

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА»
МИНЗДРАВА РОССИИ

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ



МАТЕРИАЛЫ

*IV Всероссийской конференции
по молекулярной онкологии*

17–19 декабря 2018 г., Москва



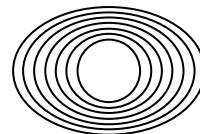
ТОМ 5 № 4
2018

ПРИЛОЖЕНИЕ

Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор, зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью идентификатора цифрового объекта (DOI). Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

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

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Национальный медицинский
исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

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

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Целевая читательская аудитория: онкологи, молекулярные биологи, генетики, биохимики, вирусологи, онкоэпидемиологи, химиотерапевты.

Контент: обзоры, миниобзоры, краткие сообщения и полноразмерные экспериментальные статьи, комментарии ведущих специалистов.

Члены редакционной коллегии и авторы журнала – ведущие российские и зарубежные онкологи, молекулярные биологи, генетики, химиотерапевты и специалисты смежных специальностей.

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

Учредители:
ФГБУ «НМИЦ онкологии
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

Прием статей: онлайн на сайте
<http://umo.abvpress.ru/jour>
или по адресу adv.mol.onc@ronc.ru

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

Руководитель проекта
И.В. Гапонова, +7 (499) 929-96-19,
i.gaponova@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.
2018. Том 5. № 4. Приложение. 1–160

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2018

Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562

Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»

Тираж 1000 экз.

ПРИЛОЖЕНИЕ
4 ТОМ 5
'18

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделом экспериментальной биологии опухолей (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

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

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

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

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Берштейн Лев Михайлович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории онкоэндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр 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)

Бойчук Сергей Васильевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей патологии, декан медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Казань, Россия)

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

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

Животовский Борис Давидович, д.б.н., профессор, лауреат Государственной премии СССР, заведующий лабораторией исследования механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», профессор Каролинского института (Стокгольм, Швеция)

Имянитов Евгений Наумович, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «НМИЦ 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 «НМИЦ онкологии 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)

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

Лазаревич Наталья Леонидовна, д.б.н., профессор, заведующая отделом иммунохимии НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Мазуренко Наталья Николаевна, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории онкогеномики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

Сергеева Наталья Сергеевна, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., директор Департамента комплексных программ и проектов Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Москва, Россия)

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

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

Юрсич Владимир, профессор факультета медицинских наук Университета Крагуеваца (Крагуевац, Сербия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Белицкий Геннадий Альтерович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Гурцевич Владимир Эдуардович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Давыдов Михаил Иванович, д.м.н., профессор, академик РАН, член президиума РАН, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

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

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

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии 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 им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лихтенштейн Анатолий Владимирович, д.б.н., руководитель группы биохимии опухолей отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

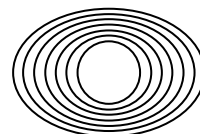
Тюляндин Сергей Алексеевич, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, заместитель директора по научной работе НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

The journal is included in the Scientific Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor; it is registered in the CrossRef, its papers are indexed with the digital object identifier (DOI). The journal's electronic version is available in the DOAJ.

RESEARCH INSTITUTE OF CARCINOGENESIS, N.N. BLOKHIN NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTER
OF ONCOLOGY, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



N.N. Blokhin National Medical
Research Center of Oncology,
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

Target audience: oncologists, molecular biologists, geneticists, biochemists, virologists, cancer epidemiologists, chemotherapists.

Information content: reviews, mini-reviews, brief communications and full-size research articles, comments of leading experts.

Editorial board members and authors of the journal are the leading Russian and foreign oncologists, molecular biologists, geneticists, chemotherapists and specialists of related professions.

FOUNDED IN 2014

APPENDIX
4 Vol. 5
'18

Founders: N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 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
Article submission: on-line
at <http://umo.abvpress.ru/jour>
or by e-mail to adv.mol.onc@ronc.ru

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

Project Manager I.V. Gaponova,
+7 (499) 929-96-19,
i.gaponova@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. 2018. Vol. 5
No. 4. Appendix. 1–160

© PH "ABV-Press", 2018

Pressa Rossii catalogue
index: 93562

Printed at the Mediacolor LLC

1,000 copies

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov Mikhail A., *PhD, DSc, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of Department of Experimental Biology of Tumors (Moscow, Russia)*

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

EDITORIAL BOARD

Berstein Lev M., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Oncoendocrinology of the N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center 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)*

Boychuk Sergey V., *PhD, DSc, Professor, Head of the Department of General Pathology, Dean of the Faculty of Medicine and Biology, Kazan State Medical University (Kazan, Russia)*

Gloushankova Natalia A., *PhD, DSc, Head of the Laboratory of Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Gudkov Andrey V., *PhD, DSc, Professor, Sr. Vice-President for Basic Science and Head of the Department of Cell Stress Biology of the Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, New York, USA)*

Zhivotovskiy Boris D., *PhD, DSc, Professor, Laureate of the State Award of the USSR, Head of the Department of Apoptosis Mechanisms, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Professor of the Karolinska Institute (Stockholm, Sweden)*

Imyanitov Eugeny N., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center 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 National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Karpukhin Aleksander V., *PhD, DSc, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Complex Inherited Diseases of the Medical Genetic Research Center (Moscow, Russia)*

Kzhyskovska Juliya G., *PhD, DSc, Professor, Head of Department of Innate Immunity and Tolerance, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University (Heidelberg, Germany)*

Lazarevich Natalia L., *PhD, DSc, Professor, Head of the Department of the Immunochemistry of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Mazurenko Natalia N., *PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Oncogenomics of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Mirkin Sergey M., *Professor, White Family Department of Biology, Head in Biology Tufts University (Medford, Oregon, USA)*

Sergeeva Natalia S., *PhD, DSc, Professor, Head of the Prognostics of the Efficacy of Conservative Treatment Laboratory of the P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of National Medical Research Radiology Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Stepanova Evgenia V., *PhD, DSc, Director of the Department of Complex Programs and Projects, Ministry of Science and Higher Education of Russia (Moscow, Russia)*

Tchevkina Elena M., *PhD, DSc, Head of the Laboratory of the Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Tcherdyntseva Nadezhda V., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Deputy Director for Research Work, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia)*

Jurisc Vladimir, *Professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Kragujevac, Serbia)*

EDITORIAL COUNCIL

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 National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Gurtsevitch Vladimir E., *PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Davydov Mikhail I., *MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, 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 Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)*

Kopnin Boris P., *PhD, DSc, Professor, Head Researcher at the Cytogenetics Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Kubasova Irina Yu., *PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Kushlinskii Nikolay E., *PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Clinical Biochemistry Laboratory, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Lichtenstein Anatoly V., *PhD, DSc, Head of the Tumor Biochemistry Group, Department of Experimental Tumor Biology of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

Tjulandin Sergey A., *MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, Deputy Director for Scientific Research, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)*

МАТЕРИАЛЫ

IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии

17–19 декабря 2018 г., Москва

MATERIALS

of the 4th All-Russian Conference on Molecular Oncology

Moscow, 17–19 December 2018

МАТЕРИАЛЫ IV ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

Канцерогенные факторы окружающей среды, эпидемиология и первичная профилактика опухолей	8
Геномика и эпигеномика злокачественных новообразований	23
Молекулярные механизмы злокачественной трансформации	47
Биология и метастазирование опухолей (памяти проф. Ю.М. Васильева)	60
Современные подходы к разработке противоопухолевых препаратов	79
Молекулярная диагностика и терапия опухолей (памяти профессора Г.И. Абелева)	107
Вирусология и иммунология опухолей	140
Список сокращений	160

MATERIALS OF THE 4TH ALL-RUSSIAN CONFERENCE ON MOLECULAR ONCOLOGY

Environmental carcinogens, epidemiology and cancer prevention	8
Genomics and epigenomics of malignant neoplasms	23
Molecular mechanisms of malignant transformation	47
Tumor biology and metastasis (Yury M. Vasil'ev memorial section)	60
Modern approaches to anti-cancer drug design	79
Molecular diagnostics and therapy of cancer (Garry I. Abelev memorial section)	107
Virusology and tumor immunology	140
List of Abbreviations	160

КАНЦЕРОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ПЕРВИЧНАЯ ПРОФИЛАКТИКА ОПУХОЛЕЙ

Доклады

Лекарственный канцерогенез и возможности его профилактики

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

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

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

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

Ряд лекарственных препаратов обладает канцерогенными свойствами. В их числе противоопухолевые цитостатики, анальгетики-антипиретики, иммуномодуляторы, гормональные препараты и некоторые другие. Основным поражаемым контингентом являются больные, излеченные с помощью химиотерапии (ХТ) от злокачественных новообразований. Через 5–10 лет после окончания лечения вероятность возникновения у них второго онкологического заболевания, чаще всего острого лейкоза, резистентного к терапии, увеличивается в несколько раз.

Отличительной особенностью лекарственного канцерогенеза является то, что известен характер канцерогенного воздействия, время его начала и окончания и что латентный период длится несколько лет. Поскольку все события в данном случае подчиняются законам химического канцерогенеза, данный период представляет собой стадию промоции, при которой происходит эволюция клонов, находящихся на разных стадиях опухолевой трансформации. Это время должно быть исполь-

зовано для профилактики вторичного канцерогенеза. Во-первых, необходимо предотвратить дальнейшее накопление мутаций от действия профессиональных и бытовых канцерогенов, в частности табачного дыма. Во-вторых, важно ингибировать прогрессию трансформированных клонов, рост и автономизацию которых стимулируют многие неустраняемые факторы внешней среды. В частности, инсектициды, фунгициды и пестициды вместе с другими убиквитарно распространенными ксенобиотиками стимулируют ангиогенез, нарушают и перепрограммируют метаболические процессы, ингибируют апоптоз и т.д. С учетом этого профилактика химического канцерогенеза, помимо гигиенических мероприятий, направленных на изъятие и замену канцерогенных препаратов, требует использования нетоксичных антиканцерогенных соединений с широким диапазоном действия.

Этим требованиям в наибольшей степени соответствуют природные полифенолы растительного происхождения, находящиеся в большинстве овощей и фруктов. Показано, что они стимулируют апоптоз, влияя на активность Bax/Bcl², Survivin, рецептор DR5 и p53, стимулируют остановку клеточного цикла через воздействие на циклины и циклинзависимые киназы, ингибируют пролиферацию и выживание мутантных клеток через EGFR, IGF, MAPK, P13K/Akt/mTOR NF-κB, WNT/β-катенин Hedgehog, ингибируют ангиогенез (VTGF, VEGFR2), а также инвазию и метастазирование. Кроме того, они препятствуют прогрессии трансформированных клонов путем воздействия на эпигенетические процессы – метилирование ДНК и модификацию гистонов.

Высокопроизводительное секвенирование для прецизионной онкологии

П.Б. Натальин

Thermo Fisher Scientific, Genetic Sciences & Clinical Next-Generation Sequencing, Москва

Современная тенденция развития онкологии и медицины в целом состоит в ее возрастающей персонализированности и прецизионности. Генетические биомаркеры будут преобладать в сфере профилирования опухолей и подбора таргетной терапии. Персонализированными являются 73 % разрабатываемых сегодня лекарств от рака.

Доклад посвящен последним достижениям компании Thermo Fisher Scientific в области разработки тест-систем на основе высокопроизводительного секвенирования для молекулярного профилирования твердых опухолей, жидкостной биопсии и иммуноонкологии, гематоонкологии и педиатрической онкологии. Приведены данные по внутренней и внешней валидации и верификации тест-систем.

Системный анализ влияния солнечной радиации и дыма лесных пожаров на риск развития злокачественных новообразований у детей

С.К. Пинаев¹, А.Я. Чижов²

¹ФГБУН «Вычислительный центр Дальневосточного отделения Российской академии наук», Хабаровск;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Солнечная радиация и дым являются общепризнанными факторами риска развития злокачественных новообразований (ЗН) у детей. Изучение влияния солнечной активности и дыма лесных пожаров на заболеваемость детей ЗН представляет интерес для оценки ситуации в регионе и получения новых знаний о причинах этой патологии.

Проведен системный анализ влияния солнечной радиации и дыма лесных пожаров на риск возникновения ЗН в популяции детей младшего возраста (0–4 года) на территории Хабаровского края. Изучена уточненная заболеваемость ЗН в популяции детей младшего возраста в когорте 1972–1988 гг. рождения, проведен парный регрессионно-корреляционный и многофакторный анализ для оценки влияния на частоту отдельных форм ЗН солнечной активности и числа пожаров в год рождения детей, за 1, 2 и 3 года до рождения и через 1, 2 и 3 года после рождения.

Выявлена прямая линейная зависимость между числом пожаров за 2 года до рождения детей и частотой развития лейкоза ($r = 0,545$; $p = 0,036$), а также лимфогранулематоза ($r = 0,726$; $p = 0,001$). В год рождения детей частота эмбриональных опухолей зависела от числа пожаров ($r = 0,866$; $p = 0,005$). Количество пожаров через 1 год после рождения детей оказалось связанным с заболеваемостью опухолями центральной нервной системы ($r = 0,533$; $p = 0,028$), а с пожарами через 2 года после их рождения установлена дополнительная связь с частотой лимфогранулематоза ($r = 0,779$; $p = 0,023$). От активности солнца за 2 года до рождения детей зависела частота развития неходжкинских лимфом, а через 3 года после их рождения солнечная активность была связана с заболеваемостью лейкозом ($r = 0,567$; $p = 0,018$). Многофакторный анализ установил наличие достоверной сильной множественной корреляции ($R = 0,714$; $F(2, 12) = 6,240$; $p < 0,014$) числа пожаров за 2 года до рождения детей, активности солнца через 3 года после их рождения с частотой развития лейкоза.

Таким образом, установлена связь частоты развития ЗН у детей с активностью солнца и воздействием дыма лесных пожаров. Для уменьшения риска ЗН у детей будущим родителям рекомендуется начиная с периода за 1–2 года до планируемого зачатия, а мамам во время беременности и лактации употреблять достаточное количество витаминов и проводить иммунореабилитацию препаратами трансфер-фактора.

Онкологический риск у медицинских работников

Л.Г. Соленова, Е.А. Некрасова, М.Г. Якубовская

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

Труд медицинских работников, численность которых в России составляет более 2 млн, сопряжен с экспозицией к вредным производственным факторам физической, химической и биологической природы, действующим в комплексе с высокими психоэмоциональными нагрузками. Данные масштабных эпидемиологических исследований, проведенных в разных странах, свидетельствуют о повышенном риске развития злокачественных новообразований у врачей и медицинских сестер: рака молочной железы (РМЖ), рака кожи, головного мозга и других локализаций. Повышенный риск злокачественных новообразований легкого, РМЖ, рака матки, яичников, головного мозга связывают с воздействием на медицинский персонал ионизирующей радиации. Экспозиция к цитостатикам повышает у медицинских работников-женщин риск врожденных пороков развития у детей, спонтанных аборт, РМЖ. В России отмечается тенденция нарастания числа аварийных ситуаций, связанных с производственными

травмами, ведущими к нарушению кожных покровов и чреватых заражением медицинского персонала трансмиссивными инфекциями, несущими канцерогенный риск (вирусами гепатита В и С, вирусом иммунодефицита человека). Занятость медицинских работников в ночных сменах ведет к нарушению репродуктивной функции, гиперпластическим процессам в молочной железе и матке, повышенному риску развития РМЖ. С позиции профилактики злокачественных новообразований представляется оправданным и перспективным использование методов молекулярной биологии, позволяющих определить влияние канцерогенных факторов на организм работника на стадии, при которой эффект проявляется не в клинически выраженной форме, а в виде изменения биохимических и иммунологических показателей, повышения уровней оксидативного

стресса и генотоксического повреждения. В последнее десятилетие для оценки уровня повреждения ДНК широкое распространение в различных исследованиях получил «комет-тест». Применительно к профессиональной группе медицинских работников использование этих методов для разработки профилактических мероприятий особенно актуально с учетом низких уровней воздействия, которые, действуя в течение длительного времени, могут реализоваться в виде онкологических заболеваний.

