенному восстановлению нормальных значений показателей клеточного иммунитета в течение 3 мес. Использование в монотерапии иммуно-

модулирующего препарата без хирургического компонента у больных с преинвазивным РШМ не приводило к изменению уровня экспрессии TGF- β 1 и FOXP3.

Выводы. Обоснована целесообразность применения иммунологических и молекулярно-генетических исследований в комплексной диагностике, оценке результатов лечения и мониторинге больных с РШМ.

Работа выполнена при поддержке грантов № НК-1404-32098 (РФФИ), № 11.G34.31.0052 (Постановление 220), Программы стратегического развития ПетрГУ на 2012–2016 гг. и госзадания в сфере научной деятельности № 1713.

Молекулярные маркеры в диагностике рака щитовидной железы

Н.Н. Колесников¹, С.Е. Титов^{1,2}, Е.С. Малахина³, Т.Л. Полоз⁴, М.К. Иванов², Л.Г. Ахмерова¹, Ю.А. Верякина¹, С.П. Шевченко⁵, П.С. Деменков⁶, А.В. Малек⁷, И.Ф. Жимулев¹

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

²ЗАО «Вектор-Бест», Кольцово;

³ИХБФМ СО РАН, Новосибирск;

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

⁵МБУЗ «Городская клиническая больница № 1», Новосибирск;

⁶Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск;

⁷ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Разработка подходов и поиск молекулярных маркеров для ранней и дифференциальной диагностики новообразований щитовидной железы составляет суть наших исследований. В работе использованы технологические платформы: Q-RT-PCR, Nanostring, ddPCR. Ранее нами была показана принципиальная возможность использования микроРНК и соматических мутаций *BRAF* и *RET/PTC* в качестве молекулярных маркеров (патент РФ № 2548773, приоритет от 17.02.2014) на операционном материале. В настоящей работе мы разработали подход экстракции нуклеиновых кислот (РНК и ДНК) с материала уже проанализированных цитологических препаратов, полученных после тонкоигльной аспирационной биопсии (ТАБ). Это позволило с одного препарата получить цитологический анализ, провести тестирование профиля экспрессии специфических микроРНК и тест на наличие/отсутствие соматических мутаций генов *BRAF*, *RET/PTC*, анализ экспрессии онкогена *HMGA2*. Подобный анализ увеличил вероятность выявления папиллярной карциномы до 99,9 %, позволил дифференцировать ее от медуллярной карциномы. Несомненными преимуществами предлагаемого подхода являются отсутствие дополнительных затрат на взятие биологическо-

го материала, возможность сопоставления заключения цитологического исследования с результатами молекулярного анализа и, как следствие, более полная информация о характере узлового образования, повышение точности ТАБ как метода диагностики новообразований щитовидной железы и определения более обоснованной тактики ведения больного на дооперационном этапе.

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

Механизмы гибели клеток хронического миелоидного лейкоза при действии PF-114, нового ингибитора тирозинкиназы BCR-ABL

Е.С. Колотова¹, В.В. Татарский (мл.)¹, А.А. Зейфман^{2,3},
О.В. Строганов^{2,3}, В.С. Стройлов^{2,3}, И.Ю. Титов^{2,3},
Ф.Н. Новиков^{2,3}, А.А. Калинина¹, Г.Г. Чиров², А.А. Штиль¹

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

²ФГБУН «Институт органической химии

им. Н.Д. Зелинского РАН», Москва;

³ООО «Фьюжн Фарма», Москва

Одна из проблем лечения больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ) — мутации в химерной тирозинкиназе BCR-ABL, обуславливающие резистентность к ингибиторам I–II поколений. Разработанный нами ингибитор BCR-ABL III поколения PF-114 в доклинических исследованиях показал эффективность при ХМЛ с наиболее частой мутацией T315I и существенно более селективное ингибирование протеинкиназ по сравнению с одобренным FDA понатинобом, а также повышенную безопасность.

Соединение PF-114 высокоактивно для BCR-ABL⁺-клеток: гибель клеток линии K562 отмечена при действии наномолярных или даже субнаномолярных концентраций PF-114. Напротив, для BCR-ABL-негативных лейкозов PF-114 значительно менее активен. Изучение зависимости гибели клеток K562 от времени инкубации с PF-114 показало, что цитотоксический эффект развивается относительно медленно: через 72 ч сохраняется примерно 30 % жизнеспособных клеток. Гибель всей популяции наступает через 4–5 сут; этому предшествует задержка клеточного цикла в фазе G1. Важнейшим субстратом фосфорилирования BCR-ABL является адаптерный белок CrkL, контролирующий передачу внутриклеточных сигналов. Результаты проточной цитофлуориметрии показали, что после инкубации клеток K562 с PF-114 в течение 2 ч относительное содержание клеток с фос-

форилированным CrkL снижалось с увеличением концентрации соединения. Однако цитотоксический эффект проявляется при более низких концентрациях PF-114, чем требуемые для ингибирования фосфорилирования CrkL. Методом иммуноблоттинга определено влияние PF-114 на активацию каспаз-3 и -9, а также расщепление поли(АДФ-рибоза)полимеразы. Действие PF-114 сопровождается изменениями фосфорилирования белков семейства STAT и митоген-активируемых протеинкиназ. Таким образом, высокая специфичность к патогенетически важной внутриклеточной мишени, преимущественная токсичность для клеток ХМЛ, способность подавлять мутантные формы BCR-ABL, а также благоприятные фармакологические характеристики обуславливают перспективность создания нового препарата для лечения ХМЛ на основе соединения PF-114.

Система детекции минимальной остаточной болезни при онкогематологических заболеваниях человека на основе технологий массированного секвенирования

А.Ю. Комков, А.А. Минервина, В.И. Назаров,
И.З. Мамедов, Ю.Б. Лебедев

ФГБУН «Институт биоорганической химии

им. акад. М.М. Шемякина

и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Минимальная остаточная болезнь (МОБ) является одним из основных показателей эффективности терапии онкогематологических заболеваний. Наиболее чувствительными системами для анализа МОБ в настоящее время являются системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Однако ввиду трудоемкости дизайна клон-специфических флуоресцентных проб, а также неуниверсальности протокола анализа эти системы требуют существенных затрат времени, что в условиях терапии быстроразвивающихся заболеваний имеет критическое значение. Альтернативой ПЦР в реальном времени являются технологии массированного секвенирования (NGS), которые позволяют не только удешевить и стандартизировать процедуру диагностики МОБ, но также повысить чувствительность и точность анализа. Настоящее исследование направлено на разработку системы высокочувствительной диагностики МОБ при онкогематологических заболеваниях на основе технологий NGS. Данная система предполагает проведение 3-ступенчатого анализа: 1) поиск маркеров опухолевых клеток; 2) проверка информативности выявленных маркеров; 3) количественный анализ представленности

опухолевого клона среди нормальных клеток костного мозга после терапии. Поиск маркеров опухолевого клона проводится в ДНК костного мозга до терапии в ходе мультиплексных ПЦР локусов Т- и В-клеточных рецепторов с последующим секвенированием ПЦР-продуктов по Сэнгеру для установления полной структуры V(D)J-перестроек. После статистической проверки наиболее информативные V(D)J-перестройки используются для количественного анализа оставшегося опухолевого клона. Методический подход для этого анализа базируется на секвенировании на платформе Illumina локусов Т- и В-клеточных рецепторов (имеющих соответствующие V- и J-гены) в ДНК костного мозга после терапии. При этом на стадии пробоподготовки в анализируемые фрагменты ДНК вводятся случайные нуклеотидные последовательности. В результате каждая целевая молекула из каждой клетки получает уникальный молекулярный идентификатор, подсчет которых после NGS дает возможность отсеять все шумы и точно оценить размер опухолевого клона в анализируемом образце.

Работа поддержана Минобрнауки России (грант № RFMEFI60414X0118).

Разработка технологии персонализированного назначения неоадъювантной химиотерапии больным раком молочной железы

Н.В. Литвяков^{1,2}, П.В. Казанцева¹, М.М. Цыганов^{1,2},
Е.М. Слонимская¹, Н.В. Чердынцева^{1,2}

¹ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Цель — разработать технологию персонализированного назначения больным раком молочной железы (РМЖ) неоадъювантной химиотерапии (НАХТ) для повышения ее эффективности.

Материалы и методы. На 1-м, ретроспективном этапе было обследовано 68 больных РМЖ (лечившихся в 2006–2010 гг.), которым проводили НАХТ по схемам FAC, CAH или таксотер. Эффективность НАХТ оценивали по критериям ВОЗ. ДНК и РНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани до лечения. Микроматричный анализ CNV (Copy Number Variation) проводили на ДНК-чипах CytoScan™ HD Array (Affymetrix, USA). С помощью количественной полимеразной цепной реакции оценивали экспрессию ABC-транспортеров и генов монорезистентности. На 2-м этапе клинически валидировали разработанную технологию. Проспективную группу составили 34 пациента с люминальным В РМЖ, которым НАХТ персонализированно назначалась по результатам микроматричного анализа ДНК биопсийного материала опухоли до лечения.