Необходимы отечественные эпидемиологические исследования онкологического риска у медицинских работников, оценки численности медицинских контингентов, подвергающихся воздействию канцерогенных агентов на рабочем месте, для разработки адекватных мер профилактики рака.

Постеры

Возможности сканирующей электронной микроскопии для изучения эритроцитов больных раком шейки матки

И.В. Кононова¹, С.Н. Мамаева², Л.Н. Афанасьева³,
П.В. Никифоров³, С.Р. Антонов², А.С. Гольдерова²,
Ф.А. Захарова², М.П. Кириллина^{1,2}, А.Н. Павлов²,
Н.А. Николаева²

¹ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных
медицинских проблем», Якутск;

²ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет
им. М.К. Аммосова», Якутск;

³ГБУ РС (Я) «Якутский республиканский онкологический
диспансер», Якутск

Введение. Сканирующая (растровая) электронная микроскопия предоставляет возможность получать изображения нанометрового пространственного разрешения. При использовании низкого напряжения какого-либо специального покрытия биологических образцов не требуется. Это позволяет более детально изучать топографию поверхности эритроцитов.

Задачи исследования. Получить изображения поверхности эритроцитов высокого разрешения у пациентки с впервые выявленным раком шейки матки (РШМ) (45 лет) и женщины без признаков инфицирования вирусом папилломы человека (ВПЧ) (49 лет), а также выявить различия.

Материалы и методы. Исследованы 3 образца: 1) от пациентки с верифицированным РШМ; 2) от пациентки без признаков инфицирования, находящейся в состоянии обычной для нее физиологической активности; 3) от этой же женщины через 1 ч после физической нагрузки (бег 3 км). Образцы представляли собой мазки венозной крови, забранной в вакуумные пробирки с ЭДТА, приготовленные на предметных стеклах и высушенные на воздухе при температуре 20–22 °С. Изображения получены с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-7800F (JEOL Ltd, Япония) при низком напряжении (1 кВ).

Результаты. Получены черно-белые изображения эритроцитов под различным увеличением из центральной части мазков крови. Максимальное увеличение, позволяющее детализировать топографию и объекты наноразмерного диапазона на поверхности эритроцитов, было кратно 20 000. На снимках каждого образца обнаруживается неоднородность поверхности клеток, заметны округлые светлые включения нанометровых размеров (до 200 нм в диаметре), в меньшем количестве — темные точки («поры») сходного размера.

Из различий замечены «эрозии» поверхности эритроцитов нечетко округлой формы до 1 мкм в диаметре в образцах больной РШМ и пациентки без признаков инфицирования после пробежки. «Эрозии», вероятно, указывают на наличие окислительного стресса в организме. Однако у пациентки без признаков инфицирования «эрозии» имеют более четкие границы. Только у пациентки с РШМ обнаружены эритроциты с выпячиваниями (6 % всех эритроцитов в поле зрения), занимающими площадь от 1/6 до 2/5 общей площади клетки.

Выводы. Сканирующая (растровая) электронная микроскопия позволяет получить изображения эритроцитов венозной крови с разрешением до нанометрового диапазона и может быть использована для исследований в онкологии.

Органические растворители как эпигенетические регуляторы экспрессии генов

В.П. Максимова¹, П.Е. Бугаева², О.Г. Усалка²,
Н.К. Чепелова², Е.М. Жидкова¹, О.П. Лизогуб²,
Д.А. Федоров², М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,3}

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

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России, Москва;

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
Москва

Введение. Воздействие органических растворителей на человека является одним из основных профессиональных рисков в химической промышленности. Контакт с данными химическими агентами может повлечь за собой нарушения в работе систем органов человека: нервной, дыхательной, зрительной, репродуктивной. Для снижения отрицательного влияния на здоровье при работе с органическими растворителями необходимо изучить все возможные пути воздействия на человека, среди которых особое место занимают эпигенетические механизмы регуляции транскрипции.

Задачи исследования. Изучение влияния органических растворителей на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов.

Материалы и методы. Исследуемые соединения — ацетон, ацетонитрил, метанол, меркаптоэтанол, ДМСО, толуол, 1,4-диоксан. Эпигенетическую активность соединений определяли методом проточной цитофлуориметрии на тест-системе HeLa T1. Влияние растворителей на изменение уровня модификаций

гистонов исследовали с помощью метода вестерн-блоттинг. Исследование изменения уровня экспрессии генов *HDAC1*, *SETD1A*, *SETD1B*, *SIRT1*, *GCN5*, *HAT1* и *ORF-1* осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на клеточных линиях HeLa T1 и SiHa соответственно. Влияние растворителей на уровень метилирования области LINE-1 изучали с помощью метода пиросеквенирования с бисульфитной конверсией на клеточной линии SiHa.

Результаты. В рамках текущего исследования мы продемонстрировали, что исследуемые органические растворители в нетоксических концентрациях обладают способностью к реактивации эпигенетически репрессированного вектора, несущего ген *GFP*. Кроме того, мы показали, что механизм действия данных соединений связан с увеличением уровня ацетилирования гистона H3 в лизине 9 (H3acK9) (метка, характерная для активно транскрибируемого хроматина), а также с понижением уровня метилирования сайтов H3me³K9 и H4me³K20 (метки, характерные для гетерохроматина). При этом мы обнаружили, что это изменение посттрансляционных модификаций может быть связано с подавлением экспрессии гена *HDAC1*. Данный ген кодирует белок, который деацетилюет гистон H3 и репрессировывает транскрипцию.

Кроме этого, в рамках настоящей работы мы продемонстрировали, что исследуемые органические растворители снижают уровень метилирования длинных диспергированных повторов ДНК (последовательность LINE-1), а также повышают уровень экспрессии гена *ORF-1*, находящегося в области LINE-1, что также говорит о снижении уровня интегрального метилирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-75-00115).

Длина теломер и риск развития злокачественных опухолей

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

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Результаты ранее проведенных исследований о влиянии относительной длины теломер в лимфоцитарной фракции периферической крови на риск

развития злокачественных опухолей весьма противоречивы.

Задачи исследования. На основании современного статистического анализа результатов полногеномных исследований (Genome-Wide Association Studies, GWAS) изучена связь длины теломер с риском развития рака почки, легкого и опухолей органов головы и шеи.

Материалы и методы. Использованы данные, полученные в 6 полногеномных исследованиях, в которые были включены 10784 пациента с диагнозом рака почки и 20000 лиц контрольной группы. Были протестированы 9 различных вариантов длины теломер.

Результаты. Наличие более длинных теломер ассоциировалось с повышенным риском рака почки (относительный риск (ОР) 2,07; 95 % доверительный интервал (ДИ) 1,70–2,53; $p < 0,0001$). Даже после исключения из анализа 2 вариантов длины теломер, создающих картину некоторого неравновесия, сохранялась стабильная и статистически достоверная зависимость риска развития заболевания от этой величины (ОР 1,73; 95 % ДИ 1,36–2,21; $p < 0,0001$). Риск рака почки в зависимости от гистологического типа опухоли был также связан с этим параметром: более длинные теломеры повышали риск светлоклеточного и папиллярного рака (ОР 1,93; 95 % ДИ 1,50–2,49; $p < 0,0001$; ОР 1,96; 95 % ДИ 1,01–3,81; $p = 0,046$ соответственно); в 2 раза и также возрастал риск хромофобного рака (ОР 2,37; 95 % ДИ 0,78–7,17; $p = 0,13$).

Риск рака легкого, связанный с длиной теломер, изучался в группе, состоящей из 16396 пациентов с диагнозом рака легкого и 13013 лиц контрольной группы. Показано, что увеличение длины теломер на 1000 базовых пар повышает на 40 % риск рака легкого (ОР 1,41; 95 % ДИ 1,20–1,65) и почти в 2 раза риск аденокарциномы легкого (ОР 1,92; 95 % ДИ 1,51–2,22). На риск плоскоклеточного рака легкого и опухолей органов головы и шеи длина теломер не влияла.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о наличии статистически достоверной связи длины теломер с риском рака почки и легкого, особенно аденокарциномы легкого. Высказано предположение о том, что индивиды с наследуемой предрасположенностью к более длинным теломерам находятся в группе повышенного риска развития рака этих локализаций.

Тезисы

Ретроспективное изучение смертности от злокачественных новообразований на примере предприятий металлургии меди

В.И. Адриановский^{1,2}, Г.Я. Липатов^{1,2}, Е.А. Кузьмина¹,
Н.В. Злыгостева¹, Т.С. Устюгова¹, И.И. Адамцева¹

¹ФБУН «Екатеринбургский медицинский научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий», Екатеринбург;

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург

В современной металлургии меди работники подвержены воздействию бенз(а)пирена, кадмия, мышьяка, никеля, свинца, что обуславливает канцерогенную опасность медеплавильного производства. В связи с этим проведено эпидемиологическое исследование показателей смертности от злокачественных новообразований работающих (мужчин и женщин), занятых в обогащении медьсодержащего сырья, получении черновой меди методом отражательной плавки и огневом рафинировании меди, ретроспективным методом.

На обогатительной фабрике у мужчин превышение наблюдаемых показателей смертности над ожидаемыми отмечено как по всем локализациям опухолей, вместе взятым (3,43 раза), так и по раку органов дыхания (3,76 раза, в том числе по злокачественным новообразованиям трахеи, бронхов, легкого — 3,39 раза), пищеварения (3,47 раза, в том числе по раку желудка — 3,84 раза, по раку поджелудочной железы — 8,04 раза ($p < 0,05$)). Среди женщин обогатительной фабрики превышение наблюдаемых показателей смертности над ожидаемыми по всем локализациям составило 2,76 раза ($p < 0,05$).

В металлургическом цехе, использующем отражательную плавку, у мужчин превышение наблюдаемых показателей смертности над ожидаемыми отмечено как по всем локализациям, вместе взятым (1,8 раза), так и по раку органов дыхания (2,42 раза; $p < 0,05$). У женщин металлургического цеха превышение наблюдаемых показателей смертности от злокачественных новообразований по всем локализациям составило 3,13 раза ($p < 0,05$).

В медеплавильном цехе, где осуществляется огневое рафинирование меди, наибольшая кратность превышения наблюдаемой смертности над ожидаемой отмечена среди мужчин: 3,81 раза по всем локализациям, вместе взятым, в том числе 5,19 раза по раку легкого ($p < 0,05$). Среди женщин медеплавильного

цеха превышение наблюдаемых показателей смертности над ожидаемыми по всем локализациям составило 2,85 раза ($p > 0,05$).

Таким образом, ретроспективный анализ онкологической смертности рабочих, занятых на разных этапах пирометаллургического производства меди, выявил достоверное увеличение развития злокачественных новообразований с преимущественной локализацией в органах дыхания и пищеварения, связанных с воздействием неорганических соединений мышьяка, кадмия, никеля и свинца.

Эпидемиология и некоторые аспекты молекулярной диагностики билатерального рака молочной железы

С.А. Бехтерева^{1,2}, А.С. Доможирова^{1,2}, Е.Н. Имянитов³,
А.В. Важенин^{1,2}

¹ГБУЗ «Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины», Челябинск;

²ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

В России РМЖ занимает 1-е место в структуре онкологической заболеваемости у женщин и в 2016 г. составил 21 %. Первично-множественный РМЖ относится к генетически обогащенным случаям рака, механизмы возникновения которого весьма разнообразны.

По данным ЧОКЦОиЯМ за 15 лет (1999–2013 гг.), частота развития первично-множественного РМЖ составила 10,4 % (из 6452 больных РМЖ первично-множественный диагностирован у 486 пациентов). Преобладал метахронный первично-множественный РМЖ ($n = 312$), синхронный выявлен у 123 больных, тройной локализации — у 42, по 4 опухоли — у 9. Чаше РМЖ был второй опухолью ($n = 191$), первой — у 152 больных, третьей — у 19, четвертой — у 1. Интервал возникновения между первой и второй опухолью составил 8,83 года, между второй и третьей — 6,53 года. Средний возраст больных с первой опухолью — 47,6 года, со второй — 54,4 года, что меньше, чем у больных солитарным РМЖ. Билатеральный РМЖ выявлен у 93 больных. Из этой группы 57 пациентов вошли в многоцентровое молекулярно-диагностическое исследование по идентификации редких рецессивных аллелей с повышенным риском развития РМЖ. Всего в исследование

были включены 360 больных билатеральным РМЖ (273 случая из НМИЦ онкологии им. Петрова). Выявлены биаллельные мутации *aa* и их связь с отягощенным семейным анамнезом у матери.

Результаты проведенного многоцентрового исследования демонстрируют роль рецессивных детерминант предрасположенности к билатеральному РМЖ без семейного анамнеза, в то время как внимание сосредоточено на кластер-эффекте «семейного рака» для идентификации доминантных предрасполагающих мутаций путем анализа сцепления обширных родословных, что может быть использовано в целях вторичной профилактики РМЖ.

Цитологический скрининг рака шейки матки в женских смотровых кабинетах Челябинской области

А.Г. Бочкова¹, А.С. Доможирова^{1,2}, И.А. Аксенова^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск;
²ГБУЗ «Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины», Челябинск

Введение. В ранней диагностике злокачественных новообразований шейки матки первостепенное значение имеет организация качественной цитологической диагностики, т.е. активного цитологического скрининга, достоверность которого не зависит от стадии заболевания и может составлять 89,7–96,3 %. Благодаря высокой информативности, простоте, легкости и безопасности получения материала цитологическое исследование широко применяется в системе массовых профилактических осмотров среди женского населения.

Материалы и методы. В работе использованы материалы компьютерной базы данных Популяционного ракового регистра Челябинской области (ЧО) о впервые выявленных больных со злокачественными новообразованиями шейки матки в период с 2010 по 2017 г. включительно, а также отчеты о работе смотровых кабинетов учреждений здравоохранения муниципальных образований ЧО за указанный период.

Результаты. В ЧО в настоящее время функционируют 176 смотровых кабинетов, из них женских — 106. С применением традиционного цитологического метода в смотровых кабинетах ЧО обследованы от 85,0 % в 2010 г. до 96,2 % в 2017 г. женщин, при том что охват цитологическим обследованием должен «стремиться» к показателю, равному 100 %. Общее количество взятых цитологических мазков за указанный период времени составило около 3,8 млн (в среднем более 450 тыс. мазков в год). Цитологическим методом злокачественный процесс шейки матки в 2010 г. был верифицирован в 53 случаях (0,01 % обследованных), в 2017 г. — в 77 (0,02 % обследованных). Важно пони-

мать, что точность цитологического теста вариабельна и зависит от многих объективных и субъективных факторов, таких как методика забора материала, техника приготовления мазков и квалификации врача-цитолога.