Результаты. На 1-м этапе исследования были идентифицированы маркеры ожидаемой эффективности НАХТ, которые позволяют определить целесообразность ее проведения, а также маркеры ответа опухоли на отдельные химиопрепараты. При делеции хотя бы одного из локусов генов ABC (*ABCB5* — 3q27, *ABCG2* — 4q22.1, *ABCB3* — 6p21.32, *ABCB1* — 7q21.1, *ABCC1* — 16p11.2, *MVP* — 16p13.1) не формировался фенотип лекарственной устойчивости и отмечался 85–100 % эффект НАХТ. Больные с CNV локусов 1q43, 11q22.1–23.3 или 18p11.21 отвечали, а у пациентов с нормальным состоянием этих локусов отсутствовал ответ на НАХТ ($p = 0,000005–0,0004$). Амплификация локуса гена *TOP2A* — 17q21.2 обуславливала ответ на антрациклины. Делеция локуса гена *TUBB3* — 16q24.3 определяла ответ на таксотер у 67 % пациентов. Делеция локуса гена *BRCA1* — 17q21.31 в опухоли молочной железы отмечалась у 37 % больных, и они хорошо отвечали на FAC и CAH (75 %), но не на таксотер. Делеция локуса гена *TYMS* — 18p11.32 в 100 % случаев была сопряжена с ответом на кселоду (CAH) и в 88 % — на фторурацил (FAC). На основе этих данных была разработана технология персонализированного назначения НАХТ больным РМЖ. До начала НАХТ проводят микроматричное исследование ДНК биопсийного материала для определения выявленных маркеров ожидаемой эффективности НАХТ, и при наличии хотя бы одного из маркеров пациенты начинают лечение с курсов НАХТ (в противном случае назначается операция), схема НАХТ также подбирается индивидуально. При амплификации гена *TOP2A* назначаются антрациклины (FAC или CAH), а таксаны противопоказаны. При делеции *TYMS* назначается CAH, а не FAC. При делеции *TUBB3* назначаются таксаны, при амплификации *HER2* — герцептин, при делеции *BRCA1* — препараты платины, а таксаны противопоказаны. По результатам клинической валидации эффективность НАХТ в группе с персонализированным назначением составила 88 % против 45 % в группе исторического контроля.

Работа поддержана РФФИ (грант № 15-04-03091).

Нарушение частоты генов AURKA и TP53 у больных местно-распространенным раком желудка

Г.Ф. Михайлова, В.В. Цепенко,
В.Ю. Скоропад, С.А. Мозеров

МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИРЦ
Минздрава России, Обнинск

Введение. В структуре смертности от злокачественных опухолей рак желудка (РЖ) занимает 2-е место. Основным и, как правило, единственным методом лечения РЖ является хирургический. Однако радикальность большинства операций, особенно при ле-

чении местно-распространенных форм, носит условный характер, что отражается в неудовлетворительных отдаленных результатах лечения. Несмотря на значительное количество опубликованных исследований, в том числе рандомизированных, до настоящего времени отсутствует единое мнение о выборе оптимальных показаний и этапности проведения адъювантной терапии у больных РЖ.

Цель работы — изучение прогностической роли динамики генов *AURKA* и *TP53* у больных местно-распространенным РЖ до и после неoadъювантной химиолучевой терапии.

Материалы и методы. Объектом ретроспективного исследования были образцы биопсии опухолевой ткани и операционного материала после проведения неoadъювантной химиолучевой терапии (суммарная очаговая доза 45 Гр на фоне химиотерапии СарОХ) 11 больных местно-распространенным РЖ. В работе использованы метод интерфазной флуоресцентной *in situ* гибридизации (I-FISH) и коммерческие ДНК-пробы *AURKA* и *TP53* (Vysis, США).

Результаты. Среднее количество копий генов *AURKA* и *TP53* на aberrантную клетку в биопсийном материале колебалось в пределах 1,36–6,03 и 0,99–4,52; в операционном — 1,14–7,72 и 1,4–3,76 соответственно. У 6 больных среднее число копий генов *AURKA* и *TP53* на aberrантную клетку в операционном материале достоверно снизилось по сравнению с биопсийным материалом. У 5 пациентов данный показатель либо увеличился, либо остался на прежнем уровне: у 3 больных это выявлено одновременно для генов *AURKA* и *TP53*, у 1 — только для гена *AURKA* и у 1 — для гена *TP53*. У 4 из этих 5 пациентов при последующем наблюдении были выявлены метастазы, причем у 3 больных с увеличением частоты гена *TP53* метастазы развились через 6–8 мес, а у 1 больного с увеличением частоты гена *AURKA* — через 26 мес.

Заключение. Предварительные результаты исследования динамики изменений частоты генов *AURKA* и *TP53* у больных местно-распространенным РЖ до и после неoadъювантной химиолучевой терапии показали потенциальную возможность выявления подгруппы больных, у которых высока вероятность развития рецидивов и метастазов.

Шапероны нуклеолин и нуклеофозмин как потенциальные мишени для противоопухолевой терапии

Д.А. Понкратова¹, А.А. Лушникова¹,
Л.Ф. Морозова¹, С.М. Андреев², Д.Д. Пургина²,
И.С. Абрамов¹, А.В. Балбуцкий¹, И.В. Цыганова¹,
Н.Н. Мазуренко¹, М.Р. Хаитов²

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

²ФБГУ «Государственный научный центр
«Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Нуклеофозмин (В23) и нуклеолин (С23) — многофункциональные фосфопротеины, играющие ключевую роль в регуляции клеточного цикла, биогенеза рибосом, транскрипции и трансляции, в молекулярном транспорте и сигналинге. Эти шапероны служат маркерами клеточной пролиферации и прогрессии целого ряда неоплазий и рассматриваются как возможные мишени для терапии опухолей, в которых выявлена гиперэкспрессия С23/В23. Для этой цели перспективны катионные пептиды (КП) — малотоксичные, устойчивые к внутриклеточной деградации молекулы, способные проникать в клетки и индуцировать апоптоз. **Целью** нашей работы было изучение противоопухолевой активности некоторых КП *in vitro*.

Материалы и методы. Динамику клеточной пролиферации и токсичность КП исследовали на перевиваемых линиях клеток меланомы кожи (МК) человека mH 275 и mIS 223 и на нетрансформированных фибробластах человека перевиваемой линии H1036 (любезно предоставлены д.б.н. А.Ю. Александровой, РОНЦ им. Н.Н. Блохина). Структуру и экспрессию генов *NCL/NPM*, кодирующих С23/В23, анализировали с помощью специфичных полимеразных цепных реакций (ПЦР) на матрице ДНК культивируемых клеток с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле и ПЦР с обратной транскрипцией на матрице мРНК клеток; мутации онкогенов *BRAF* и *NRAS* — методом ПЦР с последующим секвенированием ампликонов; мутации гена *TP53* — с помощью секвенирования 5–10-го экзонов этого гена, амплифицированных на микрочипе.

Результаты. ПЦР-анализ выявил в обеих клеточных линиях МК мутации *BRAF V600E* (экзон 15) в сочетании с полиморфными вариантами генов *NCL/NPM*. Мутаций в гене *TP53* не обнаружено. Уровень экспрессии гена *NCL* до инкубации клеток МК с пептидами был в 8,5 раза выше, чем в нормальных клетках, гена *TP53* — в 2,8 раза ниже. После 3-суточной инкубации уровень экспрессии *NCL* резко упал, *TP53* — вырос в 2,5 раза. Один из возможных механизмов избирательной цитотоксичности КП — их взаимодействие с молекулами С23/В23 после внутриклеточного транспорта КП и последующая активация *p53*.

Выводы. На модельных клеточных линиях МК человека выявлена избирательная цитотоксическая активность *in vitro* ряда КП с дендримерной структурой, исследуются механизмы их противоопухолевой активности.

Использование таргетного секвенирования в диагностике наследственных форм злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта

Л.Н. Любченко¹, М.Г. Филиппова¹, И.С. Абрамов^{1,2},
А.В. Семьянихина¹, Т.С. Дубровина¹, Т.В. Наседкина²,
Ю.И. Патютко¹, А.О. Расулов¹, М.М. Давыдов¹

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

²ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Введение. Существует ряд наследственных заболеваний, при которых риск развития злокачественных новообразований желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) значительно превышает общепопуляционный. Этиологическим фактором являются герминальные мутации в генах-супрессорах. Так, наследственный неполипозный колоректальный рак (синдром Линча) ассоциирован с мутациями в генах *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* и *PMS2*, семейный аденоматозный полипоз — в гене *APC*, а МУН-ассоциированный полипоз — с мутациями в гене *MUTYH*.

Материалы и методы. В целях оценки вклада герминальных мутаций и полиморфных вариантов в генах *APC*, *MLH1*, *PMS2*, *PMS1*, *MSH2*, *TP53*, *MSH6*, *CDH1*, *BMPRIA*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MUTYH*, *PTEN*, *SMAD4*, *STK11* было проведено молекулярно-генетическое исследование геномной ДНК 36 пациентов со злокачественными новообразованиями ЖКТ. Отягощенный семейный анамнез отмечался в 90 % случаев. Отбор целевой последовательности проводили с помощью технологии жидких чипов NimbleGen Sequence Capture. Библиотека зондов включала 2,1 млн олигонуклеотидов длиной 50–105 нуклеотидов, комплементарных кодирующим участкам исследуемых генов. Секвенирование проводили на платформе GS Junior (454/Roche).

Результаты. Выявлено 50 полиморфизмов и мутаций, включая описанные ранее патогенные варианты. Редкие варианты были представлены синонимичными заменами (p.Tyr214= в гене *MSH6*, p.Asn751= в гене *CDH1*), миссенс-мутациями (p.Gly256Asp в гене *MSH2*, p.Val22Met в гене *MUTYH*, p.Thr511Ala в гене *PMS2*, p.Ple157Thr в гене *CHEK2*). Также выявлены нонсенс-мутации, приводящие к формированию преждевременного стоп-кодона (p.Gln816Ter, p.Arg406Ter, p.eu744Ter в гене *MSH2*). Данные NGS были подтверждены с использованием метода секвенирования по Сэнгеру.

Выводы. Высокопроизводительное секвенирование является эффективным методом выявления герминальных мутаций и может быть применено в диагностике наследственных форм злокачественных новообразований ЖКТ в рутинной клинической практике.