В ежегодных отчетах смотровых кабинетов в качестве одного из критериев оценки качества их работы выступает показатель информативности цитологического исследования. По данным отчетов смотровых кабинетов ЧО, максимальный процент неинформативных цитологических исследований зафиксирован в 2010 г. — 1,3 % (5758 мазков), минимальный в 2017 г. — 0,5 % (2760 мазков). Таким образом, на сегодняшний день отмечена положительная тенденция в снижении числа неинформативных цитологических мазков, что говорит о совершенствовании профессиональных навыков забора материала у работников смотровых кабинетов.

Выводы. Приведенные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования цитологического скрининга в регионе, а именно в будущем постепенный переход на метод жидкостной цитологии, создание компьютерного учета контингента женщин, подлежащих скринингу, контроль за процентом охвата скринингом прикрепленного населения, обеспечение ежегодной сменяемости контингента женщин, проходящих скрининг, и снижение общего числа неинформативных цитологических мазков.

Эффективность организационной модели смотровых кабинетов Челябинской области в раннем выявлении злокачественных новообразований женских половых органов на основе анализа показателей выживаемости

А.Г. Бочкова¹, А.С. Доможирова^{1,2}, И.А. Аксенова^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск;
²ГБУЗ «Челябинский областной клинический центр онкологии и ядерной медицины», Челябинск

Задачи исследования. Оценить результативность работы женских смотровых кабинетов Челябинской области (ЧО) в улучшении показателей кумулятивной скорректированной выживаемости больных со злокачественными новообразованиями женских половых органов за период с 2005 по 2015 г.

Материалы и методы. На основе базы данных Популяционного ракового регистра ЧО впервые рассчитаны показатели кумулятивной скорректированной выживаемости больных со злокачественными новообразованиями шейки матки ($n = 424$), тела матки

($n = 421$) и яичников ($n = 203$), выявленными в смотровых кабинетах ЧО (основная группа), и со злокачественными новообразованиями шейки матки ($n = 3702$), тела матки ($n = 5558$) и яичников ($n = 3679$), выявленными при других обстоятельствах (диспансеризации, самостоятельном обращении и др.) (группа контроля), с учетом возраста заболевших, стадии заболевания в период с 2005 по 2015 г. Расчеты показателей выживаемости осуществляли по классическим методам анализа данных на популяционном уровне.

Результаты. Ежегодно в женских кабинетах осматривают более 450 тыс. женщин в возрасте 18 лет и старше. В основной группе преобладали больные с локализованным опухолевым процессом – общее число больных со злокачественными новообразованиями шейки матки с I–II стадиями заболевания составило 50,6 % против 42,3 % в группе контроля, со злокачественными новообразованиями тела матки – 86,9 % против 80,2 % соответственно. В отношении злокачественных новообразований яичников достоверных различий не выявлено – более 60 % всех случаев овариального рака диагностируют на III–IV стадиях (в основной группе – 61,8 %, в группе контроля – 65,4 %). При статистическом анализе данных по возрастным периодам в 2 исследуемых группах достоверных различий не найдено. Наибольшее число больных со злокачественными новообразованиями шейки матки в основной группе и группе контроля находятся в возрастном диапазоне 40–59 лет (50 и 47 % соответственно), т. е. в пре- и менопаузальном периоде, со злокачественными новообразованиями тела матки и яичников – 50–69 лет (более 60 %), т. е. на 10 лет старше.

Проведенный анализ базы Популяционного ракового регистра ЧО за 10-летний период позволил установить положительную динамику в увеличении показателей 5-летней кумулятивной скорректированной выживаемости больных со злокачественными новообразованиями шейки и тела матки во всех возрастных группах со II–III стадиями заболевания, выявленными активно в смотровых кабинетах ЧО по сравнению с группой контроля: 78,2 и 45,1 % против 70,6 и 39,9 % соответственно для больных со злокачественными новообразованиями шейки матки; 84 и 53 % против 66,8 и 42,3 % соответственно для больных со злокачественными новообразованиями тела матки. В отношении овариального рака достоверных различий в показателях 5-летней выживаемости не выявлено (67,3 и 28,8 % против 64,6 и 31,2 % соответственно).

Выводы. Таким образом, смотровые кабинеты – эффективная организационная модель вторичной профилактики рака на территории ЧО.

Роль генетического скрининга при ретинобластоме

М.С. Гильдиева, Р.Х. Усманов, З.С. Исламов,
А.А. Абдувалиев

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр онкологии и радиологии Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан

Задачи исследования. Установить частоту встречаемости семейных и спорадических форм ретинобластомы.

Материалы и методы. Среди обратившихся в онкофтальмологическое отделение РСНПМЦОиР МЗ РУз были обследованы 48 больных ретинобластомой и их семьи. Анкеты заполнены для всех больных (пробандов), из них только в 30 (62,5 %) из 48 семей получена информация о нескольких поколениях (3–4), в остальных случаях (37,5 %) информация касалась 2 поколений – родители и дети. Проведен анализ анкет, и составлены родословные.

Результаты. Из 30 родословных достоверно известно, что в 24 семьях родители пробандов (больных ретинобластомой) являются родственниками. В этих семьях наиболее часто случаются спонтанные аборт и/или дети погибают до года, что свидетельствует о высоком уровне пороков развития, несовместимых с жизнью, также возможно присутствие сильной хромосомной патологии. Эти семьи можно включить в группу с синдромом «раковая семья». В нашем исследовании таких «раковых семей» было 13 из 30.

Поиск и выявление изменений в гене имеют определяющее значение для обнаружения групп риска среди членов «раковых семей». Таким образом, клинико-генеалогический анализ позволил обнаружить наследственные и спорадические формы ретинобластомы. Так из 30 обследованных семей в 4 имеются родственники только с ретинобластомой, в 5 – у родственников старшего поколения (бабушки, дедушки, тети, дяди), а также у двоюродных братьев и сестер зафиксирована слепота. В 3 семьях пробандов ретинобластома сочеталась с онкопатологией желудочно-кишечного тракта, а в 1 семье – еще и с РШМ, в 2 семьях – с раком головного мозга.

Заключение. В 13 (43 %) из 30 семей наблюдается наследственная предрасположенность к онкопатологии – «раковая семья», из которых в 8 обнаружена наследственная форма ретинобластомы. Спорадическая ретинобластома присутствовала в 17 (57 %) из 30 семей. Поиск и выявление изменений в геноме могут иметь определяющее значение для отбора групп риска среди здоровых сибсов в возникновении у них онкопатологий.

Модулирование активных форм оксида азота и индуцибельной NO-синтазы ингредиентами растительных продуктов при ингибировании канцерогенеза

В.П. Дерягина, Н.И. Рыжова, Л.А. Савлущинская,
Л.В. Кривошеева, И.С. Голубева

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Результаты клинических исследований показывают, что экспрессия индуцибельной NO-синтазы (iNOS) положительно коррелирует с прогрессией опухолей легкого, предстательной железы, молочной железы, пищевода и др. Продуцируемый iNOS оксид азота (NO), особенно его активные формы (AФНО) – N_2O_3 , NO_2 , ONOO и др., – оказывают генотоксическое действие, вызывают химическую модификацию онкогенных белков и др. Биологически активные компоненты растительных продуктов с выраженными антиоксидантными свойствами могут инактивировать AФНО, а также блокировать активацию факторов, инициирующих образование NO. На моделях химически индуцированных, спонтанных и перевиваемых опухолей нами показано, что уровень образования AФНО и экспрессия iNOS зависят от временных параметров роста опухолей и их гистогенеза. Изучение действия фенольных кислот и селенообогащенных продуктов выявило выраженные противоопухолевые эффекты у галловой, танниновой кислот и спирулины-Se (от 27 до 91 %) на фоне снижения образования AФНО у мышей с карциномой Эрлиха. Источники флавоноидов – пикногенол и красный перец-Se – тормозили рост опухолей на 31–65 %, при этом регистрировали стимулирование образования AФНО. Стимулирующее действие высокой дозы пикногенола и красного перца-Se наблюдалось на поздних сроках роста опухолей, когда противоопухолевые эффекты веществ отсутствовали. По данным литературы, около 75 % биологически активных компонентов растительных продуктов (компоненты овощей, фруктов, ягод, цельных злаков, бобовых, специй и др.) снижают уровни iNOS и AФНО в опухолевой ткани, 20 % оказывают разнонаправленное действие на экспрессию/активность фермента и 5 % не влияют на его функцию на фоне ингибирования опухолевого процесса. Полифенолы, каротиноиды, пентациклические тритерпены, ретиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты, витамины обладали мультитаргетным механизмом действия, оказывая модулирующее влияние на различные молекулы мишени: NF-kB, VEGF, Vcl-2, COX-2, АКТ и PI3K и др.

Таким образом, с учетом данных литературы и собственных экспериментальных результатов можно

считать оправданной стратегию, скорее направленную на снижение активности iNOS, чем на ее стимуляцию с помощью коррекции диеты с обязательным включением в нее растительных продуктов, содержащих биологически активные компоненты.

Связь генов семейства HIF и его ключевого гена EPAS1 с риском развития аденокарциномы легкого

В.А. Драудин-Крыленко¹, В.А. Юрченко¹, М.В. Гаас²,
Д.М. Максимович¹, А.Ф. Мукерия¹, О.В. Шаньгина¹,
Д.Г. Заридзе¹

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

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

Введение. Рак легкого занимает в мире лидирующую позицию в структуре заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований. Немелкоклеточный рак (НМРЛ), включающий аденокарциному, плоскоклеточный рак и крупноклеточный рак, составляет 85 % всех случаев рака легкого. Результаты исследований последних лет выявили, что генетические факторы играют существенную роль в возникновении и развитии НМРЛ, действуя в ряде случаев независимо от фактора курения и других канцерогенных воздействий. В последние годы современный метод полногеномного поиска ассоциаций (Genome-Wide Association Studies, GWAS) позволил выявить по крайней мере 5 локусов (на 3, 5, 6, 13 и 15-й хромосомах), ассоциированных с риском НМРЛ у жителей европейской популяции. Метод GWAS сам по себе способен выявить локусы, ассоциированные с раком, но не может позволить изучить механизмы сложных синергических взаимодействий этих локусов и продуцируемых ими белков.

Задачи исследования. Провести интеграционный анализ массива данных GWAS и транскриптомных профилей в отношении генов семейства HIF (гипоксия-индуцированных факторов) и ключевого гена этого семейства – EPAS1.

Материалы и методы. В работе был использован клинический материал, полученный от 1000 пациентов, подобранных по полу, возрасту и статусу курения, с гистологически подтвержденным диагнозом НМРЛ и 1000 пациентов контрольной группы. ДНК была генотипирована с использованием Human610-Quad BeadChip (Illumina, San Diego, CA). Массив данных GWAS и транскриптомные профили были проанализированы с помощью программы MetaCore GeneGo, применяемой для функционального анализа омик-данных.

Результаты. Обнаружен ранее неизвестный вариант полиморфизма (SNP) на участке, на котором

расположен ген *EPAS1* семейства HIF, статистически достоверно повышающий риск НМРЛ (ОР 1,50; 95 % ДИ 1,31–1,72; $p = 7,75 \times 10^{-9}$). По данным транскриптомного анализа, в опухолевой ткани экспрессия *EPAS1* относительно низка и сравнима с показателями в нормальной ткани легкого.

Выводы. При использовании интегрированного анализа и последующего секвенирования идентифицированной геномной сети выявлен новый локус, ассоциированный с риском НМРЛ. Этот локус расположен на *EPAS1*, ключевом гене семейства HIF, белки которого участвуют практически во всех стадиях развития и прогрессирования рака. Поскольку этот локус связан с эпигенетической регуляцией, наблюдаемая нами низкая экспрессия *EPAS1* в опухолевой ткани требует дополнительных исследований взаимоотношений между генетическим полиморфизмом, метилированием ДНК и экспрессией *EPAS1*.

Показатели заболеваемости и смертности от рака шейки матки в Республике Карелия

П.И. Ковчур, О.В. Лазаревич, О.В. Курмышкина,
Т.О. Волкова

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск

Введение. Снижение смертности от РШМ обусловлено снижением заболеваемости инвазивными формами за счет организованного цитологического скрининга и охвата этим скринингом женского населения.

Задачи исследования. Изучить динамику заболеваемости РШМ и смертности от него среди женщин в Республике Карелия (РК) и определить частоту выявления *in situ* РШМ при проведении цитологического скрининга.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ материала от 733 пациенток с преинвазивным (*in situ*) РШМ и 1555 больных инвазивным РШМ за 20-летний период (1998–2017 гг.). Выделены 4 периода: 1) 1998–2002 гг.; 2) 2003–2007 гг.; 3) 2008–2012 гг.; 4) 2013–2017 гг.

Результаты. 1. Показано, что 5-летняя выживаемость больных РШМ в РК выросла с 55,1 до 69,5 на 100 тыс. женского населения. Заболеваемость РШМ возросла в 3 раза – с 10,5 до 28,3 случая на 100 тыс. населения за счет увеличения частоты РШМ в I–II стадиях (с 66,1 до 82,5 %). Показатель ранней диагностики РШМ (I–II стадии) в 1-м периоде составил 66,1 %, во 2-м – 68,5 %, в 3-м – 77,4 % и в 4-м – до 82,7 % ($p < 0,05$). При этом показатель смертности находится на уровне 8,9 случая на 100 тыс. населения и не снижается. Частота III–IV стадий (абсолютное число) РШМ составляет $15,8 \pm 5,8$ случая в 1-м периоде, $24,6 \pm 2,5$ – во 2-м, $28,2 \pm 4,3$ – в 3-м и $22,3 \pm 3,1$ – в 4-м,

что говорит о констатации РШМ, а не о его диагностике.

2. Выявлено увеличение диагностики преинвазивных форм РШМ с 24,4 % в 1-м периоде до 33,2 % во 2-м и далее до 62,8 % в 3-м ($p < 0,05$), которая сохраняется на этом уровне.

3. Уровень диагностики преинвазивного и раннего инвазивного (I–II стадии) РШМ вырос с 72,8 % в 1998 г. до 85,7 % в 2017 г. за счет комплексного использования методов диагностики (онкоцитология, кольпоскопия, тест на ВПЧ, биопсия) и увеличения охвата цитологического скрининга женщин в РК.

4. По результатам проведенного анализа решающим фактором, влияющим на эффективность цитологического скрининга РШМ, является широта охвата скринингом женского населения (не менее 70 %).

Выводы. 1. Уровень ранней диагностики РШМ определяется частотой выявления преинвазивного рака по отношению к инвазивным формам. 2. Проблема ранней диагностики РШМ у женщин состоит в отсутствии применения скрининговых программ у женщин старше 50 лет, что должно предусматривать диспансеризацию неработающего населения.

Методология исследования потенциальной канцерогенности сложных антропогенных продуктов, загрязняющих биосферу

Л.В. Кривошеева, Г.А. Белицкий, И.А. Хитрово,
К.И. Кирсанов, А.А. Иванов, М.Г. Якубовская,

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

В настоящее время изучение механизмов химического канцерогенеза эволюционировало от исследования роли отдельных составляющих к многофакторному анализу суммарного воздействия канцерогенных смесей. В таких продуктах одни компоненты обладают собственно канцерогенной активностью, другие влияют на процессы их метаболической активации ферментными системами клетки, а третьи оказывают промоторное действие, давая возможность первичному очагу трансформированных клеток образовать опухоль.

В практике наших исследований сочетались данные физико-химических и биологических параметров. На этой основе была создана система интегральной оценки канцерогенной и генотоксической опасности сложных продуктов. Количественное определение канцерогенов – полициклических ароматических углеводородов, нитрополиаренов и N-нитрозаминов – производилось с помощью высокотехнологичного оборудования (спектрально-люминесцентный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография,

газовый хроматограф с термоэнергетическим анализатором). Биологические эффекты включали определение мутагенности в системе сальмонелла/микросомы (тест Эймса) с использованием генетически модифицированных ауксотрофных по гистидину культур сальмонеллы TA 100, TA 98, реверсирующих при действии генотоксических соединений к прототрофности в результате замены пар оснований или сдвига рамки считывания кода. Другим показателем была индукция опухолей у дрозофилы (SMART-тест) на линиях *Drosophila melanogaster*, несущих в гетерозиготе мутации по генам *wts*, *Dmp53*, *yellow* и *sinet*. Показателем промоторной активности было нарушение клеточной кооперации в монослойной культуре клеток крысы.

Получено прямое доказательство нашего предположения о том, что низкое содержание в составе загрязнителей 1 или 2 индикаторных канцерогенов не может служить показателем его мутагенной безопасности, поскольку экстракты, содержавшие отдельные канцерогенные соединения в концентрации на порядок ниже минимально активной в случае изолированного воздействия, суммарно обладали выраженной генотоксической и промоторной активностью. Очевидно, что при действии сложных смесей могут происходить процессы, влияющие на эффективность действия находящихся в них мутагенов и канцерогенов.

Из этого следует фундаментальное положение о том, что показатели количественного содержания отдельных канцерогенов в среде обитания и на рабочих местах, которые используются в настоящее время в СанПиН РФ при установлении санитарных норм типа ПДК (предельно допустимая его концентрация), не являются достаточной гарантией безопасности и должны быть дополнены биологическими показателями.

Альтернативный онкогенез. Системная динамика экологических факторов при доброкачественных и злокачественных новообразованиях у детей

С. К. Пинаев¹, А. Я. Чижов²

¹ФГБУН «Вычислительный центр Дальневосточного отделения Российской академии наук», Хабаровск;
²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Для изучения влияния окружающей среды на этапы опухолевой трансформации авторы применили системный анализ взаимосвязей между частотой развития доброкачественных опухолей и злокачественных новообразований в когорте детей младшего возраста (0–4 лет), а также между выраженностью экологиче-

ских факторов и заболеваемостью различными формами неоплазий с использованием многошагового временного лага.

В начале исследования был проведен регрессионно-корреляционный анализ взаимосвязи между частотой злокачественных новообразований и доброкачественных опухолей в когорте детей младшего возраста 1976–1986 гг. рождения в г. Хабаровске, который выявил тенденцию обратной зависимости ($r = -0,446$; $p = 0,169$). Анализ взаимосвязи между частотой доброкачественных опухолей и заболеваемостью злокачественными новообразованиями в когорте детей на 1 год младше показал ее увеличение до высокой ($r = -0,705$; $p = 0,015$). Для изучения связей доброкачественных опухолей с отдельными формами злокачественных новообразований из-за низкой частоты последних когорты детей были расширены до масштаба Хабаровского края. Регрессионно-корреляционный анализ установил тенденцию обратной зависимости частоты нефробластомы от доброкачественных опухолей ($r = -0,534$; $p = 0,090$), тогда как связь заболеваемости доброкачественными опухолями с частотой неходжкинских лимфом в когорте детей на 2 года младше была сильная и прямая ($r = 0,787$; $p = 0,004$).

Далее была изучена связь активности солнца, дыма лесных пожаров с частотой возникновения доброкачественных опухолей в когорте детей младшего возраста. Установлена сильная прямая зависимость от активности солнца за 3 года до рождения детей частоты доброкачественных опухолей ($r = 0,785$; $p = 0,004$), в том числе гемангиом ($r = 0,751$; $p = 0,008$) и доброкачественных опухолей мягких тканей ($r = 0,799$; $p = 0,003$). Также выявлена высокая степень корреляции числа лесных пожаров через 3 года после рождения детей с частотой развития у них доброкачественных опухолей ($r = 0,758$; $p = 0,007$), в том числе гемангиом ($r = 0,807$; $p = 0,003$). Многофакторный анализ показал наличие сильной множественной корреляции активности солнца за 3 года до рождения детей, числа пожаров через 3 года после их рождения с заболеваемостью доброкачественными опухолями ($R = 0,860$; $F(2,8) = 11,328$; $p < 0,005$), в том числе гемангиомами ($R = 0,870$; $F(2,8) = 12,424$; $p < 0,004$).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что годовые колебания заболеваемости как доброкачественными, так и злокачественными новообразованиями в популяции детей младшего возраста являются не случайными. С высокой вероятностью они обусловлены длительными многолетними циклами изменений комплекса экологических факторов, приводящими к разнонаправленным колебаниям частоты отдельных форм новообразований в один и тот же период времени. Для объяснения обнаруженного явления, названного авторами «альтернативный онкогенез», высказано предположение об эпигеномной модуляции онтогенеза экологически обусловленным окислительным стрессом, ведущей к нарушению

баланса между семафоринами и интегринами с исходом в опухолевую трансформацию.

Основные эпидемиологические параметры выявления злокачественных неоплазий молочной железы в Санкт-Петербурге

Н.С. Романенков¹, К.Н. Мовчан^{1,2}, В.В. Хижа², П.С. Алексеев², А.В. Жарков², Д.А. Зайцев², Р.М. Гедгафов², А.С. Слободкина²

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

²СПб ГБУЗ «Медицинский информационно-аналитический центр», Санкт-Петербург

Задачи исследования. Проанализировать основные эпидемиологические показатели верификации РМЖ у жительниц Санкт-Петербурга.

Материалы и методы. В исследование включены данные о 4689 жительницах Санкт-Петербурга, у которых в 2011–2012 гг. впервые выявлено злокачественное новообразование молочной железы. Основные статистические показатели рассчитаны с применением программ Microsoft Excel для Office 2016 (Популяционный раковый регистр).

Результаты. В 2011 г. распространенность РМЖ у жительниц Санкт-Петербурга была зарегистрирована на уровне 532,6 на 100 тыс. населения, в 2012 г. — 545,0. Стандартизованный показатель заболеваемости злокачественными новообразованиями молочной железы в 2011 и 2012 гг. соответственно составил 46,21 (стандартное отклонение 1,05) и 49,5 (стандартное отклонение 1,08) на 100 тыс. населения. В 45 % клинических наблюдений РМЖ диагностирован у женщин трудоспособного возраста. В 8 из 10 случаев неопластический процесс в молочной железе у больных оказывался унилатеральным. Морфологические признаки, типичные для инфильтрирующей протоковой карциномы, констатированы специалистами в 80 % случаев. В 2846 клинических наблюдениях у пациенток диагностированы злокачественные новообразования молочной железы размером от 2 до 5 см. Более чем в 70 % случаев у больных верифицирован РМЖ II и III стадий. В 30 % клинических наблюдений радикальное лечение пациенток удалось осуществить сугубо хирургически. Этим больным в 36,5 % случаев выполнена радикальная мастэктомия в модификации J.L. Madden. В большинстве случаев констатирована необходимость комбинированного лечения пациенток. В целом радикальное лечение больных РМЖ оказалось возможным в 3576 (76,3 %) случаях. Протезирование молочной железы после мастэктомии в формате оказания высокотехнологичной медицинской помощи

пациенткам проведено (одномоментно либо в отсроченном порядке) в 164 (5,2 %) клинических наблюдениях. Показатель 5-летней скорректированной выживаемости в группе исследования составил 63,6 %.

Выводы. Анализ основных эпидемиологических показателей, отражающих эффективность оказания медицинской помощи больным РМЖ в одном из крупных административных центров России, позволяет констатировать сохранение тенденции к увеличению выявляемости злокачественных новообразований молочной железы у жительниц Санкт-Петербурга. В каждом 2-м случае РМЖ диагностирован у работающих женщин зрелого возраста. Радикально оказать медицинскую помощь пациенткам со злокачественными новообразованиями молочной железы удастся более чем в 3/4 клинических наблюдений. Ограничиться выполнением только радикального хирургического вмешательства без адъювантного лечения оказывается возможным не более чем в 20 % случаев. Показатель 5-летней скорректированной летальности в группе пациенток, данные о которых включены в исследование, составил 36,4 %.

Изменение экспрессии микроРНК в легких самок крыс под воздействием бензо(а)пирена

С.В. Филиппов^{1,2}, А.К. Яковлева^{1,3}, Л.Ф. Гуляева^{1,3}

¹ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН», Новосибирск;

²ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск;

³ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск

Бензо(а)пирен (БП) является одним из основных компонентов табачного дыма и относится к канцерогенам 1-й группы, т.е. может вызывать рак у человека. На сегодняшний день установлено, что токсическое действие БП осуществляется по 2 механизмам: генотоксическому (образование аддуктов с ДНК) и эпигенетическому. Последний изучен гораздо меньше, но на данный момент известно, что БП активирует арилгидрокарбонный рецептор (AhR), регулирующий транскрипцию многих генов.

Наша работа основана на гипотезе о том, что профиль экспрессии некоторых микроРНК в легких может изменяться под воздействием БП в результате его взаимодействия с AhR с последующей активацией генов, имеющих в интронах микроРНК или независимых от «генов-хозяев» межгенных микроРНК, в промоторах которых есть DRE-сайты связывания с этим рецептором.

С помощью анализа *in silico* выявлена возможная регуляция AhR микроРНК-126а, -483, -30с, -30е. С помощью ПЦР с обратной транскрипцией в режиме

реального времени был измерен относительный уровень экспрессии данных микроРНК в легких самок крыс после однократного введения БП (75 мг/кг) через 1–3 сут. В результате обнаружено достоверное увеличение экспрессии микроРНК-483 в 3 раза на 1-й день после введения БП, микроРНК-30с – в 1,45 раза на 2-й день, а также понижение уровня экспрессии микроРНК-30е в 1,4 раза на 1-й день и в 1,4 раза на 3-й день после введения БП. Наряду с этим был измерен уровень экспрессии генов-мишеней микроРНК-483 *IGF-1* и *IGF-2*, в результате чего выявлено увеличение относительного уровня их экспрессии в 3,5 и 3,0 раза соответственно на 3-й день после введения БП.

Таким образом, показаны изменения профиля экспрессии микроРНК-30с, -30е и -483, а также их генов-мишеней в легких самок крыс, обработанных БП, что может приводить к нарушению функций иммунитета, апоптоза и передачи клеточных сигналов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-415-540 002).

Канцерогенные выбросы при термической переработке просроченных лекарственных препаратов

И.А. Хитрово, Л.В. Кривошеева, К.И. Кирсанов, А.А. Иванов, М.Г. Якубовская, Г.А. Белицкий

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

Введение. Во всем мире все более острой становится проблема утилизации бытовых и промышленных отходов. В составе отходов заметное место занимают пришедшие в негодность лекарственные препараты. Современным методом утилизации лекарственных препаратов является высокотемпературная обработка в инсинераторах с доступом кислорода или без него.

Задачи исследования. Изучить потенциальную канцерогенную опасность дымовых выбросов 2 специализированных установок: «ЭЧУТО», использующей в технологическом процессе пиролиз, и предлагаемую для сжигания отходов печь «ЧЖБ», оснащенную комплексом фильтров и устройств для очистки продуктов сгорания.

Материалы и методы. На обеих установках сжигали по отдельности образцы просроченных лекарств 3 типов: антибиотики, ферменты, противоопухолевые препараты. Проведено исследование содержания полициклических ароматических углеводородов в дымовых выбросах обеих установок, в воздухе рабочего помещения и атмосферном воздухе. Аэрозольные пробы собирали на фильтры, которые далее экстрагировали и подвергали физико-химическому (высокоэффективная жидкостная хроматография, спектральный

анализ) и биологическому (бактериальный тест Эймса) анализам.

Результаты. В предварительных экспериментах показано, что дымовой выброс установки «ЭЧУТО» при сжигании пластмассовых отходов биомедицинского назначения в беспиролизном режиме содержит в несколько раз меньшие концентрации канцерогенных углеводородов, чем при открытом сжигании, а включение пиролиза дополнительно уменьшает их еще на 1–2 порядка, приближая к предельно допустимой концентрации в воздухе рабочей зоны. Соответственно, уменьшалась и мутагенность экстрактов.

Антибиотики, ферменты и противоопухолевые препараты сжигались по отдельности, однако охарактеризовать их специфический вклад в образование бластомогенных продуктов не представляется возможным, поскольку они перерабатывались вместе с блистерными упаковками, которые изготавливаются из формованного пластика различного происхождения, содержат подложки из картона или алюминиевой фольги. При сгорании пластмассы, особенно поливинилхлорида, могут образовываться генотоксические соединения. Концентрации индикаторного соединения бенз(а)пирена в выбросах «ЭЧУТО» была в несколько раз ниже, чем в печи «ЧЖБ», и близка к предельно допустимой концентрации в воздухе рабочих помещений, однако в целом обе мусоросжигающие установки позволяют уменьшить содержание канцерогенных полициклических ароматических углеводородов в выбросах до значений, соответствующих предельно допустимым для горячих источников, и снизить генотоксичность выбросов на порядки по сравнению с неорганизованным открытым сжиганием.

Пространственно-временные кластеры заболеваемости злокачественными новообразованиями в Ростовской области

О.Е. Архипова¹, Е.А. Черногубова^{1,2}

¹ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН», Ростов-на-Дону;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Задачи исследования. Пространственно-временной анализ распространения онкологических заболеваний в регионах Ростовской области, выявление региональных особенностей (экологического детерминизма) в развитии онкологических заболеваний.

Материалы и методы. Проанализированы статистические данные о заболеваемости злокачественными новообразованиями в 43 районах Ростовской области за 16 лет – с 2001 по 2016 г., предоставленные

Ростовским онкологическим диспансером и Центром гигиены и эпидемиологии в Ростовской области. Для анализа были выбраны формы рака, наиболее часто встречающиеся в структуре онкологической заболеваемости и среди причин смерти от злокачественных новообразований: рак легкого, рак ободочной кишки, РМЖ и рак предстательной железы (РПЖ). Анализ проведен на основе статистического показателя Getis-Ord Gi*, который идентифицирует статистически значимые пространственные кластеры высоких значений («горячих точек») и низких значений («холодных точек») уровня первичной выявляемости рака.

Результаты. Ретроспективный анализ заболеваемости злокачественными новообразованиями в Ростовской области позволил выделить пространственные кластеры низких («холодные точки») и высоких («горячие точки») значений, где первичная выявляемость рака остается соответственно низкой или высокой на протяжении всего анализируемого периода. Анализ заболеваемости злокачественными новообразованиями выявил, на наш взгляд, крайне интересную картину. Пространственные кластеры низкой заболеваемости раком локализуются в северных и центральных районах Ростовской области. «Горячие точки» заболеваемости раком локализуются преимущественно в южных районах Ростовской области. Так, стабильно высокий уровень заболеваемости 3 из 4 проанализированных нозологических форм рака (рак легкого, рак ободочной кишки, РМЖ) отмечен в Песчанокопском районе. Высокий риск заболеваемости раком отмечен также в Сальском (рак легкого, рак ободочной кишки), Егорлыкском (рак легкого, РПЖ) и Орловском (рак легкого, РМЖ) районах.