Высокопроизводительный поиск ингибиторов синтеза белка – эффективный способ обнаружения новых противоопухолевых препаратов

И.А. Остерман¹, Е.С. Андреева², Д.А. Скворцов¹,
Ф.И. Плетнев¹, Е.И. Марусич³,
М.С. Веселов³, С.В. Леонов³, Я.А. Иваненков³,
П.В. Сергиев¹, О.А. Донцова^{1,4}

¹Химический факультет;

²факультет биоинженерии и биоинформатики
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»;

³Московский физико-технический институт, Долгопрудный;

⁴НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»

Уровень синтеза белка в раковых клетках в большинстве случаев повышен по сравнению с нераковыми, так как для быстрого деления необходимо большое количество новых белков. В связи с этим разработка эффективных ингибиторов трансляции, особенно специфически активных в отношении раковых клеток, представляется крайне актуальной задачей современной биомедицины.

Разработана репортерная система, позволяющая в высокопроизводительном формате анализировать механизм действия новых противоопухолевых препаратов. Репортер основан на 2 флуоресцентных белках, экспрессия одного из них остается на постоянном уровне, а количество второго увеличивается в присутствии ингибиторов синтеза белка. Первичный скрининг проводился на бактериальном репортерном штамме, так как это позволяет быстро проанализировать большое количество образцов. Таким образом проверено около 10 тыс. соединений и отобрано несколько десятков потенциальных кандидатов. Затем проанализирована эффективность подавления синтеза белка в модельной *in vitro* реакции, а также оценено влияние этих соединений на ингибирование роста клеточной линии НЕК293Т. Вещества, для которых был подтвержден механизм действия и показана токсичность в отношении эукариотических клеток, отобраны для дальнейшего анализа. Для них проанализирована токсичность уже относительно нескольких клеточных линий — 2 модельных раковых (A549 и MCF7) и 2 модельных нераковых (НЕК293Т и VA13). Соединения, продемонстрировавшие большую эффективность в подавлении роста раковых клеток по сравнению с нера-

ковыми, могут рассматриваться как потенциальные противоопухолевые препараты.

Поиск ассоциации полиморфных локусов генов *VEGF*, *VCAM1* с риском развития рака мочевого пузыря

В.Н. Павлов¹, С.М. Измайлова¹, Л.З. Ахмадишина²,
А.А. Измайлов¹, Т.В. Викторова^{1,2}

¹ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

²ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН

Введение. В патогенезе злокачественных новообразований, в том числе и рака мочевого пузыря (РМП), значительную роль играют специфические факторы роста клеток. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) вовлечен в процесс новообразования сосудов в растущей опухоли. VEGF секретируется опухолевыми клетками, стимулирует экспрессию молекул межклеточной адгезии 1-го типа (ICAM1) и молекул адгезии клеток сосудистого эндотелия 1 типа (VCAM-1) в эндотелиальных клетках. Высокая экспрессия VEGF характеризует интенсивность роста и большой метастатический потенциал опухоли.

Целью исследования был анализ ассоциации полиморфного локуса –25491/D гена *VEGF*, интронного rs3917010 гена *VCAM* с риском развития РМП.

Материалы и методы. Проведен молекулярно-генетический анализ образцов ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической венозной крови 228 больных РМП: мышечно-неинвазивной формы (МНРМП; $n = 127$) и мышечно-инвазивной формы (МИРМП; $n = 101$). Контрольную группу составили 286 пациентов без хронических заболеваний мочеполовой системы в анамнезе. Полиморфные локусы генов анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с ПДРФ и аллель-специфичной ПЦР. Математическую обработку результатов проводили с использованием пакетов статистических программ SNPstats.

Результаты. Ассоциации с риском развития РМП по локусу –25491/D гена *VEGF* не выявлено. При отдельном анализе МНРМП показано, что генотип II встречался чаще в выборке больных РМП (29 %), чем в группе здоровых индивидов (19,3 %; $p = 0,05$; отношение шансов (ОШ) 1,71; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,00–2,92).

Сравнение наших выборок больных РМП и здоровых индивидов по вариантному аллелю локуса rs3176879 гена *VCAM1* показало отсутствие различий в распределении частот генотипов ($\chi^2 = 4,66$; $p = 0,10$) и аллелей ($\chi^2 = 0,02$; $p = 0,88$). Однако при анализе выборки больных с МНРМП была показана ассоциация с риском развития опухоли в модели сверхдоминирования (ОШ 1,72; 95 % ДИ 1,02–2,88; $p = 0,04$).

Заключение. Показана роль полиморфных локусов rs3917010 гена *VCAM1* и rs34357231 гена *VEGF* в развитии МНРМП.

Поиск ассоциации полиморфного локуса *ICAM1* с риском развития рака мочевого пузыря

В.Н. Павлов¹, С.М. Измайлова¹, Л.З. Ахмадишина²,
А.А. Измайлов¹, Т.В. Викторова^{1,2}

¹ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

²ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН

Введение. Значительную роль в патогенезе злокачественных новообразований, в том числе и рака мочевого пузыря (РМП), играют специфические факторы роста клеток. ICAM1-опосредованная адгезия лейкоцитов к эндотелию является ключевым этапом в раннем ангиогенезе и имеет важное значение в развитии эндотелиальной клеточной полярности, таким образом опосредуя миграцию эндотелиальных клеток VCAM-1. Эти клетки, как полагают, выполняют такую же роль, что и ICAM-1, в то время как PECAM-1 регулирует и адгезию эндотелия, и миграцию, опосредованную межклеточными взаимодействиями. **Целью исследования** был анализ ассоциации полиморфного локуса rs71647806 (Leu125Val) гена *ICAM1* с риском развития мышечно-инвазивного (МИРМП) и мышечно-неинвазивного РМП (МНРМП).

Материалы и методы. Проведен молекулярно-генетический анализ образцов ДНК, выделенной из лимфоцитов периферической венозной крови 228 больных РМП: МНРМП ($n = 127$) и МИРМП ($n = 101$). Контрольную группу составили 286 человек без хронических заболеваний мочеполовой системы в анамнезе. Полиморфные локусы генов анализировали методом ПЦР-ПДРФ и аллель-специфичной ПЦР. Математическую обработку результатов проводили с использованием пакетов статистических программ SNPstats.

Результаты. Анализ локуса rs5498 гена *ICAM1* выявил ассоциацию с риском развития РМП в доминантной модели (отношение шансов (ОШ) 2,63; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,79–3,88; $p < 0,0001$). Причем полученная ассоциация сохранялась как при анализе МНРМП (ОШ 2,91; 95 % ДИ 1,72–4,95; $p < 0,0001$ в доминантной модели), так в случае МИРМП (ОШ 1,90; 95 % ДИ 1,35–2,66; $p = 0,0002$ в аддитивной модели). Полученные данные согласуются с результатами других исследований.

Комбинированное действие димерных бисбензимидазолов DB (5), DB (7) и γ -излучения на клетки рака молочной железы человека линии MCF-7 *in vitro*

К.А. Проношкина¹, А.А. Иванов²,
А.Л. Жузе³, И.А. Замулаева¹

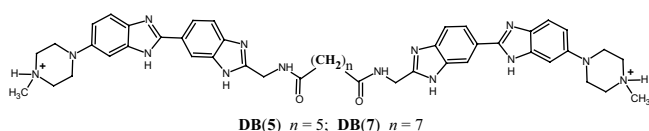
¹МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИРЦ
Минздрава России, Обнинск;

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

³ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва

Поиск эффективных радиомодификаторов, увеличивающих повреждающее действие ионизирующих излучений на злокачественную опухоль и оказывающих при этом щадящее действие на нормальные ткани или по крайней мере не влияющих на их радиочувствительность, остается актуальной проблемой радиационной онкологии уже многие годы. Можно предположить, что ДНК-связывающие лиганды, способные высокоспецифично связываться с определенными последовательностями ДНК, представляют группу перспективных в этом отношении соединений.

Оценен эффект комбинированного действия синтетических димерных бисбензимидазолов (DB (*n*), где *n* = 5, *n* = 7 — число метиленовых остатков в линкерной части молекулы):



и γ -облучения на клетки рака молочной железы человека линии MCF-7 *in vitro*.

После одиночного и комбинированного действия DB (*n*) и γ -излучения в дозе 4 Гр оценена выживаемость клеток линии MCF-7 в близкие и отдаленные сроки после воздействия (по критериям общего количества живых клеток и колониеобразующей способности соответственно). По обоим критериям показано радиосенсибилизирующее действие использованных соединений. Эффекты комбинированного действия имели аддитивный характер, и коэффициенты синергизма при оценке эффектов в близкие сроки после воздействия составили $0,99 \pm 0,11$ (DB (5)) и $0,91 \pm 0,01$ (DB (7)). Коэффициенты синергизма при оценке эффектов комбинированного воздействия по критерию колониеобразующей способности составили $1,02 \pm 0,14$ (DB (5)) и $0,89 \pm 0,11$ (DB (7)).

Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки средств комбиниро-

ванного воздействия на опухолевые клетки на основе изучаемого класса соединений.

Работа выполнена при поддержке РФФИ
(грант № 14-04-00388).

Молекулярные факторы опухолевой прогрессии при увеальной меланоме: мутации в генах *GNAQ/GNA11* и полиморфизм *ABCB1/MDR1*

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;

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

Цель исследования — анализ мутаций в онкогенах *GNAQ* и *GNA11* и полиморфизма гена *ABCB1/MDR1*, их корреляции с клиническими и морфологическими характеристиками при первичной увеальной меланоме (УМ).

Материалы и методы. Обследованы и пролечены 30 пациентов в возрасте 23–72 года (средний возраст $52,5 \pm 9,1$ года) с первичной УМ: 12 мужчин и 18 женщин (2:3). Во всех случаях проведена энуклеация с гистологическим подтверждением диагноза УМ. Мутации в генах *GNAQ/GNA11* и полиморфизм гена *ABCB1/MDR1* определены с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа.