Выводы. Идентификация пространственных кластеров возникновения рака является полезным инструментом для обнаружения мест с высоким риском заболевания. Злокачественные новообразования относят к индикаторным показателям здоровья с высокой степенью зависимости от качества среды обитания, поэтому рост онкологической заболеваемости рассматривают как гигиеническую характеристику экологического неблагополучия территории. Статистика заболеваемости злокачественными новообразованиями в Ростовской области отражает не только качество и доступность медицинской помощи, уровень жизни населения, но и вероятность воздействия определенных экологических факторов риска.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-05-00940_а).

Многофакторный анализ симультанной патологии при колоректальном раке

О.В. Штыгашева¹, Е.С. Агеева²

¹ФГБОУ ВО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова», Абакан;

²СГБОУ ПО «Севастопольский медицинский колледж им. Жени Дерюгиной», Севастополь

Введение. В России показатели заболеваемости и смертности от колоректального рака (КРР) сохраняют отчетливую тенденцию к росту, что обусловлено комплексом причин, в том числе недостаточным внедрением методов скрининга и лечения предопухоловой патологии.

Задачи исследования. Оценить частоту встречаемости симультанной патологии у пациентов с КРР.

Материалы и методы. Исследование проводили в ГБУЗ Республики Хакасия «Республиканский клинический онкологический диспансер» за период 2006–2015 гг. Оценка клинических признаков заболевания проведена методом ретроспективного анализа историй болезни 180 пациентов, отобранных методом случайной выборки (10,6 % всех пациентов с КРР). Статистическую обработку выполняли в программе BioStatPro 5.9.8. Достоверность различий между группами пациентов оценивали с применением χ^2 -критерия при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили с использованием критерия Спирмена при $p < 0,05$.

Результаты. Избыточная масса тела, ассоциированная с высоким риском развития КРР, выявлена у 80,3 % пациентов. Среди мужчин статистически значимо чаще диагностировали избыточную массу тела (30,3 %; $p < 0,05$), а среди женщин – ожирение разной степени (33,3 %; $p < 0,05$).

Для КРР, сахарного диабета 2-го типа и желчно-каменной болезни (ЖКБ) характерна генетическая многофакторность и общие популяционные факторы риска. Среди госпитального контингента с КРР 15,1 % пациентов страдали сахарным диабетом 2-го типа, из них женщин было в 4 раза больше, чем мужчин (12,1 и 3,0 % соответственно). ЖКБ в стадии холецистэктомии диагностирована у 10,6 % пациентов (женщин в 2,5 раза больше, чем мужчин). Все 3 заболевания (КРР, сахарный диабет 2-го типа, ЖКБ) выявлены у 6 % пациентов; причем женщины в 3 раза чаще имели сочетанную патологию, в отличие от мужчин (4,5 и 1,5 % соответственно).

Кроме того, при проведении корреляционного анализа выявлено, что значение индекса массы тела > 25 кг/м² имело слабую взаимосвязь у женщин с КРР и сахарным диабетом 2-го типа ($r = 0,58$; $p < 0,05$). У мужчин аналогичная зависимость отсутствовала.

Выводы. К типичному фенотипу пациента с КРР в обследованной популяции можно отнести мужчин

или женщин в возрасте 55 лет и старше, имеющих избыточную массу тела или ожирение, сахарный диабет 2-го типа или нарушенную толерантность к глюкозе.

Частота предраковых изменений слизистой оболочки желудка среди пациентов с колоректальным раком

О. В. Штыгашева¹, Е. С. Агеева²

¹ФГБОУ ВО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова», Абакан;

²СГБОУ ПО «Севастопольский медицинский колледж им. Жени Дерюгиной», Севастополь

Задачи исследования. Оценить частоту и взаимосвязь предраковых изменений слизистой оболочки желудка у больных колоректальным раком (КРР).

Материалы и методы. Исследование проводили в ГБУЗ Республики Хакасия «Республиканский клинический онкологический диспансер». Ретроспективно анализировали 180 историй болезни, отобранных методом случайной выборки (10,6 %). Факторы риска оценивали анкетированием. Статистическую обработку выполняли в программе BioStatPro 5.9.8 с применением χ^2 -критерия при $p < 0,05$ и корреляционного анализа – критерия Спирмена при $p < 0,05$.

Результаты. В 40,3 % случаев КРР регистрировались предшествующие полипы. Установлена достоверная связь КРР (в 86,9 % случаев – аденокарцинома) с наиболее частыми локализациями полипов – прямая кишка и сигмовидный отдел ободочной кишки. Локализация полипа в 100 % случаев совпала с последу-

ющей локализацией рака. Больных в возрасте 40–59 лет оказалось в 11,7 раза больше, чем пациентов 20–39 лет, и в 3,3 раза меньше, чем больных старше 60 лет. Средний возраст больных КРР в этой группе составил 69 лет (61–77 лет). Женщин было больше, чем мужчин (52,5 и 47,5 % соответственно; $p < 0,05$). Средняя продолжительность жизни у женщин превышала таковую у мужчин на 10 лет и более. Гиподинамия выявлена у 18,9 % пациентов с КРР, у мужчин в 5 раз чаще, чем у женщин (15,2 и 3,0 % соответственно; $p < 0,05$). Курящих мужчин больше, чем женщин – 24,3 и 12,1 % соответственно ($p < 0,05$). Между полом и курением у пациентов с КРР имеется слабая взаимосвязь ($r = 0,57$; $p < 0,05$). Регулярное употребление алкоголя характерно для 68,2 % пациентов (37,9 % мужчин и 30,3 % женщин). У пациентов с полипами слизистой оболочки желудка толстой кишки установлена взаимосвязь с приемом алкоголя и низким уровнем физической активности, характерно только для мужчин ($r = 0,41$ и $0,62$ соответственно; $p < 0,05$). У женщин прием алкоголя имел обратно пропорциональную взаимосвязь с сахарным диабетом 2-го типа ($r = -0,38$; $p < 0,05$), а гиподинамия – слабую связь с воспалительными заболеваниями кишечника ($r = 0,48$; $p < 0,05$). Длительный анамнез по воспалительным заболеваниям кишечника отмечен у женщин в 5 раз чаще, чем у мужчин (7,6 и 1,5 % соответственно; $p < 0,05$).

Выводы. Витальный анамнез – важнейший фактор отбора пациентов врачами для проведения эндоскопического исследования толстой кишки в диагностике предопухоловой патологии и рака на ранних стадиях развития опухолевого процесса, который укажет на факторы риска и их экспрессию.

ГЕНОМИКА И ЭПИГЕНОМИКА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Доклады

Характеристики дифференциально экспрессирующихся генов при раке почки: функции и связь с развитием опухоли

Н.В. Апанович¹, М.В. Петерс², А.А. Коротаева¹,
П.В. Апанович¹, Б.Ш. Камолов², В.Б. Матвеев^{2,3},
А.В. Карпухин¹

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

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

³факультет фундаментальной медицины ФГБОУ ВО
«МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР) — наиболее распространенный (до 80 %) и агрессивный среди всех новообразований почки. Для его эффективного лечения необходима разработка новых способов ранней диагностики и прогноза течения этого заболевания.

В работе изучены профили экспрессии 200 генов, сформированных биоинформационным путем, из которых для углубленного анализа выбран 21 ген, характеризующийся повышенной экспрессией в наибольшем количестве образцов. Изучена также экспрессия 13 генов, функционирующих в основных сигнальных путях развития скПКР и являющихся ключевыми мишенями таргетной терапии. Использовали метод ПЦР в реальном времени. Исследовано 70 клинических случаев скПКР.

На основании полученных данных построена генная сеть, указывающая на ведущую роль HIF-1 α (гипоксия-индуцированный фактор 1 α) в активации указанного 21 гена. Их экспрессия ассоциирована

по GO-процессам с ответом на стресс и гипоксию, регуляцией метаболизма и MAPK-каскада, иммунных функций. Для 7 из 21 гена показано координированное снижение уровня экспрессии по мере прогрессии опухоли, рассмотрены соответствующие функциональные процессы. Экспериментально показана связь экспрессии генов *ANGPTL4*, *BHLHE41*, *IGFBP3* со степенью дифференцировки клеток скПКР. Установлена связь уровней экспрессии 5 генов с выживаемостью больных скПКР. Чувствительность и специфичность этих кандидатов в маркеры прогноза 3-, 5-летней выживаемости находится в интервале 70–93 %. Выявлены гены, уровни экспрессии которых связаны с развитием синхронных метастазов при скПКР. Показано, что гены *CA9*, *NDUFA4L2*, *HIG2*, *EGLN3* могут служить диагностическими маркерами ранних стадий развития скПКР.

Из 13 генов-мишеней таргетной терапии связь с продолжительностью жизни больных установлена только для гена *VEGFA*. Поскольку эти гены функционируют в сигнальных путях, был проанализирован характер корреляций уровней их экспрессии в группах пациентов с разной продолжительностью жизни. Полученные данные свидетельствуют в пользу преимущественного функционирования 1 из 2 основных сигнальных путей — PI3K-AKT-mTOR или RAS/MAPK — в опухолях больных скПКР с разной продолжительностью жизни.

Таким образом, выявлены гены, принимающие наиболее активное участие в развитии скПКР, охарактеризованы процессы с их участием. Эти гены тесно связаны с клиническими характеристиками опухоли, в этом качестве в основном охарактеризованы впервые и являются источником биомаркеров. Гены-мишени таргетной терапии в наибольшей мере связаны с продолжительностью жизни вследствие корреляций уровней экспрессии в том или ином сигнальном пути.

Молекулярный анализ микробиома опухолей больных раком прямой кишки в Республике Татарстан

О.Н. Ильинская¹, П.В. Зеленихин¹, Т.В. Григорьева¹,
А.Н. Дойникова¹, М.Г. Гордиев², Б.И. Гатауллин²,
И.Г. Гатауллин^{2,3}

¹ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Республика Татарстан;

²ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер Минздрава Республики Татарстан», Казань, Республика Татарстан;

³Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Казань, Республика Татарстан

В России за последние 50 лет число первичных заболеваний колоректальным раком выросло в 7 раз. В Татарстане сегодня на учете состоит каждый 42-й житель республики. Анализ пациентов с диагностированным раком прямой кишки в Республике Татарстан выявил, что общая частота мутаций *KRAS* составляет 33 %, при этом в 68 % случаев доминируют мутации в 12-м кодоне, треть обнаруженных мутантных *KRAS* представляет собой гомодуплексы. Пациенты старше 60 лет несут мутантный *KRAS*, аннулирующий эффективность терапии ингибиторами рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), всего в 10 % случаев. В то же время в группе пациентов моложе 50 лет мутации *KRAS* встречались в 58,3 % случаев. Микробный профиль биоптатов выявил тенденцию преобладания фил *Bacteroides* и *Enterobacteriaceae* на неповрежденном эпителии и их замещения на опухолевом родами *Faecalibacterium*, *Streptococcus* и *Fusobacterium*. Таксономическая структура бактериальных сообществ биоптатов разнообразна; в опухолевой ткани разнообразие может как снижаться, так и возрастать. В 50 % случаев отмечено увеличение численности рода *Prevotella* в эпителии с мутантным геном *KRAS*. Интенсивные исследования кишечного микробиома позволяют надеяться, что идентификация ключевых бактерий и их метаболитов при колоректальном раке станет реальным прогностическим маркером данного заболевания. Расширение спектра молекулярных мишеней в эпителии и микробиоме кишечника в ближайшем будущем должно обеспечить эффективность персонализированной противоопухолевой терапии.

Пространственная организация генома как мишень противоопухолевой терапии

О.Л. Кантидзе

ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва

Раковые клетки характеризуются множественными эпигенетическими изменениями, приводящими к изменениям в экспрессии генов. Так, известно, что активация онкогенов может быть связана с активностью энхансеров или суперэнхансеров – удаленных регуляторных элементов, которые контролируют экспрессию генов путем образования петель ДНК, благодаря чему они сближаются с промоторами подконтрольных им генов. Одной из новых многообещающих стратегий терапии рака является использование химических соединений, подавляющих активность опухолеспецифичных энхансеров. Недавно был обнаружен новый класс противоопухолевых препаратов – кураксинов, которые способны подавлять транскрипцию путем изменения степени компактизации хроматиновой фибриллы.

В этой работе мы продемонстрировали, что кураксины предпочтительно подавляют экспрессию генов, регулируемых энхансерами и суперэнхансерами. Результаты, полученные с помощью системы *in vitro*, свидетельствуют о том, что кураксины в большей степени влияют на взаимодействия промоторов с удаленными энхансерами, чем на сам процесс транскрипции или активность энхансеров как таковых. Наиболее важно, что кураксины существенным образом влияют на трехмерную организацию генома. Было показано, что обработка клеток этими низкомолекулярными соединениями приводила к исчезновению дальних геномных взаимодействий, в первую очередь контактов между промоторами генов и их энхансерами/суперэнхансерами.

Полученные результаты позволяют классифицировать кураксины как новый класс эпигенетических химиотерапевтических препаратов, основной мишенью которых является пространственная организация генома.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-74-20030).

Регуляция экспрессии BRCA1 и эстрогеновых рецепторов α фитострогенами в клетках рака молочной железы

Е.А. Шестакова, А.М. Щербаков, К.Е. Галеева,
Н.О. Вихлянцева, Т.А. Богуш

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. BRCA1 участвует в поддержании стабильности генома, репарируя двуцепочечные разрывы в молекуле ДНК. Развитие BRCA1-ассоциированных спорадических форм РМЖ и рака яичников обусловлено эпигенетической регуляцией экспрессии гена *BRCA1*. К настоящему времени получены данные о взаиморегуляции экспрессии BRCA1 и эстрогеновых рецепторов α (ЭР α).

Задачи исследования. Изучить влияние фитострогенов на экспрессию BRCA1 и ЭР α в клетках гормонозависимого РМЖ.

Материалы и методы. Клетки РМЖ линии MCF7 инкубировали с фитострогенами генистеином (0,5; 15 мкМ), апигенином, нарингенином, кверцетином (15 мкМ) в течение 24 ч в среде DMEM с 10 % телячьей сывороткой без стероидов. Для строго количественной оценки экспрессии BRCA1 и ЭР α применяли метод иммуноферментного анализа (ИФА), ассоциированный с проточной цитфлуориметрией, антитела, специфичные к BRCA1 (SD118), ЭР α (SP-1, ab27614), вторичные антитела, конъюгированные с DyLight 650 (ab98729, ab98510), проточный цитофлуориметр Navios (Beckman Coulter), программу FlowJo и статистический метод Колмогорова–Смирнова. Индекс экспрессии маркеров рассчитывали как произведение уровня экспрессии (доли специфически флуоресцирующих клеток относительно контроля) и интенсивности экспрессии (отношение интенсивности специфической флуоресценции к показателю в контроле).

Результаты. 1. При воздействии фитострогена генистеина в концентрации 0,5 мкМ отмечено увеличение интегрального показателя, индекса экспрессии, BRCA1 в 1,7 раза, а для ЭР α – уменьшение показателя в 2,9 раза.