Результаты. В 27 (90 %) из 30 образцов выявлены мутации в экзонах 4 и 5 генов *GNAQ/GNA11*. Частота мутаций в экзонах 4 и 5 гена *GNAQ* составила 40 и 16,7 %, гена *GNA11* — 0 и 50 %. Показана статистически значимая ассоциация между частотой мутации глутамина в 209-м положении гена *GNAQ* с высокой отслойкой сетчатки (0,55 при $p < 0,05$). Частота мутации в экзоне 5 гена *GNA11* в опухоли веретенноклеточного типа в 2,8 раза выше, чем эпителиоидноклеточного типа. Аллель С полиморфного маркера С3435Т гена *ABCB1* выявлена в 80 % случаев. Частота предрасполагающего генотипа СС у больных УМ в 4 раза выше, чем в контрольной группе. Данный генотип ассоциирован с высоким риском развития УМ (отношение шансов 8,5; $p = 7 \times 10^{-6}$). Установлена достоверная корреляционная связь частоты встречаемости генотипа СС полиморфного маркера С3435Т гена *ABCB1* с высотой и степенью пигментации опухоли ($p = 0,0391$ и $p = 0,0381$), состоянием сосудов и эпителиоидноклеточным/смешанноклеточным типом УМ ($p = 0,0493$ и $p = 0,0569$). Генотип ТТ у больных УМ не выявлен.

Заключение. Показаны высокая частота мутаций в генах *GNAQ/GNA11* и ассоциация аллеля С полиморфного маркера С3435Т гена *ABCB1* с неблагоприятными клиническими и морфологическими вари-

антами УМ. Выявленные особенности могут быть использованы для разработки в ходе дальнейших исследований современных подходов к прогнозированию течения УМ, а также для скрининга пациентов, находящихся в группе риска по данному заболеванию.

Увеальная меланома с высоким риском метастазирования: молекулярно-генетические, клинические и патоморфологические особенности опухоли

С.В. Саакян¹, А.Ю. Цыганков¹, А.Г. Амирян¹,
Н.В. Склярова¹, Д.В. Залетаев²

¹ФГБУ «МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца»
Минздрава России;

²ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова»
Минздрава России

Цель исследования — уточнение клинических, патоморфологических и молекулярно-генетических особенностей увеальной меланомы (УМ) с высоким риском метастазирования.

Материалы и методы. Всего обследованы 104 пациента с УМ, в том числе 66 (63,4 %) женщин и 38 (36,6 %) мужчин, пролеченных в период 2005–2007 гг. Возраст пациентов на момент постановки диагноза составил 22–84 года (средний возраст $53,7 \pm 12,2$ года). Срок наблюдения составил 41–84 мес (средний — $60,9 \pm 8,8$ мес). Потерю гетерозиготности в хромосомных районах 1p36, 1p31.3, 3p25.3, 3p21.3, 3p14.2, 3q12, 3q26.3, 3q28 идентифицировали с использованием панели высокополиморфных маркеров. Для определения метилирования CpG-островков промоторных областей генов применяли метод метил-чувствительной полимеразной цепной реакции. Выделены группы УМ с наличием ($n = 32$) и отсутствием ($n = 72$) метастазирования.

Результаты. Возраст, пол пациентов, размеры опухоли, наличие пигментации, гемофтальма, вторичной отслойки сетчатки, субретинального экссудата и видимых собственных сосудов существенно не различались в группах метастатической и неметастатической УМ. Экстрабульбарный рост опухоли наблюдался с приблизительно одинаковой частотой в обеих группах ($p = 0,065$), однако у пациентов с метастазированием размер экстрабульбарных очагов был больше. Для больных с метастатической УМ характерны значительно более высокая частота смешанноклеточного варианта опухоли и более низкая — веретенноклеточного, а также более высокая частота вовлечения цилиарного тела (43,8 %). В частоте эпителиоидноклеточного типа опухоли значимых отличий не выявлено. Моносомия хромосомы 3 в клетках опухоли значимо ухудшает витальный прогноз ($p = 0,0001$), делеция короткого

плеча хромосомы 1 не влияет на развитие метастатической болезни, а метилирование гена *RASSF1A* несколько улучшает витальный прогноз при УМ ($p = 0,04$).

Заключение. Все пациенты с УМ должны быть обследованы на моносомию хромосомы 3. При ее выявлении рекомендуется регулярное обследование отдаленных органов (печень, легкие и др.) методами ультразвукового исследования, компьютерной томографии (КТ), КТ с позитронно-эмиссионной томографией для определения возможных метастатических очагов.

Анализ корреляции между экспрессией основных маркеров карциномы молочной железы и экспрессией топоизомеразы $\Pi\alpha$

С.В. Сазонов, Е.В. Арутюнян, Е.А. Новикова
ГБОУ ВПО «Уральский ГМУ» Минздрава России,
Екатеринбург

Актуальность. Топоизомераза $\Pi\alpha$ (Top $\Pi\alpha$) — ядерный фермент, активно участвующий в процессах пролиферации и репарации ДНК, что ведет к повышению выживаемости опухолевых клеток. Ген *TOP2A* расположен близко к гену, кодирующему человеческий эпидермальный фактора роста (HER-2/neu), на хромосоме 17q12–21. Предполагается, что нарушения в гене *HER-2/neu* вызывают амплификацию гена *TOP2A* по механизму breakage-fusion-bridge. **Цель исследования** — определить наличие корреляции между экспрессией белка Top $\Pi\alpha$ и экспрессией белков Ki-67, HER-2/neu, эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в клетках карциномы молочной железы.

Материалы и методы. Проанализированы 532 случая инфильтративной карциномы молочной железы. Исследования выполнены с использованием автоматической системы для иммуногистохимического окрашивания Universal Staining System Autostainer Dako (Дания). Экспрессию Top $\Pi\alpha$ оценивали по шкале L. Usha (гиперэкспрессия ≥ 35 %), анализ данных проводили с помощью программного пакета The Salford Predictive Modeler 7.0. Все случаи были разделены на 2 группы в зависимости от значения экспрессии Top $\Pi\alpha$. В 1-ю группу вошли случаи со значением TPI ≥ 35 % ($n = 80$; 15 %), классифицирующиеся как гиперэкспрессия по данному белку. Во 2-ю группу — случаи с TPI < 35 % ($n = 452$; 85 %). В каждой из групп рассчитывали распределение маркеров по важности с использованием алгоритма CART и построением классификационного дерева решений.

Результаты и обсуждение. В 1-й группе основным маркером, связанным с Top $\Pi\alpha$, является белок Ki-67. При этом гиперэкспрессия Top $\Pi\alpha$ наиболее часто встречается в опухолях с уровнем Ki-67 > 20 % (71 случай из 80). Четкой зависимости от уровня экспрессии

HER-2/neu, эстрогеновых или прогестероновых рецепторов в данной группе не обнаружено. Во 2-й группе основным маркером, связанным с TopIIa, также оказался белок Ki-67. Алгоритмом CART выделено множество подгрупп Ki-67 в зависимости от уровня прогестерона и HER-2/neu.

Заключение. Экспрессия белка Ki-67 коррелирует с уровнем экспрессии TopIIa. Гиперэкспрессия TopIIa наиболее часто встречается в клетках опухоли карциномы молочной железы с уровнем Ki-67 > 20 %. Корреляции уровня экспрессии TopIIa с экспрессией HER-2/neu, эстрогеновых или прогестероновых рецепторов при карциноме молочной железы не обнаружено.

Разработка экспресс-FISH-теста для выявления скрытых хромосомных aberrаций при миелопролиферативных новообразованиях

А.А. Сальник, А.С. Мкртчян, Н.А. Лыжко, А.В. Мисюрин
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Миелопролиферативные новообразования (МПН) — клональные гематологические злокачественные новообразования, происходящие из зрелых стволовых клеток и характеризующиеся пролиферацией в костном мозге.

Для диагностики МПН важными являются результаты цитогенетических, молекулярно-цитогенетических и молекулярных исследований. Цитогенетический анализ показывает различные хромосомные aberrации, что указывает на наличие того или иного заболевания. Молекулярно-цитогенетические исследования позволяют определить криптические цитогенетические изменения, которые невозможно заметить при проведении только цитогенетического анализа. Мутации некоторых генов, таких как *JAK2*, *MPL*, *CALR*, *LNK*, *CBL*, *MPN*, *TET2*, *IDH1/2* и т. д., очень специфичны для МНП и выявляются в 20–90 % случаев. При переходе из хронической фазы в фазу бластного криза частота генетических и цитогенетических изменений существенно увеличивается.

Целью данной работы было обнаружение генетических и скрытых цитогенетических изменений при помощи FISH-анализа; создание экспресс-FISH-теста для выявления наиболее часто встречаемых aberrаций при МПН.

Проведены молекулярно-цитогенетические и молекулярные исследования 24 пациентов. У 23 из них была обнаружена мутация в 12-м экзоне гена *JAK2* и у 1 — делеция гена *CALR*. Для молекулярно-цитогенетического анализа была собрана панель зондов для

выявления наиболее часто встречаемых aberrаций при МПН: амплификация/делеция 1q21, 1p36, 3q26, 5q31–33, 7q22–36, 20q11/20q12, 13q14, 17p, трисомия хромосом 8, 9, 21. У 3 пациентов с мутацией в гене *JAK2* обнаружены скрытые хромосомные aberrации: в 8 % клеток — амплификация участка 1q21; в 60 % — амплификация участка 3q26; в 8 % — необычная комбинация сигналов зонда для транслокации t(12;21)(p13.2;q22.1) (выявлено 2 слитых сигнала генов *TEL* и *AML* со слабым сигналом *TEL* и 2 сигнала гена *TEL*).

Таким образом, у всех больных МПН обнаружены специфические мутации (96 % — гена *JAK2*, 4 % — гена *CALR*). Полученные результаты позволяют дать предварительную оценку высокой эффективности использования панели подобранных зондов (в 13 % случаев выявлены цитогенетические изменения). Пациенту с перестройкой 12;21 необходимо провести генетические исследования для уточнения характера данной aberrации. Дальнейшие исследования будут направлены на усовершенствование панели путем добавления/изъятия ДНК-зондов.

Дифференциальная диагностика узловых образований щитовидной железы путем анализа экзосомальных микроРНК

Р.Б. Самсонов^{1,2}, В.С. Бурдаков³, Т.А. Штам³,
З.А. Раджабова¹, Д.А. Васильев¹, Е.В. Цырлина¹,
С.Е. Титов^{4,5}, М.К. Иванов⁵, М.В. Филатов³,
Л.М. Берштейн¹, Н.Н. Колесников⁴, А.В. Малек^{1,3}

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

²ФГБУ РНЦРХТ Минздрава России, Санкт-Петербург;

³Петербургский институт ядерной физики НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

⁴ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН», Новосибирск;

⁵ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск

В настоящее время в клинической практике отсутствуют надежные методы неинвазивной первичной и/или дифференциальной диагностики узловых заболеваний щитовидной железы, примерно 10 % которых представлены злокачественными новообразованиями (Gandolfi et al., 2004; Botrugno et al., 2011). МикроРНК — это короткие одноцепочечные молекулы РНК, выполняющие функцию аутокринной регуляции генной экспрессии внутри клетки. МикроРНК могут секретироваться клетками в составе мембранных везикул (экзосом) и опосредовать пара- и эндокринное взаимодействие клеток различных тканей. Клетки опухоли секретируют экзосомы, которые опосредуют процессы инвазивного роста и метастатической диссеминации и могут быть выделены из биологических жидкостей. Анализ состава микроРНК опухоле-

вых экзосом развивается как новый перспективный метод диагностики онкологических заболеваний. В группах пациентов с различными узловыми заболеваниями щитовидной железы методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией проведен сравнительный анализ экзосомальных микроРНК. Выявлено, что повышение концентрации микроРНК отличает пациентов с папиллярным (miR-31) и фолликулярным (miR-21) раком щитовидной железы от больных с аденомой. Реципрокный характер экспрессии 2 микроРНК (miR-21/miR-181a) наблюдался у пациентов с папиллярным и фолликулярным раком щитовидной железы, что позволяло дифференцировать эти заболевания со 100 % чувствительностью и 77 % специфичностью.

Возможности NGS в диагностике редких наследственных синдромов

А.В. Семьянихина¹, М.Г. Филиппова¹, И.С. Абрамов^{1,2},
А.С. Тюляндина¹, О.В. Крохина¹, Т.В. Наседкина²,
Л.Н. Любченко¹

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

²ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва

Введение. Синдром Ли–Фраумени (СЛФ) относится к группе редких наследственных высокопенетрантных аутосомно-доминантных заболеваний, характеризуется фенотипической и генетической гетерогенностью и ассоциирован с высокими рисками развития остеогенных и мягкотканых сарком, одно- и двустороннего рака молочной железы (РМЖ) у женщин, аденокортикального рака, опухолей головного мозга, гемобластозов и др.

Материалы и методы. В целях оценки вклада герминальных мутаций и полиморфных вариантов в гене *TP53* в развитие двустороннего РМЖ и первично-множественных злокачественных новообразований (ПМЗН) в составе СЛФ, а также возможностей современных методов ДНК-диагностики представлен клинический случай 33-летней пациентки с ПМЗН в составе СЛФ: рак правой молочной железы, состояние после полихимиотерапии. Прогрессирование в 2010 г. Метастатический рак левой молочной железы, состояние после комплексного лечения в 2011–2013 гг. Прогрессирование РМЖ на фоне беременности в 2013 г. Кесарево сечение на сроке 25 нед беременности. Анапластическая олигоастроцитома правой лобной доли головного мозга, состояние после комплексного лечения в 2011–2013 гг. Прогрессирование заболевания в 2014 г. Состояние после установки резервуара Оммая в кистозный компонент опухоли правой лобной доли головного мозга 01.07.2014. Для проведения молекулярно-генетического исследования получена геномная ДНК пациентки, предварительно генотипированная на предмет отсутствия мутаций в генах *BRCA1/2*. С помощью коммерческого набора SeqPlate *TP53* амплифициро-

ваны 4–11-й экзоны гена *TP53*. Таргетное секвенирование выполнено на платформе GS Junior (454/Roche).

Результаты. В 7-м экзоне гена *TP53* выявлена герминальная миссенс-мутация с.722C>A (p.S241Y), в последующем валидированная автоматическим секвенированием по Сэнгеру; подтвержден клинический диагноз: *TP53*-ассоциированные ПМЗН в составе СЛФ.

Выводы. Представленные результаты демонстрируют высокую диагностическую эффективность современных методов молекулярно-генетической диагностики в онкологической практике, в том числе технологий массового параллельного секвенирования.

Идентификация потенциальных маркеров и эффекторов гепатоканцерогенеза по результатам транскриптомного секвенирования

П.А. Сковородникова^{1,2}, М.С. Чесноков³, И.Ф. Кустова³,
Д.А. Шавочкина³, М.Д. Логачева², А.А. Пенин²,
А.В. Клепикова², Н.Е. Кудашкин⁴, Ю.И. Патютко⁴,
Н.Л. Лазаревич^{1,3}

¹Биологический факультет

ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»;

²НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского

ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова»;

³отдел иммунохимии НИИ канцерогенеза ФГБУ

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

⁴отделение опухолей печени и поджелудочной железы НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является одной из наиболее распространенных форм рака в мире и характеризуется поздними сроками выявления и устойчивостью к химиотерапии. Данная работа направлена на поиск новых потенциальных маркеров для ранней диагностики и мишеней для направленной терапии.

Из 5 пар образцов опухоли и неопухолевой ткани печени пациентов с ГЦК выделены РНК и проведено их полнотранскриптомное секвенирование на платформе Illumina HiSeq2000. По результатам секвенирования выбраны гены *CENPF*, *IQGAP3*, *TOP2A*, *GNAZ* и *PDGFA*, уровни экспрессии которых исследованы методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени на 19 парах образцов ГЦК и неопухолевой ткани печени. Гиперэкспрессия исследованных генов выявлена в 90–100 % случаев, при этом в высокозлокачественных опухолях экспрессия большинства генов была повышена в 16–2000 раз, у пациентов с ранними стадиями заболевания — в 2–4 раза.

Также исследованы изменения спектра экспрессии альтернативных изоформ ключевого активатора ангиогенеза VEGFA, который является важным регулятором прогрессии ГЦК. В образцах ГЦК наблюдается повышение экспрессии наиболее активных растворимых изоформ VEGF121 и VEGF165 (40 и 30 % случаев соответственно) и снижение экспрессии изоформы VEGF189, сцепленной с клеточной поверхностью (в 85 % образцов).

Таким образом, обнаружены новые потенциальные маркеры гепатоканцерогенеза, значительная гиперэкспрессия которых наблюдается в ткани ГЦК. Выявлено специфическое для ГЦК изменение баланса уровней экспрессии изоформ VEGFA. Полученные данные могут быть использованы для оптимизации существующих и разработки новых подходов в таргетной терапии ГЦК.

Работа частично поддержана грантом Минобрнауки России (контракт № 14.607.21.0049, RFMEFI60714X0049).

Подавление экспрессии онкогена RUNX1-RUNX1T1 приводит к активации сигнальных каскадов, ответственных как за выживаемость, так и за гибель клеток острого миелоидного лейкоза

П.В. Спирин¹, Н.Н. Орлова¹, Т.Д. Лебедев¹, А.А. Буздин², К. Стокин³, В.С. Прасолов¹

¹ФГБУН «ИМБ им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва;

²ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва;

³Институт им. Генриха Петте — Лейбницкий институт экспериментальной вирусологии, Гамбург, Германия

Транслокация t(8;21)(q22;q22) наиболее часто является при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) и приводит к образованию в клетках транскрипта, кодирующего слитый белок RUNX1-RUNX1T1 (AML1-ETO), который представляет собой перспективную мишень для лечения лейкозов. Однако активности только этого онкогена недостаточно, чтобы привести к образованию лейкозных клеток, и эффективность такой терапии остается неясной. RUNX1-RUNX1T1, как известно, регулирует экспрессию генов, участвующих в опухолевой прогрессии, но роль этих сигнальных путей и их отдельных компонентов неизвестна. Мы использовали РНК-интерференцию (RNAi) для выяснения эффекта подавления RUNX1-RUNX1T1 в клетках линии Kasumi-1, несущих транслокацию t(8;21). Показано значительное уменьшение экспрессии KIT, снижение скорости пролиферации и стимулирование апоптоза. В результате получена линия

клеток, в которых осуществляется стабильное подавление экспрессии RUNX1-RUNX1T1. Проанализирован геном данных клеток; показано, что подавление RUNX1-RUNX1T1 приводит к активации и подавлению путей, ответственных за выживаемость и пролиферацию клеток. Показано, что подавления синтеза только данного онкобелка может быть недостаточно для гибели злокачественных клеток. Обнаружено, что белок ERK2, являющийся одним из ключевых регуляторов, ответственных за пролиферацию клеток, может опосредовать активацию 23 (79 %) из 29 исследованных сигнальных путей. Таким образом, данный фактор может быть рассмотрен в качестве ключевой мишени для избирательной элиминации клеток, несущих транслокацию t(8;21). Показана возможность сочетанного использования ингибиторов ERK2 и RUNX1-RUNX1T1. IC₅₀ для t(8;21)-позитивных клеток линии Kasumi-1 была более чем в 2 раза ниже по сравнению с использованием этих ингибиторов в тех же концентрациях по отдельности. Мы полагаем, что этот подход может быть использован при разработке методов лечения t(8;21)-позитивных лейкозов.

Работа выполнена при поддержке РНФ (договор № 14-14-01089).