2. При воздействии генистеина в концентрации 15 мкМ наблюдались менее выраженное увеличение индекса экспрессии BRCA1 (в 1,2 раза) и снижение индекса экспрессии ЭР α в 3,5 раза.

3. Фитострогены апигенин, нарингенин и кверцетин вызывали уменьшение индекса экспрессии BRCA1 в 1,4; 1,4 и 1,6 раза соответственно, при этом индекс экспрессии ЭР α уменьшился в 4,6; 2,7 и 3,5 раза соответственно.

4. Эстроген 17 β -эстрадиол не изменял экспрессию BRCA1.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении экспрессии опухолевого супрессора

BRCA1 при воздействии фитострогена генистеина, при этом экспрессия ЭР α уменьшается в клетках РМЖ линии MCF-7. Генистеин может приводить к уменьшению гиперметилирования ДНК и/или ЭР α -ассоциированной регуляции промотора *BRCA1* (в частности, к ацетилированию гистонов в промоторе *BRCA1*). В отличие от генистеина, другие фитострогены (апигенин, нарингенин и кверцетин) приводят к уменьшению экспрессии BRCA1, что говорит о различных механизмах действия на опухолевые клетки использованных в данном исследовании фитострогенов.

В целом результаты открывают широкие перспективы исследования воздействия фитострогенов на сигнальные пути стероидных гормонов и белков-регуляторов репарации ДНК в клетках РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 14-15-00362).

BET histone acetylation readers in hypoxia adaptation in triple negative breast cancer

L. Lisboa da Motta¹, I. Ledaki², S. Haider³, M.A. De Bastiani⁴,
D. Baban⁵, K. Stefan⁶, F. Klamt⁴, D. Heery⁷, A. Harris⁸,
A. McIntyre¹

¹University of Nottingham, Division of Cancer and Stem Cells, Nottingham, United Kingdom;

²University of Oxford, Ludwig Institute of Cancer Research, Oxford, United Kingdom;

³Breast Cancer Research, Institute of Cancer Research, London, United Kingdom;

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Bioquímica, Porto Alegre, Brazil;

⁵University of Oxford, Wellcome Trust Centre for Human Genetics, Oxford, United Kingdom;

⁶University of Oxford, Target Discovery Institute, stefan.knapp@sgc.ox.ac.uk, United Kingdom;

⁷The University of Nottingham, School of Pharmacy, Nottingham, United Kingdom;

⁸University of Oxford, Department of Oncology, Oxford, United Kingdom

Background. Hypoxia associates with aggressiveness and worst prognosis in many malignancies. It occurs in approximately 50 % of breast cancer cases – 500.000 deaths worldwide. 15 % of these are classified as triple negative breast cancer (TNBC), the most aggressive subtype due to the lack of a specific therapy.

Hypoxia drives tumor aggressiveness through stabilization of HIF, which activates genes that promote survival under reduced oxygen availability, like CA9 that regulates pH and VEGF-A that promotes angiogenesis. However, the attempt to treat cancers inhibiting HIF showed limited success.

Epigenetic factors, like histone acetylation, mediate gene expression in many physiopathological conditions, like hypoxia. The BET proteins are histone-acetylation

readers that recruit transcription proteins. BET inhibitors have shown many anti-tumour effects. Thus we investigated BET proteins as a player in TNBC adaptation to hypoxia.

Materials and methods. Cells were cultivated in normoxia and hypoxia (0.1–1 % O₂) with and without JQ1 and molecular biology techniques were performed for the different applications, such as: real-time PCR (qPCR), immunoblotting, immunohistochemistry, chromatin immunoprecipitation, gene knockdown (siRNA). Cell growth was evaluated with Sulforhodamine B, CyQUANT or clonogenic assay, according to the purpose. Spheroids were formed through centrifugation in round-bottom plates. Microarray and bioinformatics data was performed using different platforms. Finally xenograft studies were housed at BMS, University of Oxford, UK, and procedures were carried out under a Home Office licence (PPL30/2771). Full descriptions of methodology can be found in <http://bit.ly/damotta>.

Results. JQ1 reduced *TNBC* growth *in vitro* (monolayer and spheroid) and *in vivo* and inhibited xenograft vascularization. The BET inhibitor JQ1 modulated 44 % of hypoxia-induced genes (2/3 were downregulated including CA9 and VEGF-A). JQ1 also prevented HIF

binding to the CA9 promoter, but did not alter HIF expression or activity.

Silencing of any BET protein resulted in CA9 downregulation in hypoxia, while only BRD4 knockdown resulted in VEGF-A downregulation. The knockdown of any BET protein reduced colony formation in hypoxia and normoxia, but not the same extend that JQ1 does. Suggesting there could be a synergistic or compensatory role of the different BET proteins.

Hypoxia increased global H4 acetylation in CA9 and LOX promoters, but acetylated H4K5 was not altered. Interestingly, LDH-A which is largely induced by hypoxia but is not altered by JQ1, showed no difference in any of the acetylated markers evaluated.

On the other hand, histone acetylation is decreased globally in hypoxia. This suggest that specific epigenetic patterns takes place in different genes.

Conclusion. This work provide a greater comprehension of hypoxic *TNBC* gene expression regulation and proof of concept data to accelerate the development of BET inhibitors as new leads for TNBC. The findings showed here demonstrate that histone acetylation and BET proteins play an important role in molecular adaptation to hypoxia. Also, BET inhibitors dually targets angiogenesis and the hypoxic response, an effective combination at reducing tumour growth.

Постеры

Гиперметилированные гены микроРНК в патогенезе и метастазировании рака яичников

А.М. Бурденный^{1,2}, В.И. Логинов^{1,3}, И.В. Пронина¹,
Е.А. Филиппова¹, Т.П. Казубская⁴, М.В. Фридман⁵,
Д.О. Уткин⁴, Н.Е. Кушлинский⁴, Э.А. Брага^{1,3}

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

²ФГБУН «Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва;

⁴ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва;

⁵ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
РАН», Москва

Введение. Как показано ранее, доля генов микроРНК, ингибируемых посредством метилирования, выше, чем обычных генов, кодирующих белки. В связи с этим гиперметилированные гены микроРНК могут представлять полезные для клинической онкологии чувствительные маркеры. Рак яичников отличается высокой частотой летальных исходов, что обусловлено выявлением заболевания на поздних стадиях, осложненных метастазированием.

Задачи исследования. Показать функциональную роль метилирования генов микроРНК в патогенезе рака яичников и на основе гиперметилируемых генов микроРНК отобрать новые диагностические и прогностические маркеры в отношении процесса диссеминации опухоли. Действительно, на основе метилирования генов микроРНК предложены системы маркеров для диагностики и прогноза рака толстой кишки, РМЖ и РПЖ, но для рака яичников такие данные практически отсутствовали.

Результаты. Методом метилспецифичной ПЦР показано значимо частое изменение статуса метилирования 11 генов микроРНК в 76 парных (опухоль/норма) образцах рака яичников. Идентифицированы новые гиперметилированные гены микроРНК (*MIR-124-1*, *-124-2*, *-124-3*, *-127*, *-132*, *-137*, *-339* и *-193A*). Методом количественной ПЦР установлена значимая корреляция статуса метилирования с изменением уровня экспрессии для 12 микроРНК ($r_s = 0,67-0,97$; $p \leq 10^{-4}$), что указывает на функциональную роль метилирования исследованных генов микроРНК в патогенезе рака яичников. Показана значимая ассоциация гиперметилирования 10 генов микроРНК (*MIR-124-2*, *-124-3*, *-125B-1*, *-127*, *-129-2*, *-137*, *-193A*, *-203A*, *-339*, *-375*) с метастазированием рака яичников в лимфатические узлы, брюшину и отдаленные органы ($p \leq 0,01$).

Гиперметилирование 10 генов микроРНК в метастазах рака яичников валидировано на дополнительной выборке из 13 первичных опухолей и парных к ним перитонеальных метастазов. В теоретическом отношении наиболее интересно обнаружение особых свойств у 2 микроРНК (*miR-375* и *miR-203a*), гены которых метилируются исключительно в процессе метастазирования или после него.

Выводы. На основе гиперметилированных генов микроРНК предложены 2 набора маркеров, один из которых (*MIR-124-2*, *-127*, *-129-2*, *-137*, *-193A*) можно использовать для диагностики рака яичников, а другой (*MIR-124-2*, *-137*, *-203A*, *-375*) — для предсказания метастазирования и рецидивов. По данным анализа ROC-кривых, системы маркеров характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью (80–90 %) при AUC (площадь под ROC-кривой) выше 0,9.

Полученные результаты указывают на вовлеченность эпигенетических модификаций исследованных генов микроРНК в патогенез и прогрессирование рака яичников. Предложенные маркеры могут найти применение в клинике.

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

Влияние полной и укороченной изоформ секурина на транскриптом клеток HEK293

Д.Э. Демин^{1,2}, А.Н. Уварова¹, Д.В. Купраш^{1,2}, А.М. Шварц^{1,2}

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

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт
(государственный университет)», Москва

Секурин, кодируемый геном *PTTG1*, является ингибитором сепаразы, контролирующим расхождения сестринских хроматид. Белок убиквитинируется комплексом стимуляции анафазы (APC/C) и деградирует в митозе. Своевременное освобождение сепаразы важно для правильного разделения хромосом. Помимо этого, секурин может регулировать транскрипцию более чем тысячи генов, в основном участвующих в пролиферации, развитии клеточного цикла и восстановлении ДНК.

Мы обнаружили новую короткую изоформу матричной РНК (мРНК) секурина, которая лишена экзонов 3 и 4. Данные экзоны кодируют часть белка, содержащую основной сайт узнавания APC/C (D-box), который необходим для быстрой деградации, а также ДНК-связывающую область. В короткой форме белка

остаются дополнительный сайт деградации KEN-box и трансаKTивационная область. Короткая изоформа секурина детектируется с помощью антисыворотки кролика к ней в клетках линии НЕК293, обработанных ингибитором протеасом. Присутствие новой короткой изоформы мРНК подтверждается в нескольких раковых линиях и первичных клетках с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени.

Мы исследовали влияние сверхэкспрессии изоформ секурина на гены, для которых показана регуляция их экспрессии полной изоформой. По нашим данным, избыточная экспрессия как полной, так и короткой изоформы активирует транскрипцию нескольких факторов роста, например FGF2 и VEGFA, и циклинов, таких как CCND3. Однако отсутствие ДНК-связывающего домена в короткой изоформе секурина приводит к ее неспособности влиять на экспрессию некоторых критических регуляторов клеточного цикла, например MYC и TP53 (PMID: 29989583. DOI: 10.7868/S002689841803014X).

Полнотранскриптомное секвенирование обнаруживает и другие гены, экспрессия которых дифференциально зависит от полной и короткой изоформ. Так, экспрессия участвующих в регуляции клеточного цикла генов *SEPT11*, *SUGT1*, *TUBB2A* активируется только короткой изоформой, что может быть связано как с отсутствием ДНК-связывающей области в короткой изоформе, так и с различной динамикой экспрессии 2 изоформ в течение клеточного цикла.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-34-00628 мол_а).

Персонализированный подход к назначению химиотерапии больным немелкоклеточным раком легкого

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

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Неoadъювантная ХТ (НХТ) — один из важных этапов комбинированного лечения злокачественных новообразований, однако отсутствие подхода к выбору схемы ХТ для каждого конкретного больного является одной из основных причин ее неэффективности. Благодаря накопленной в достаточном количестве информации о связи эффекта ХТ с уровнем экспрессии некоторых молекул, в частности генов химиочувствительности (*TOP2A*, *TUBB3*, *BRCA1*, *RRM1*, *TOP1* и др.), определяющих чувствительность опухоли к определенным химиопрепаратам, есть возможность планировать лечение конкретного больного.

Задачи исследования. Улучшить результаты комбинированного лечения НМРЛ с использованием персонализированной ХТ.

Материалы и методы. В исследование были включены данные 40 больных НМРЛ IIА–IIIВ стадий. Из биопсийного материала опухоли и нормальной ткани, взятого до лечения, а также из операционного материала после НХТ выделяли РНК и ДНК. Уровень экспрессии генов химиочувствительности *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TUBB3* и *TYMS* определяли с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени. Для оценки хромосомных aberrаций генов использовали систему цифровой капельной ПЦР (ddPCR QX200, Bio-Rad, США).

Результаты. Для 31 пациента назначена персонализированная схема адъювантной ХТ, основанной на определении экспрессии генов химиочувствительности. В результате в группе больных статистически значимо увеличилась 3-летняя безрецидивная выживаемость — 80,6 % по сравнению с группой исторического контроля — 51,7 % ($p = 0,041$). Далее на основании полученных данных было проведено персонализированное назначение НХТ. Общая эффективность НХТ (частичная регрессия) составила 44,4 %, стабилизация — 22,2 %, для остальных больных оценка эффекта продолжается.

Выводы. Таким образом, применение персонализированного подхода к назначению НХТ больным НМРЛ на основании оценки экспрессии и копияности генов химиочувствительности позволяет увеличить эффективность лечения, повысить показатели выживаемости и в перспективе — эффективность НХТ.

Работа выполнена в рамках программы «УМНИК» фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (договор № 11783 ГУ/2017).

Функциональные эффекты дисрегуляции экспрессии miR-124-3p в патогенезе рака молочной железы

Д.М. Зайченко¹, А.А. Московцев¹, А.М. Бурденный¹, В.И. Логинов¹, И.В. Пронина¹, Е.А. Филиппова¹, Т.П. Казубская², Э.А. Брага¹, А.А. Кубатиев¹

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

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

Малигнизация клеток сопровождается aberrациями в экспрессии микроРНК и приводит к изменениям их фенотипа и функциональной активности. Ранее нами на выборке первичных опухолей РМЖ были показаны возросшая частота метилирования промоторов генов *MIR-124-1*, *-124-2*, *-124-3* и отрицательная корреляция между уровнями экспрессии miR-124-3p и биоинформатически предсказанной ее мишени матричной РНК (мРНК) *BCL2*. Для анализа функциональной значимости связи miR-124-3p с мРНК *BCL2*

в клеточной линии РМЖ MCF-7 была оверэкспрессирована зрелая форма miR-124-3p путем трансфекции клеток искусственно синтезированными РНК-дуплексами. Обнаружено достоверное снижение уровня мРНК *BCL2* в 1,3 раза. Для уточнения характера взаимодействия miR-124-3p и мРНК *BCL2* был проведен биотин-пулдаун с последующим анализом количественной ПЦР в режиме реального времени. Для этого клетки трансфицировали микроРНК-дуплексами, смысловая цепь которых на 3'-конце была ковалентно связана с биотином через алифатический шестиуглеродный линкер. Анализ фракции РНК, преципитированной на покрытых стрептавидином магнитных частицах, показал изменение уровня мРНК *BCL2* на 40 % по сравнению с нетрансфицированными клетками, что может указывать на прямой характер взаимодействия miR-124-3p и мРНК *BCL2*.