Влияние таргетной терапии на молекулярные маркеры опухоли у больных с диссеминированным раком почки

Л.В. Спирина^{1,2}, З.А. Юрмазов¹, Е.А. Уснин¹, И.В. Кондакова¹, Е.М. Слонимская^{1,2}

¹ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск

Таргетная терапия является перспективным направлением лечения распространенного рака почки (РП), поскольку значимо увеличивает время без прогрессирования по сравнению со стандартной иммунотерапией. Однако в настоящее время существует необходимость поиска дополнительных критериев, позволяющих предсказывать эффективность подобного лечения.

Цель работы заключалась в изучении динамики изменений транскрипционных факторов NF-κB, HIF-1α, ростового фактора VEGF, его рецептора VEGFR2, протеинкиназы m-TOR, активности протеасом и кальпаинов у больных с диссеминированным РП на фоне проводимой таргетной терапии.

Материалы и методы. В исследование включены 44 пациента с гистологически верифицированным диагнозом светлоклеточного РП (средний возраст 58,6 ± 2,2 года). Пациенты были рандомизированы на 2 группы: 1-я (n = 26) в плане комбинированного лечения получала пазопаниб в количестве 2 курсов в рекомендованной дозе 800 мг ежедневно в течение 2 мес,

2-я ($n = 18$) — эверолимус 10 мг. После окончания курса предоперационного лечения проводилась паллиативная нефрэктомия. Содержание транскрипционных и ростовых факторов изучено методом иммуноферментного анализа; активность протеасом и кальпаинов — флуориметрическим методом.

Результаты. На фоне лечения таргетными препаратами, как пазопанибом, так и эверолимусом, экспрессия гипоксического ядерного фактора HIF-1 в ткани РП снижалась. Падение экспрессии ростового фактора VEGF и его рецептора VEGFR2 отмечено только в группе больных, получавших терапию ингибитором m-TOR. Повышение активности кальпаинов в ткани опухоли наблюдается при лечении обоими таргетными препаратами. Полученные данные расширяют представления о механизме действия таргетных противоопухолевых препаратов, а также позволяют рассматривать изучаемые маркеры в качестве предикторных при выборе оптимальной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МД-3637.2015.7.

Синтез новых селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора (SEGRA) и оценка их противоопухолевого эффекта *in vitro*

Л.Р. Тилова¹, Е.М. Жидкова², О.И. Борисова (Задорожная)¹, А.В. Савинкова^{1,2}, К.И. Кирсанов¹, И.В. Буднова³, Е.Ю. Булич⁴, В.З. Ширинян⁵, М.Г. Якубовская¹, Е.А. Лесовая^{1,6}

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

²МИТХТ им. М.В. Ломоносова;

³North-Western University, Chicago, USA;

⁴ФГБОУ ВПО «РХТУ им. Д.И. Менделеева», Москва;

⁵ФГБУН «ИОХ им. Н.Д. Зелинского» РАН, Москва;

⁶ГБОУ ВПО «РязГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России

Глюкокортикоиды (ГК) широко используются в химиотерапии гемобластозов. Биологический эффект ГК реализуется посредством активации глюкокортикоидного рецептора (ГКР), регулирующего экспрессию генов путем: 1) трансактивации, требующей связывания ГКР с ДНК, и 2) транскрепрессии — белок-белкового взаимодействия ГКР с факторами транскрипции. Транскрепрессия обуславливает терапевтические эффекты ГК, в то время как трансактивация вызывает развитие побочных эффектов. Перспективным является поиск селективных агонистов ГКР (SEGRA), избирательно запускающих транскрепессию. К классу SEGRA относится 2-(4-ацетоксиметил)-2-хлор-N-метилэтиламмоний хлорид, или CpдA, соединение растительного происхождения, выделенное из кустарника *Salsola tuberculatiformis*.

Показано, что CpдA конкурирует с ГК за связывание с ГКР и селективно запускает механизм транскрепрессии. Также мы показали, что CpдA проявляет ГКР-зависимый противоопухолевый эффект на моделях гемобластозов *in vitro* и *in vivo*. В данном исследовании мы планировали расширить список SEGRA путем синтеза энантиомеров CpдA или его химических производных. Энантиомеры CpдA синтезированы на основании асимметричного дигидроксилирования по Шарплессу. При оценке биологических свойств показано, что оба энантиомера обладают ГКР-зависимым антипролиферативным эффектом и способностью селективно запускать только транскрепессию, причем для (S)-CpдA эти свойства выражены сильнее. Химические производные CpдA получены путем введения объемных заместителей в бензольное кольцо молекулы CpдA, алкилирования атома углерода, смежного с атомом хлора, или путем введения заместителей к атому азота. Цитотоксические и проапоптотические эффекты полученных соединений были сравнимы с эффектами исходного агента.

Полученные данные показывают перспективность дальнейшего исследования производных CpдA как новых противоопухолевых препаратов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 13-04-01707 и № 15-04-04006) и фонда «Династия».

Ассоциация уровней экспрессии генов ABC и GST и выживаемости без прогрессирования заболевания у пациенток, страдающих отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы

И.Ю. Третьяк

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск

Цель работы — определить ассоциацию уровней экспрессии генов ABC и GST и выживаемости без прогрессирования заболевания у пациенток, страдающих отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. Экспрессия генов ABC и GST определена у 37 пациенток с отечно-инфильтративной формой РМЖ и 74 больных с первично-диссеминированным РМЖ, которым проводилась химиотерапия с включением антрациклинов на 1-м этапе специального лечения. В качестве материала для исследования использовали фиксированные в парафине срезы образцов опухолевой ткани.

Результаты и выводы. При многофакторном анализе выявлена ассоциация между временем до про-

грессирования заболевания у пациенток с IV стадией РМЖ, получавших цитостатическую терапию с включением антрациклинов, и отсутствием экспрессии гена *GSTM1* (отношение рисков (ОР) 1,8; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,1–3,1; $p = 0,024$), а также со степенью поражения регионарных лимфатических узлов (сN2–3 против сN0–1) (ОР 2,0; 95 % ДИ 1,2–3,4; $p = 0,010$). Выделены группы риска прогрессирования опухолевого процесса из числа пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным РМЖ, получавших цитостатическую терапию с включением антрациклинов, на основе определения экспрессии гена *GSTM1* и степени поражения регионарных лимфатических узлов. Группа умеренного риска прогрессирования включала больных с отсутствием факторов риска или наличием только 1 фактора риска (отсутствие экспрессии гена *GSTM1* или поражение регионарных лимфатических узлов сN2–3). Группа высокого риска прогрессирования включала пациенток с наличием 2 факторов риска и характеризовалась отсутствием экспрессии гена *GSTM1* и поражением регионарных лимфатических узлов сN2–3. Выявлены статистически значимые различия в выживаемости без прогрессирования заболевания в группах высокого/умеренного риска прогрессирования ($p < 0,05$).

Исследование мутаций генов *BRCA1* и *BRCA2* у молодых женщин, больных раком молочной железы, в Узбекистане

М.Т. Тухтабоева, А.Н. Абдихакимов, Б.Ш. Адылов,
Ш.У. Турдикулова

Ташкентский областной онкологический диспансер,
Республика Узбекистан;

Центр медицинской генетики Института биохимии
Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент

Заболеваемость раком молочной железы (РМЖ) в Узбекистане — одна из самых высоких среди Центральноазиатских республик. В связи с этим разработка эффективных стратегий ранней диагностики и профилактики РМЖ является очень важным направлением.

Наследственные факторы играют важную роль в развитии РМЖ. Наиболее значимыми на сегодняшний день генетическими факторами риска РМЖ являются герминальные мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*.

Целью работы явилось исследование вклада 5 часто встречающихся мутаций *BRCA1/2* в развитие РМЖ у женщин молодого возраста в Узбекистане. В исследование была включена группа пациенток с относительно ранним возрастом возникновения заболевания (до 35 лет; $n = 45$). Контрольная группа состояла из 103 практически здоровых женщин. Для выявления мутаций 5382insC, 4153delA, 185delAG и 300T>G в ге-

не *BRCA1*, а также 6174delT в гене *BRCA2* использовалась аллель-специфическая полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Обнаружено, что 7 % пациенток имеют гетерозиготную мутацию *BRCA1* 5382insC. Мутации *BRCA1* 4153delA, 185delAG, 300T>G и *BRCA2* 6174delT не выявлены ни в одном из проанализированных случаев. Исследованные мутации не обнаружены и в контрольной группе.

Результаты нашего исследования подтверждают вклад мутации *BRCA1* 5382insC в развитие РМЖ у женщин молодого возраста в Узбекистане. Таким образом, целесообразно включить генотипирование данной мутации в скрининговые программы профилактики РМЖ у молодых женщин.

Влияние селективного ингибитора eNOS T1023 на развитие неоплазий различного гистогенеза

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

МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ НМИРЦ
Минздрава России, Обнинск

Введение. Изучение механизмов ангиогенеза неоплазий и выявление многочисленных факторов, модулирующих эти процессы, создали условия для разработки фармакологических средств ангиостатической терапии опухолей. Известно, что общим звеном в развитии ангиогенного действия большинства проангиогенных факторов является активация eNOS/sGC/sGMP-пути. В связи с этим перспективным для противоопухолевой терапии может являться применение ингибиторов ангиогенеза, действие которых направлено на общие участки проангиогенных путей, в частности ингибиторов эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS). Проведено сравнительное изучение противоопухолевого действия ингибитора eNOS на 3 моделях экспериментальных неоплазий с различным гистогенезом и характером развития.

Материалы и методы. Использованы перевиваемые опухоли животных: меланома мышей В16, эпидермоидная карцинома легких Льюиса (КЛЛ) и рак шейки матки мышей РШМ5. КЛЛ и В16 поддерживали на самцах мышей C57BL/6j, РШМ5 — на самках мышей линии СВА. Ингибитор eNOS T1023 вводился подопытным животным ежедневно однократно внутривентриально в дозе 1/6–1/5 ЛД₅₀, в зависимости от схемы терапии со 2-х, 7-х или 14-х суток после перевивки и до конца срока наблюдения. Для оценки противоопухолевого и анти-метастатического эффекта рассчитывали индекс торможения роста (ИТР), индекс роста (ИР) опухоли и для КЛЛ — индекс ингибирования метастазирования (ИИМ).