В целях уточнения функциональной роли miR-124-3p в клетках MCF-7 нами проведен полнотранскриптомный анализ клеток, трансфицированных miR-124-3p, с помощью платформы Affymetrix и анализа Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). В результате были определены (при FDR < 5 %) более 120 процессов, активируемых в трансфицированных клетках, и 32 процесса, которые снижают свою активность. Согласно результатам GSEA оверэкспрессия hsa-miR-124-3p в клетках MCF-7 приводит к модулированию чувствительности к гормональным стимулам, снижению активности провоспалительных путей, а также к активации окислительного фосфорилирования. Известно, что опухолевые клетки часто используют гликолиз, в том числе аэробный, при этом снижение интенсивности окислительного фосфорилирования приводит к снижению продукции активных форм кислорода и закрытию редоксзависимых митохондриальных каналов, что гиперполяризует митохондриальную мембрану, и, как следствие, вызывает устойчивость к апоптозу. Нами показано, что комплексное действие, оказываемое miR-124-3p на клетки MCF-7, включает также регуляцию уровня экспрессии гена митохондриального белка *BCL-2*. Таким образом, гиперметилирование промоторов генов *MIR-124-1*, *-124-2*, *-124-3* при РМЖ может приводить к снижению экспрессии зрелой формы miR-124-3p, ассоциированному с целым рядом функциональных эффектов, среди которых увеличение уровня экспрессии ее мишени — антиапоптотического гена *BCL-2*, модулирование клеточного дыхания, что в целом будет способствовать опухолевой прогрессии.

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

Аллель-специфическая экспрессия генов опухолевых супрессоров при гепатоцеллюлярной карциноме

О.М. Кривцова^{1,2}, Э.М. Радкевич^{1,2}, Е.Р. Набиева²,
Н.А. Дьякова¹, Н.Л. Лазаревич^{1,2}

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

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

Аллель-специфическая экспрессия (АСЭ) генов, кодирующих опухолевые супрессоры APC, MSH2 и MSH6, обусловленная наличием герминативных цисрегуляторных вариантов или делеций, может приводить к снижению уровня их экспрессии и является фактором предрасположенности к развитию наследственных форм опухолей толстой кишки. Кроме того, АСЭ генов опухолевых супрессоров может вносить вклад в развитие опухолей, не оказывая влияния на снижение уровня их экспрессии. Так, у носителей герминативного варианта Ser241Tyr в гене *TP53* при экспрессии мутантного аллеля происходит развитие синдрома Ли-Фраумени, в то время как у носителей варианта с экспрессией только аллеля дикого типа заболевание не развивается.

К настоящему моменту роль АСЭ в патогенезе гепатоцеллюлярной карциномы (ГК), наиболее распространенной и агрессивной формы первичных опухолей печени, практически не исследована.

Для анализа АСЭ в ГК мы выбрали из базы Cancer Gene Census гены, кодирующие опухолевые супрессоры. Поиск однонуклеотидных вариантов проводили на основе данных полнотранскриптомного секвенирования 40 пар образцов ГК и неопухолевой ткани печени с использованием алгоритмов HaploTypeCaller и MBASED. Поскольку активация β-катенинового сигнального пути и геномная нестабильность — одни из наиболее частых нарушений при ГК, для дальнейшего анализа мы выбрали АСЭ-гены, являющиеся компонентами указанного каскада и систем репарации ДНК.

Активацию Wnt/β-катенинового сигнального пути оценивали на основании изменения экспрессии генов-мишеней. АСЭ генов *APC*, *AXIN1* и *CDH1*, а также *CTNNB1* и наличие известных активирующих соматических мутаций в последнем достоверно не коррелировали с активацией сигнального каскада, основной вклад в которую вносила дифференциальная экспрессия WNT и FZD.

Из 26 генов системы репарации ДНК, АСЭ которых выявлена хотя бы у одного пациента, для нескольких генов установлена корреляция с мутационной нагрузкой опухоли. Мутационная нагрузка в опухолях достоверно коррелировала с аллельной экспрессией *BRCA2* ($c = 0,7$; $p < 0,001$) и *ATR* ($c = 0,34$; $p < 0,05$), но не с уровнем их экспрессии. Корреляция уровня мутационной

нагрузки с наличием соматических мутаций в генах системы репарации составила 0,46 ($p < 0,01$).

Большинство герминативных вариантов в исследованных образцах относится к распространенным в популяции однонуклеотидным полиморфизмам с неизвестной функциональной значимостью. Однако, несмотря на размер выборки и ограниченный набор генов, в ряде случаев выявляются патогенные герминативные варианты в генах, демонстрирующих АСЭ. Так, у одной из пациенток (29 лет, стадия «А» ВСЛС) обнаружен аллель гена *XPC L48F*, ассоциированный с ранним развитием наследственных форм рака легкого. В другом случае выявлен герминативный вариант, обуславливающий активирующую замену S45Y в β -катенине.

Полученные результаты указывают на возможную роль АСЭ генов опухолевых супрессоров в развитии ГК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-34-00816).

Активация сигнального пути апоптоза в клетках рака прямой кишки в ответ на ингибирование экспрессии гена геликазного комплекса

А.Ю. Кузеванова, Ф.А. Кошкин, П.В. Апанович,
А.В. Карпунин, А.А. Алимов

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

Введение. Поиск новых мишеней, активирующих переход клеток в состояние апоптоза, является неотъемлемой частью процесса создания новых лекарственных средств для терапии рака. В этом плане интересен ген *MCM4*, кодирующий субъединицу геликазного комплекса и участвующий в поддержании стабильности генома. В работе использовано ингибирование указанного гена малыми интерферирующими РНК (миРНК) в клетках рака толстой кишки, полнотранскриптомным анализом изучена дифференциальная экспрессия участвующих в этом процессе генов и построена соответствующая генная сеть.

Материалы и методы. Исследование проводили на клетках рака толстой кишки линии HT-29, которые трансфицировали миРНК к гену *MCM4* или миРНК CON1 (отрицательный контроль). Долю апоптотических клеток определяли с помощью микроскопии и проточной цитометрии с использованием окрашивания Hoechst 33342/PI и антител к гистону γ -H2AX. Экспрессионный профиль генов анализировали с помощью чипов Affymetrix GeneChip Human Transcriptome Array 2.0. Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение Transcriptome Analysis Console (ТАС) 4.0. В качестве метода альтернативного контроля применяли количественную ПЦР.

Результаты. Показано, что использование миРНК к гену *MCM4* в клетках рака толстой кишки приводит к гибели клеток. При сопоставлении экспрессионных профилей генов клеток, обработанных миРНК к гену *MCM4* и миРНК CON1, было выявлено 146 генов, представляющих интерес для дальнейшего исследования ($p < 0,05$). Большинство из них вовлечены в процессы регуляции клеточного цикла, репликацию ДНК и поддержание внутриклеточного гомеостаза. В частности, обнаружено снижение экспрессии генов *E2F7* (транскрипционный фактор), *CDC6* (регулятор репликации ДНК, компонент пререпликативного комплекса), *CCNE2* (циклин, регулирующий переход G1/S). Среди генов, усиливших свою экспрессию в ответ на воздействие, следует выделить ген *CDK8*, входящий в состав медиативного комплекса, и ген *TNFSF10*, кодирующий лиганд к рецепторам TNFRSF10 (A/B). Оба рецептора конституционно экспрессируются в клетках HT-29. На основании полученных данных построена сеть потенциально возможных межгенных взаимодействий, приводящих к возникновению апоптоза.

Выводы. Проведенный биоинформационный анализ указывает на существование сигнального пути, активирующего экспрессию белка TNFSF10 в ответ на подавление экспрессии гена *MCM4*.

Изменение копииности генов в опухолевых клетках у больных аденокарциномой легкого с наличием и отсутствием метастазов

Д.С. Кутилин, Т.Г. Айрапетова, О.И. Кит

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

Введение. Известные в настоящее время маркеры аденокарциномы легкого не обладают необходимыми свойствами для прогнозирования развития данного заболевания, что делает проблему поиска новых молекулярных маркеров актуальной.

Задачи исследования. Изучение изменения копииности генетических локусов в опухолевых и нормальных клетках легкого у больных с наличием (T1–3N1–2M0–1) и отсутствием (T1–3N0M0) метастазов для выявления потенциальных молекулярных маркеров, пригодных для прогнозирования развития данного заболевания.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили срезы тканей из FFPE-блоков 90 пациентов с диагнозом аденокарциномы легкого. Для высококачественной дифференцировки опухолевых и нормальных клеток легкого был выбран подход, основанный на лазерной микродиссекции с бесконтактным захватом (Palm MicroBeam, Carl Zeiss, Германия). Из клеток фенол-хлороформным методом

проведена экстракция ДНК. Для определения копийности генов с использованием базы данных NCBI GenBank были разработаны последовательности 35 пар синтетических олигонуклеотидов, включая 3 пары для референсных локусов (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*). Определение относительной копийности 32 генов (*BAX*, *BCL2*, *C-FLAR*, *P53*, *MDM2*, *BFAR*, *SEMA3B*, *RASSF1A*, *CASP9*, *CASP3*, *CASP8*, *SOX2*, *OCT4*, *NANOG*, *PIK3*, *MKI67*, *HV2*, *HIF1A1*, *XRCC1*, *MMP1*, *TERT*, *CTNNB1*, *VEGFA*, *KRAS*, *EGFR*, *GRB2*, *SOS1*, *MAPK1*, *STAT1*, *BRAF*, *FTO*, *mir3678*) проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени. Статистический анализ выполняли с использованием критерия Манна–Уитни.

Результаты. В объединенной выборке ($n = 90$) обнаружены статистически значимые ($p < 0,005$) увеличение копийности генов *MAPK1* и *SOX2*, снижение копийности генов *mir3678*, *HV2*, *BAX* и *CASP3* в опухолевых клетках относительно нормальных клеток легкого. У больных аденокарциномой легкого с метастазами и без них обнаружены следующие статистически значимые ($p < 0,05$) различия в копийности генов в опухолевых клетках относительно нормальных: 1) в группе T1–3N1–2M0–1 ($n = 50$) – снижение копийности генов *mir3678*, *HV2*, *MDM2*, *P53*, *XRCC1*, *CASP3* и *OCT4* и повышение копийности гена *SOX2*; 2) в группе T1–3N0M0 ($n = 40$) – повышение копийности генов *MAPK1* и *mir3678* и снижение копийности *HV2*.

Выводы. Полученные данные об изменении копийности генов, ответственных за регуляцию апоптоза, пролиферацию, окислительное фосфорилирование, функционирование сигнального пути EGFR в опухолевых клетках легкого позволили выявить новые молекулярно-генетические маркеры для прогнозирования вероятности метастазирования (*mir3678*, *MDM2*, *P53*, *SOX2*, *XRCC1*, *CASP3*, *OCT4*, *MAPK1*).

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

Делеции генов супрессоров и репарации вызывают возникновение клонов с амплификациями регионов генов стволовости

А.М. Певзнер, М.М. Цыганов, П.В. Казанцева, И.В. Дерюшева, М.К. Ибрагимова, Е.М. Слонимская, Н.В. Литвяков

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Результаты предыдущих наших исследований показали, что наличие амплификаций в регионах 3p, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 13q, 16p, 18chr, 19p, 19q, где локализованы гены стволовости (ГС), сопряжено с гематогенным метастазированием. Было

высказано предположение о том, что геномная нестабильность, один из наиболее частых сопутствующих факторов злокачественной трансформации, может являться индуктором увеличения копийности ГС, способствуя тем самым опухолевой прогрессии.

Задачи исследования. Изучение связи амплификаций локусов ГС с нарушениями основных генов, отвечающих за поддержание целостности генома в опухоли молочной железы.

Материалы и методы. Обследованы 109 больных РМЖ (IIA – IIIB). Больные получали 4–6 курсов неoadьювантной ХТ по схемам FAC, CAX или монотерапию таксотером. Для анализа аберраций числа копий (CNA) проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности (Affymetrix, США) CytoScan™ HD Array. Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0.

Результаты. В качестве основных генов, отвечающих за поддержание целостности генома, изучены: *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN1B*, *CDKN2B*, *ATM*, *TP53*, *PTEN*, *RB1*, *BRCAl*. Была изучена частота делеций этих генов в опухоли при наличии амплификаций ГС и их отсутствии. Частота делеций данных генов повышается с увеличением количества амплификаций ГС. Для *TP53* показано, что у больных с отсутствием амплификаций ГС частота делеции составляет 28 %, у больных с 1 амплификацией – 58 %, у больных с 2 амплификациями и более – 71 % (Fisher test, $p = 0,001$). Аналогично показано для гена *ATM* увеличение частоты делеций до 76 % ($p = 0,001$), для *RB1* увеличение частоты делеций до 65 % ($p = 0,0003$), для *BRCAl* увеличение частоты делеций до 58 % ($p = 0,001$).

Выводы. Установлено наличие связи делеций генов, отвечающих за поддержание целостности генома и амплификаций ГС. Возможно, что индукция геномной нестабильности – одно из основополагающих событий для эволюции опухоли, в процессе которой происходит образование клонов с амплификациями ГС, способных к метастазированию.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-15-01203).

Анализ аллель-специфической экспрессии гена тромбоспондина 1 в ткани гепатоцеллюлярной карциномы

Э.М. Радкевич^{1,2}, П.А. Хесина^{1,2}, Н.А. Дьякова¹, Н.Л. Лазаревич^{1,2}, О.М. Кривцова^{1,2}

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

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

Наиболее распространенная и агрессивная форма рака печени – гепатоцеллюлярная карцинома (ГК),

одной из особенностей которой является гиперваскуляризация тканей, причем степень васкуляризации зависит от стадии развития опухоли. Ряд наблюдений указывает на то, что различное соотношение уровней экспрессии аллелей гена, аллель-специфическая экспрессия (АСЭ), может вносить вклад в развитие опухолей.

Мы проанализировали АСЭ гена *THBS1*, кодирующего ингибитор ангиогенеза тромбоспондин 1, в парных образцах ГК и неопухоловой ткани печени тех же пациентов. Для анализа АСЭ был выбран аллель, содержащий однонуклеотидный полиморфизм rs2228262, встречающийся у 9,3 % популяции (ЕхАС). Согласно биоинформатическим предсказаниям обусловленная этим полиморфизмом аминокислотная замена N700S может влиять на конформацию нескольких доменов, в том числе EGF-подобных повторов, отвечающих за непрямую активацию EGFR, и повторов 3-го типа, в районе которых происходит связывание FGF, препятствующее его взаимодействию с FGFR, а также интегринов и других молекул.

По результатам полнотранскриптомного секвенирования 40 случаев ГК мы идентифицировали 8 случаев гетерозиготного носительства rs2228262. Наличие полиморфного аллеля было подтверждено методом аллель-специфической ПЦР с геномной ДНК.

Для того чтобы подтвердить наличие АСЭ *THBS1*, мы провели серию экспериментов ПЦР в реальном времени с комплементарной ДНК и аллель-специфическими праймерами к *THBS1*. Повышение экспрессии альтернативного аллеля *THBS1* в опухоли было выявлено у 4 из 8 пациентов, при этом экспрессия референсного варианта возросла только в 1 случае. При снижении экспрессии *THBS1* (4 из 8 случаев) в опухоли снижение экспрессии альтернативного аллеля было менее выражено по сравнению с референсным. В целом превышение уровня экспрессии альтернативного варианта над референсным, т.е. АСЭ гена *THBS1*, было выявлено в половине случаев.