Результаты. Во всех схемах воздействия на КЛЛ соединение T1023 вызывало выраженную задержку роста

и подавление метастазирования карциномы (ИТР 40–70 %, ИИМ 50–80 %). Торможение роста РШМ5 независимо от сроков начала применения T1023 развивалось только в экспоненциальной фазе роста РШМ, и в дальнейшем наблюдался стабильный противоопухолевый эффект (ИР 50–60 %). Меланома B16 была существенно более резистентной: умеренное торможение роста (ИТР 30–35 %) отмечалось лишь на начальных этапах с последующей адаптацией к влиянию ингибитора eNOS.

Выводы. Селективные ингибиторы eNOS являются перспективными для разработки средств антиангиогенной терапии неоплазий. Их эффективность во многом определяется схемой терапии и гистогенезом опухоли.

Иммунизация рекомбинантным антигеном PRAME снижает развитие опухоли на животной модели

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

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

Введение. Антиген PRAME (preferentially expressed antigen of melanoma) распознается цитотоксическими CD8⁺-Т-клетками у многих пациентов с меланомой. Показано также, что ген PRAME избыточно экспрессируется в различных новообразованиях, включая солидные опухоли и гемобласты. Кроме того, некоторые PRAME-пептиды, используемые в качестве вакцины, способны стимулировать цитотоксическое действие специфических CD8⁺-Т-клеток. Следовательно, антиген PRAME может быть перспективной мишенью для разработки противоопухолевой иммунотерапии. **Цель исследования** — оценить значение полноразмерного рекомбинантного белка PRAME в качестве противоопухолевой вакцины против PRAME-экспрессирующих опухолевых клеток.

Материалы и методы. Рекомбинантный человеческий антиген PRAME был получен путем клонирования в экспрессирующий вектор pET-15b его кодирующей последовательности с последующей разработкой белка в культуре *Escherichia coli*. Очистка белка гесPRAME осуществлялась методом аффинной хроматографии. Последовательность гена PRAME также была клонирована в вектор pCER4 для экспрессии белка в эукариотических клетках. Клетки мышины меланомы B16-F10 были трансфицированы этим вектором, и был отобран клон, стабильно экспрессирующий ген. Мыши линии C57BL/6 были иммунизированы внутрибрюшинно композицией из 100 мкг рекомбинантного белка PRAME и 300 мкг адьюванта гидроксида алюминия 4 раза с интервалом 2 нед. Затем мышам подкожно трансплантировали 4×10^5 клеток меланомы PRAME-B16-F10. В контрольных группах были мыши с трансплантированной меланомой B16-

F10, трансфицированной вектором pCER4 без гена PRAME, и мыши, иммунизированные только адьювантом. В процессе развития опухоли измеряли ее размер, а также определяли титр анти-PRAME-антител в сыворотке методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Получен рекомбинантный человеческий антиген PRAME с чистотой белка 95 %. Было показано, что введение гесPRAME не влияет на формулу крови и морфологические характеристики различных тканей. Иммунизация мышей белком гесPRAME вызывает гуморальный ответ в сыворотке. Профилактическая вакцинация мышей белком гесPRAME приводит к подавлению роста меланомы PRAME-B16-F10, причем степень подавления ее роста зависит от интенсивности гуморального ответа, который развивается у мышей в результате иммунизации рекомбинантной вакциной гесPRAME. Наши данные показывают противоопухолевый эффект иммунизации белком гесPRAME на животной модели, и антиген PRAME является подходящим кандидатом для создания противоопухолевой вакцины для PRAME-позитивных злокачественных новообразований.

Панель однонуклеотидных полиморфизмов, позволяющая прогнозировать изменение экспрессии генов резистентности в опухоли молочной железы под действием химиотерапии

М.М. Цыганов^{1,2}, М.К. Ибрагимова¹, Е.М. Слонимская¹,
Н.В. Чердынцева^{1,2}, Н.В. Литвяков^{1,2}

¹ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Ранее нами получены данные о коэкспрессии в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии (НХТ) 4 генов ABC-транспортеров: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* ($r = 0,27–0,81$; $p < 0,05$), повышение экспрессии которых приводит к формированию фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Механизмы регуляции экспрессии генов ABC, которые связаны с индивидуальными генетическими особенностями, определяемыми однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП), не изучены. **Целью работы** явилось изучение связи ОНП с изменением экспрессии одновременно 4 генов ABC в процессе НХТ.

Материалы и методы. Обследованы 80 больных раком молочной железы (IIA–IIIC стадии), из них 68 и 12 пациентов составили обучающую и тестовую выборки соответственно. Больные получали 2–4 курса НХТ. Экспрессию генов ABC оценивали в 80 парных

образцах до лечения и после НХТ методом количественной полимеразной цепной реакции. ДНК из биоптатов использовали для микроматричного анализа на чипе CytoScan HD Array (Affymetrix, USA) и получения данных по ОНП. Связь изменения экспрессии генов *ABC* с ОНП оценивали с помощью программы R v. 3.0.2.

Результаты. При исследовании на обучающей выборке установлено, что с изменением экспрессии одновременно 4 генов *ABC* ассоциированы 19 полиморфизмов: rs2239222, rs1104880, rs984838, rs7410474, rs7988924, rs7857937, rs7529524, rs11765409, rs7542399, rs4285288, rs13037594, rs10863350, rs7036572, rs8125425, rs6064404, rs10780227, rs6069763, rs3787395, rs6559731. «Дикий» и/или мутантный генотип каждого ОНП сопряжен либо со снижением, либо с повышением экспрессии изучаемых генов *ABC*, и их определение до лечения позволяет предсказать изменение экспрессии генов *ABC* в процессе НХТ. На тестовой группе проспективно была проверена эффективность прогноза изменения экспрессии генов *ABC*. В 10 (83 %) из 12 случаев определение генотипов 19 ОНП позволяет предсказать снижение или повышение экспрессии генов *ABC*.

Заключение. Использование идентифицированных ОНП в качестве предсказательного фактора позволяет с 83 % эффективностью прогнозировать направление изменения генов *ABC* и формирование фенотипа МЛУ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № НК14-04-31633/15 и Программы повышения конкурентоспособности НИ ТГУ.

Изменения процесса метилирования ДНК при раке верхних дыхательных и пищеварительных органов

О.В. Шаньгина, Ю.М. Кузиченкова, Д.Г. Заридзе

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

Рак верхних дыхательных и пищеварительных органов (ВДПО) является распространенной формой злокачественных заболеваний, этиологически связанной с курением и чрезмерным употреблением алкоголя. Известно, что изменения процесса метилирования ДНК связаны с повышенным риском рака ВДПО, однако этот механизм изучен плохо. В результате данного исследования выявлено большое количество генов с aberrантной функцией гиперметилирования, включая *MYOD1*, *CHRNA3* и *MTHFR*. Кроме того, выявлен новый ген (ген рецептора никотинацетилхолина), aberrантная функция гиперметилирования которого влияет на прекращение эпигенетического регулирования рецепторов никотинацетилхолина, что, в свою очередь, может привести к опухолевой трансформации ткани. Установлено, что на статус метилирования ДНК влияют пол и возраст человека, в то время как

курение и потребление алкоголя также могут влиять на уровни метилирования ДНК в специфических генах. Таким образом, предложен новый потенциальный механизм воздействия факторов образа жизни на ключевые гены, регулирующие клеточный цикл при опухолевой супрессии и дальнейшем развитии рака ВДПО.

Редкий вариант *BRCA2* и риск рака легкого и верхних дыхательных и пищеварительных органов

О.В. Шаньгина, А.Ф. Мукерия, Д.Г. Заридзе

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

Известно, что опасная мутация гена *BRCA2* повышает риск развития рака молочной железы. Однако в рамках полногеномного метаанализа случаев рака легкого в Европейском регионе, включающего 21 597 больных плоскоклеточным раком легкого и 54 083 контрольных лиц, была выявлена четкая достоверная связь риска рака легкого с редким аллельным вариантом гена *BRCA2* (rs13314271). У носителей варианта rs13314271 риск рака легкого повышен в 2,5 раза (относительный риск (ОР) 2,47; $p = 10-20$), причем у курящих эта связь выражена сильнее, чем у некурящих. В то же время этот вариант лишь незначительно повышает риск развития рака молочной железы (только на 26 %). В последующем метаанализе случаев рака верхних дыхательных и пищеварительных органов (ВДПО), насчитывающем 5942 больных плоскоклеточным раком ВДПО и 8086 контрольных лиц, было установлено, что rs11571833 также значительно повышает риск развития рака ВДПО (ОР 2,53; 95 % доверительный интервал 1,89–3,38). Связь rs11571833 с раком ВДПО более очевидна у курильщиков и экс-курильщиков по сравнению с никогда не курившими лицами. Полученные результаты создают предпосылку для разработки методов таргетной терапии больных раком легкого и ВДПО с такими вариантами полиморфизма гена *BRCA2*.

Взаимодействие генетического полиморфизма и курения в этиологии рака верхних дыхательных и пищеварительных органов

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

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

Оценку роли факторов окружающей среды в этиологии рака верхних дыхательных и пищеварительных органов (ВДПО) и модификации этого эффекта в за-

висимости от генетических вариантов (генотипа), а также идентификацию геномных вариантов, влияющих на риск развития заболевания, на основании сканирования всего генома проводили методом полногеномного исследования генотипа человека (GWAS). В этом исследовании идентифицировано 5 редких вариантов в 3 локусах (4q21, 4q23 и 12q24), которые статистически достоверно влияли на риск рака ВДПО. Выявлены 2 новых варианта 4q21 (rs1494961) и 12q24 (rs4767364), не содержащие известных генов. Кроме того, воспроизведены результаты предыдущего исследования, основанного на гипотезе (candidate gene study), и показано, что у индивидов с редким вариантом генов *ADH7* (rs1573496) и *ADH1B* (rs1229984) риск рака ВДПО понижен. Однако протективный эффект этих редких вариантов был отмечен исключительно у пьющих лиц. Это наблюдение подтверждает гипотезу, что полиморфизм метаболических генов влияет на риск злокачественных опухолей только в случае экспозиции к экзогенному этиологическому фактору и является еще одним доказательством взаимодействия генетического полиморфизма и факторов окружающей среды в этиологии рака.

Экспрессия гена сурвивина (*BIRC5*) в первичной опухоли и циркулирующих опухолевых клетках при раке молочной железы

Е.А. Шляхтунов

УО ВГМУ ордена Дружбы народов, Республика Беларусь

Отдаленные метастазы остаются основной причиной гибели пациенток, страдающих раком молочной железы (РМЖ). Субстратом для развития метастазов являются циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК). Однако один лишь поиск этих клеток недостаточен для формирования полного представления о характере и течении опухолевого процесса у отдельно взятой пациентки. Определение экспрессии опухоль-специфических генов, отвечающих за различные процессы опухолевой прогрессии, позволяет получить более полную картину. К таким генам относится ген сурвивина (*BIRC5*) семейства ингибиторов апоптоза.

Цель работы — изучить экспрессию гена сурвивина (*BIRC5*) в опухолевой ткани карциномы молочной железы, а также в ЦОК периферической крови больных РМЖ.

Материалы и методы. С помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени исследована экспрессия гена сурвивина в 16 образцах первичной инвазивной протоковой карциномы молочной железы, 3 образцах доброкачественной опухоли — фиброаденомы молочной железы, а также в 26 образцах периферической крови больных РМЖ на различных ста-

диях опухолевого процесса и этапах специального лечения и 3 образцах здоровых людей (контроль).

Результаты. В первичной карциноме молочной железы определялась высокая экспрессия гена сурвивина во всех 16 образцах со средним значением ($M \pm m$) $1,405749 \pm 0,492979$ (min — 1,215579; max — 3,408922). Наибольшие показатели экспрессии определялись в опухолях средней и высокой степени злокачественности (G2–3) с лимфовенозной инвазией (LVS1+). В 2 из 3 образцов доброкачественной опухоли экспрессия сурвивина не определялась, а в 1 она составила 0,015569. В ЦОК, выделенных из периферической крови больных РМЖ, во всех 26 образцах также определялась экспрессия гена сурвивина со средним значением ($M \pm m$) $0,903849 \pm 0,193965$ (min — 0,265369; max — 3,908322). В контрольных образцах уровень экспрессии не превышал 0,003393. Следует отметить, что максимальные показатели экспрессии получены в образцах пациенток со стадией N+ и особенно M1 по TNM классификации. Какой-либо закономерной зависимости экспрессии сурвивина от размеров опухоли не выявлено. У пациенток, получающих химиотерапию, уровень экспрессии гена сурвивина был средним, но никогда не приближался к показателям контроля.

Заключение. Определение экспрессии гена сурвивина как в первичной опухоли, так и в ЦОК может рассматриваться как один из перспективных маркеров опухолевой прогрессии и мониторинга терапии РМЖ.

Молекулярные факторы прогноза у больных с диссеминированным раком почки

З.А. Юрмазов¹, Е.А. Усынин¹, Л.В. Спирина^{1,2},
И.В. Кондакова¹, Е.М. Слонимская^{1,2}

¹ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»;

²ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск

Поиск дополнительных информативных прогностических параметров у больных раком почки является актуальной задачей современной онкологии. **Цель исследования** заключалась в изучении прогностической значимости экспрессии транскрипционных факторов, фактора роста VEGF, его рецептора, протеинкиназы m-TOR и активности внутриклеточных протеиназ у больных диссеминированным раком почки в соотношении со шкалой MSKCC.

Материалы и методы. В исследование включены 40 пациентов с метастатическим почечно-клеточным раком (ПКР) T3–4N0–1M1. Согласно шкале MSKCC все больные были распределены на 3 группы: с хорошим ($n = 13$), промежуточным ($n = 26$) и неблагоприятным ($n = 1$) прогнозом. В дальнейшем анализировали группы больных с хорошим и промежуточным прогнозом ($n = 39$). Всем пациентам на I-м этапе проводилась таргетная терапия pazopanibом или everolimusом.

мусом. После окончания курса предоперационного лечения выполнялась паллиативная нефрэктомия. Содержание транскрипционных и ростовых факторов изучено методом иммуноферментного анализа; активность протеасом и кальпаинов — флуориметрическим методом.

Результаты. Исходно высокие уровни экспрессии транскрипционного фактора HIF-1 и ростового фактора VEGF в опухоли почки ассоциированы с хорошим прогнозом заболевания по шкале MSKCC. У этой категории больных на фоне лечения наблюдалось снижение экспрессии транскрипционных

факторов HIF-1, NF-κB p65, NF-κB p50, ростового фактора VEGF и активности протеасом. Выявленное повышение активности кальпаинов у больных с промежуточным прогнозом было ассоциировано с прогрессированием заболевания.

Заключение. Выделены дополнительные молекулярные показатели, повышающие информативность шкалы MSKCC, что позволяет с большей точностью предсказать возможный исход заболевания у больных метастатическим раком почки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ № МД-3637.2015.7.



Издательский дом «АБВ-пресс» специализируется на выпуске периодической научной медицинской литературы, книгопечатной продукции, создании и поддержке сайтов медицинского направления

НАШИ ЖУРНАЛЫ и ГАЗЕТЫ



НАШИ КНИГИ



Книги и наши издания
можно заказать и приобрести
в редакции по адресу:
г. Москва, Каширское ш.,
д. 24, стр. 15
и по телефону:
+7 (499) 929-96-19.
Адрес электронной почты:
abv@abvpress.ru

НАШИ САЙТЫ



www.abvpress.ru



www.oncoproct.ru



www.roou.ru



www.hnonco.ru



www.netoncology.ru



www.urotoday.ru



www.neuromuscular.ru



www.breastcancersociety.ru

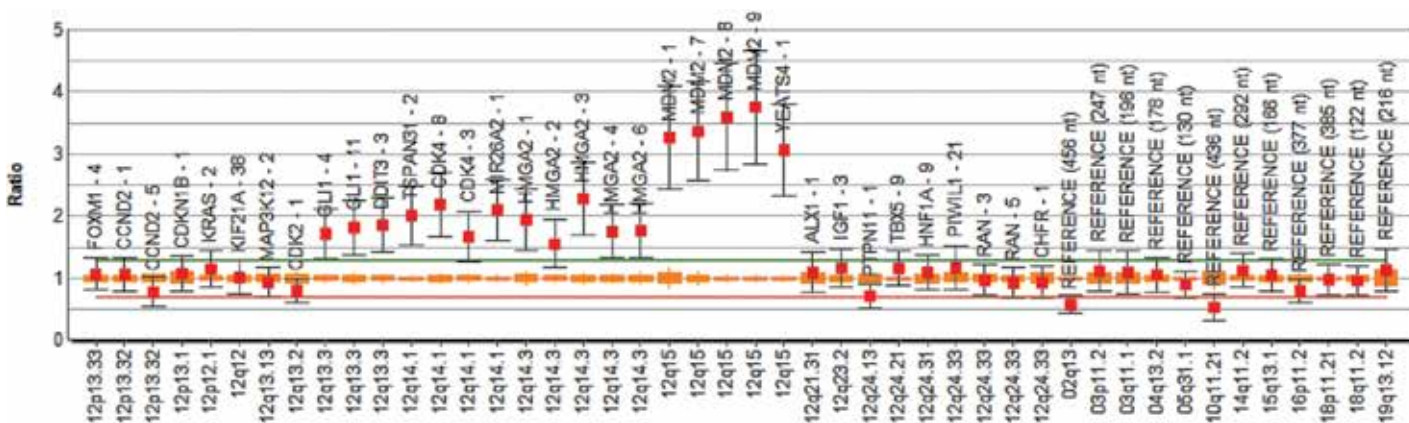
Молекулярные исследования в онкологии с использованием технологии MLPA®

(мультиплексная амплификация лигированных зондов)

- Наборы производства MRC-Holland (Нидерланды)
- Мультиплексная детекция изменения числа копий ДНК на уровне экзонов
- До 50 зондов к различным локусам в одной пробирке
- Дифференциация гетеро- и гомозиготных делеций/дупликаций, выявление амплификации локусов
- Детекция значимых точечных мутаций
- Определение профиля метилирования
- Минимальное количество исследуемого материала – 20 нг ДНК, в том числе частично деградировавшей (выделенной из парафиновых блоков)
- Использование стандартных моделей амплификаторов
- Детекция методом капиллярного электрофореза (фрагментный анализ)
- Автоматическая интерпретация с использованием интуитивно понятного программного обеспечения Coffalyser

Применения в молекулярной онкологии:

- Онкогематология
- Детекция семейных форм рака
- Анализ предрасположенности
- Характеризация опухолей
- Фармакогенетика



CDK4-HMGA2-MDM2: Умеренное увеличение копийности региона 12q13.3-q14.3 (гены CDK4, HMGA2) и высокий уровень амплификации 12q15 региона (гены MDM2 и YEATS4) в ДНК, выделенной из парафиновых блоков ткани, полученной от пациента с липосаркомой (интерпретация данных электрофореза)

ЗАО «БиоХимМак»

119991 Москва, Ленинские горы,
МГУ им. М. В. Ломоносова

Тел. (495) 647-27-40, 939-24-21, e-mail: pcr@biochemmack.ru, www.biochemmack.ru