Анализ корреляции полученных результатов с клиническими характеристиками опухолей продемонстрировал обратную зависимость экспрессии гена *THBS1* от стадии развития опухоли согласно Барселонской системе стадирования ($s = -0,47$; $p < 0,02$). Наличие полиморфизма rs2228262 демонстрирует тенденцию к обратной корреляции с уровнем дифференцировки ГК ($s = -0,34723$; $p = 0,05$) и показателями общей выживаемости ($s = -0,61$; $p = 0,06$).

Таким образом, в ГК человека нами впервые описана АСЭ аллеля, кодирующего тромбоспондин 1 с предположительно пониженным антиангиогенным потенциалом, преобладание которого над полнофункциональным вариантом может способствовать васкуляризации опухоли и ее дальнейшему росту.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-34-00816).

Роль метилирования генов *APAF1*, *DAPK1* и *BIM* в патогенезе рака молочной железы

Е.А. Филиппова¹, С.С. Лукина², И.В. Пронина¹,
А.М. Бурденный^{1,3}, Т.П. Казубская⁴, Э.А. Брага^{1,5},
В.И. Логинов^{1,5}

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

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России, Москва;

³ФГБУН «Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

⁴ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

⁵ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва

Введение. Эпигенетические механизмы, включая метилирование CpG-островков промоторных областей, играют критическую роль в регуляции экспрессии многих генов и сигнальных путей, задействованных в патогенезе онкологических заболеваний, в частности РМЖ. Наиболее важным фактором, способным предотвратить развитие опухоли, является система программируемой клеточной гибели, или апоптоза.

Задачи исследования. Оценить статус метилирования 3 проапоптотических генов *APAF1*, *DAPK1*, *BIM/BCL2L11* в развитии РМЖ.

Материалы и методы. В исследовании использовали репрезентативную выборку из 41 парного (опухоль/норма) образца РМЖ. Анализ метилирования проводили с использованием метода количественной метилспецифичной ПЦР с применением набора реактивов qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Для каждого парного образца был получен уровень метилирования. Достоверность различий оценивали в программной среде R с применением непараметрических тестов (U-тест Манна–Уитни, критерий Колмогорова–Смирнова). Для всех статистических тестов значимыми считали значения $p < 0,05$. Расчеты проводили в системе для статистического анализа данных SPSS 20.

Результаты. Высокий статистически значимый уровень метилирования в образцах опухолей по сравнению с гистологически неизменной тканью (условная норма) выявлен для генов *DAPK1* и *BIM* ($p < 0,05$). Также нами показано, что уровень метилирования генов *DAPK1*, *APAF1*, *BIM* статистически значимо ($p < 0,05$) выше в образцах больных на поздних, более тяжелых клинических стадиях, чем на I–II стадиях. Определена значимая ($p < 0,05$) ассоциация уровня метилирования гена *BIM* с размером опухоли и выявлена значимая ($p < 0,05$) связь с наличием метастазов в регионарные лимфатические узлы или отдаленные органы для генов *DAPK1* и *BIM*.

Выводы. Таким образом, полученные нами данные об эпигенетических нарушениях при РМЖ дополняют «молекулярный портрет» этого вида рака и вносят

вклад в понимание его патогенеза. Выявленные особенности метилирования исследованных генов могут найти клиническое применение для разработки современных подходов к прогнозированию, профилактике и выбору тактики лечения РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-315-00311 мол_а).

Роль микроРНК в регуляции экспрессии белоккодирующих генов при раке молочной железы

Е.А. Филиппова¹, И.В. Пронина¹, А.М. Бурденный¹, С.С. Лукина², Т.П. Казубская³, Э.А. Брага¹, В.И. Логинов¹

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

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва;

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

Введение. РМЖ характеризуется многочисленными генетическими и эпигенетическими нарушениями, которые приводят к активации или подавлению экспрессии многих белоккодирующих генов, что в совокупности приводит к формированию фенотипа трансформированной клетки. Эпигенетическими называют наследуемые изменения экспрессии генов, не затрагивающие последовательность ДНК (например, изменение уровня экспрессии генов микроРНК (миРНК)). Поэтому исследование изменения уровня экспрессии и метилирования генов миРНК важно для понимания процессов канцерогенеза при РМЖ.

Задачи исследования. Изучить роль метилирования в регуляции экспрессии генов миРНК при РМЖ и поиск пар миРНК — ген-мишень.

Материалы и методы. В исследовании использовали репрезентативную выборку из 58 парных (опухоль/норма) образцов РМЖ. Анализ метилирования проводили с помощью метода количественной метил-специфичной ПЦР с использованием набора реактивов qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Оценку уровня экспрессии миРНК выполняли с применением методов ПЦР в реальном времени на приборе фирмы BioRad (CFX96) с использованием лицензионных наборов фирмы Applied Biosystems — Taq Man MicroRNA Assays Kit (США). Расчеты проводили в системе для статистического анализа данных SPSS 20.

Результаты. В результате анализа уровня метилирования 15 генов миРНК показано, что 13 генов (*MIR-124-1/3*, *-125b-1*, *-127*, *-129-2*, *-132*, *-148a*, *-193a*, *-34b/c*, *9-1/3*, *-1258*) статистически значимо гиперметилированы, а ген *MIR-191* гипометилирован. Установлена значимая корреляция метилирования промоторных областей с уровнями экспрессии 10 генов

миРНК, что подтверждает функциональную роль метилирования генов данных миРНК в патогенезе РМЖ. При сравнении профиля экспрессии миРНК с уровнем экспрессии 10 белоккодирующих генов, отобранных с помощью инструмента CrossHub, нами были найдены статистически значимые отрицательные корреляции ($R_s = -0,32... - 0,51$; $p < 0,05$) между изменениями уровня экспрессии для следующих пар (миРНК — матричные РНК): *miR-124-3p* — *BCL2L11*, *miR-124-3p* — *RASSF1A*, *miR-127-5p* — *DAPK1*, *miR-125b-5p* — *TP53*, *miR-193a-5p* — *RHOA*, *miR-375* — *RASSF1A*, *miR-9-5p* — *DAPK1*.

Выводы. Установлена системная роль метилирования в регуляции 14 миРНК и предложены новые потенциальные взаимодействия миРНК с белоккодирующими генами, участвующими в регуляции клеточного цикла, апоптоза и эпителиально-мезенхимального перехода, что имеет фундаментальное значение и может найти применение как потенциальные мишени для разработок таргетной терапии в комплексном лечении РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-315-00311 мол_а).

Мутационные профили первично-множественных опухолей желудка

А.Д. Шахматова¹, Г.М. Бутрович¹, Е.Д. Мирлина¹, А.В. Гуляев², О.А. Вострюхина¹

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Ленинградская обл.;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Первично-множественные злокачественные опухоли (ПМЗО), или полинеоплазии, — независимые возникающие и развивающиеся злокачественные новообразования у одного пациента. Диагностика и лечение больных с ПМЗО — весьма серьезная задача современной онкологии: для выбора стратегии терапии очень важно отличать независимые ПМЗО от метастатических опухолей. Диагноз ПМЗО обычно ставят на основании гистологических и клинико-патолого-анатомических данных, но, по-видимому, наиболее точный ответ на вопрос, являются ли опухоли первично-множественными, может дать молекулярно-генетический анализ опухолевого материала, основанный на сравнении мутационных профилей новообразований, т.е. совокупности мутаций, приобретенных в ходе прогрессирования заболевания. Идентичные мутационные профили опухолей предполагают их моноклональную природу, и, следовательно, метастатический характер 2-й (3-й) карциномы, в то время как различные генетические повреждения, выявленные

во множественных новообразованиях, свидетельствуют о независимости их инициации и развития.

Задачи исследования. Ретроспективный анализ генетических изменений, накапливающихся в клетках пациента с мультифокальной аденокарциномой желудка (3 опухоли сходного гистологического типа). Мутационный профиль каждой опухоли определяли с применением ПЦР в режиме реального времени, ПЦР-SSCP (single-strand conformation polymorphism), метода электрофореза в денатурирующих условиях и при необходимости секвенирования по методу Сэнгера. Все образцы анализировали на наличие повреждений в микросателлитах BAT26 и BAT40 и в генах, являющихся мишенями дефектной работы системы коррекции неспаренных оснований ДНК, — *TGFBR2*, *VAX*, *MSH3*, *MSH6*, *IGF1R* и др., в «горячих точках» мутагенеза генов *TP53*, *BRAF*, *APC*, *KRAS* и в 3 микросателлитах — маркерах потери гетерозиготности (*TP53*, *CHRN1* и *D17S786*).

Результаты молекулярно-генетического анализа опухолей сопоставлены с клинко-патологоанатомическими данными пациента, на основе чего

составлена предположительная схема поэтапного развития заболевания. На 1-м этапе произошел сбой в системе коррекции неспаренных оснований (инициирующее повреждение), на II этапе в результате мутаций в генах-мишенях дефектной работы системы коррекции неспаренных оснований сформировалась первичная опухоль. На III этапе эта опухоль дала 2 метастаза, после чего первичная и вторичные опухоли развивались независимо, т. е. в процессе неопластической прогрессии появились дополнительные повреждения во всех 3 новообразованиях.

Эти данные привели к новым представлениям об истинном характере инициации и развития данного заболевания, первоначальный клинический диагноз которого — полинеоплазия — предполагал полную независимость выявленных опухолей.

Кроме того, выявленная во всех 3 опухолях точечная мутация GGC→GAC, т. е. замена Gly→Asp в 13-м кодоне гена *KRAS*, указывает на резистентность к терапии антителами против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR).

Тезисы

Роль межгенных взаимодействий полиморфных ЛОКУСОВ *APE1 (T444G)*, *hOGG1 (C977G)*, *ADPRT (T2285C)*, *XPD (T2251G)*, *EGFR (A2073T)*, *TERT (-2203 G>T)*, *TP53 (G215C)* в формировании повышенного риска аденокарциномы легкого

М.Л. Баканова¹, В.И. Минина^{1,2}, Я.А. Савченко¹,
В.А. Титов³, И.А. Вафин⁴

¹ФГБУН «Институт экологии человека СО РАН», Кемерово;

²ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», Кемерово;

³ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», Кемерово;

⁴ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», Кемерово

Введение. Рак легкого (РЛ) – наиболее распространенная форма рака во всем мире. В 2018 г. диагностировано 2093876 новых случаев РЛ, что составляет 11,6 % всех злокачественных опухолей. Одним из основных гистологических типов РЛ является аденокарцинома (АКЛ). Изучение наследственной предрасположенности к формированию РЛ стало в последние годы предметом широкомасштабных исследований. Большое количество работ сфокусировано на выявлении эффектов полиморфизмов одиночных нуклеотидов (SNP) в генах-кандидатах, среди которых с формированием АКЛ нередко ассоциируют гены, осуществляющие контроль репарации ДНК, клеточного цикла и апоптоза. Однако получаемые результаты требуют верификации с учетом ген-средовых и ген-генных взаимодействий.

Задачи исследования. Анализ взаимодействия генов репарации ДНК, клеточного цикла и апоптоза при формировании риска АКЛ у жителей Кемеровской области.

Материалы и методы. Обследованы 304 пациента с диагнозом АКЛ, первично обратившиеся для диагностики и лечения в Кемеровский областной онкологический диспансер, и 366 здоровых доноров Кемеровского областного центра крови. Полиморфные варианты генов *APE1 (T444G)*, *hOGG1 (C977G)*, *ADPRT (T2285C)*, *XPD (T2251G)*, *EGFR (A2073T)* изучали с помощью аллель-специфической ПЦР (НПФ «Литех», г. Москва), а полиморфные варианты *TERT (-2203 G>T)*, *TP53 (G215C)* – ПЦР в реальном времени (TaqMan assay, ООО «СибДНК», г. Новосибирск). Анализ межгенных взаимодействий проводили методом MDR (<http://www.multifactorialdimensionalityreduction.org/>).

Результаты. Анализ структуры межгенных взаимодействий при формировании АКЛ позволил выявить

статистически значимую трехлокусную модель в группе больных АКЛ, которая включала гены *EGFR (A2073T)*, *TP53 (G215C)*, *XPD (T2251G)* (воспроизводимость модели (CVC) – 10/10; точность (Pre) = 0,8099; $p < 0,0001$). Кластерный анализ позволил установить тесное взаимодействие между полиморфными локусами *EGFR (A2073T)* и *TP53 (G215C)*. Вклад локуса *XPD (T2251G)* дублировался с эффектами данного кластера и был наибольшим (энтропия (H) = 5,39 %).

Для мужчин обнаружена модель ген-генного взаимодействия, которая характеризовалась сильным взаимодействием с дублирующим эффектом генов *EGFR (A 2073T)* и *XPD (T2251G)* (CVC – 10/10; Pre = 0,7444; $p < 0,0001$). Вклад гена *XPD (T2251G)* был наибольшим (H = 5,16 %). Подобная модель была получена для курящих (CVC – 10/10; Pre = 0,8553; $p < 0,0001$). Однако вклад между генами был сходным. Для *XPD (T2251G)* H = 2,46 %, а для *EGFR (A2073T)* H = 2,42 %.

Двухлокусная модель выявлена у женщин и представляет собой тесное взаимодействие с дублированием эффектов генов *APE1 (T444G)* и *hOGG1 (C977G)* (CVC – 10/10; Pre = 0,7714; $p < 0,0001$). Вклад был наибольшим у гена *hOGG1 (C977G)* (H = 8,85 %).

Выводы. Полученные данные подтверждают предположение о возможной роли изученных генов в формировании риска развития АКЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания (№ 0352-2016-001).

Особенности опухолевой экспрессии генов факторов неангиогенеза, апоптоза и транскрипции при раннем рецидивировании рака предстательной железы

Ф.С. Бова

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

Задачи исследования. Исследование экспрессии генов, ответственных за контроль транскрипции, неангиогенез и апоптоз в опухолевой ткани, у больных локализованным РПЖ с биохимическими рецидивами (БР).

Материалы и методы. В операционных биоптатах РПЖ у пациентов основной группы ($n = 56$) с БР в течение 2 лет после радикальной простатэктомии, у пациентов группы сравнения ($n = 55$) без БР, в здоровых тканях при удалении доброкачественной гиперплазии предстательной железы у пациентов контрольной группы ($n = 55$) определяли экспрессию генов *NFKB1*,

HIF1 α , *VEGFA*, *VEGFB*, *BAX*, *BCL2* методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. В основной группе обнаружено повышение экспрессии гена *NFKB1* в 3,8 раза ($p < 0,001$), *HIF1 α* – в 4,9 раза ($p < 0,001$), *VEGFA* – в 3,1 раза ($p < 0,001$), *BCL2* – в 1,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. В группе сравнения экспрессия гена *HIF1 α* выше в 1,8 раза ($p < 0,05$), в экспрессии *VEGFA* отмечена недостоверная тенденция к повышению ($p = 0,17$) относительно контрольной группы. Экспрессия *BAX* в группе сравнения по отношению к контролю выше в 1,6 раза ($p < 0,05$), а для *BCL2* показана тенденция к снижению ($p = 0,09$). В основной группе в отличие от группы сравнения установлено повышение ($p < 0,05$) относительного показателя для генов *HIF1 α* (в 2,7 раза) и *VEGFA* (в 2,4 раза).

При изучении сопряжения между изменением экспрессии генов у больных РПЖ и развитием раннего рецидивирования заболевания установлена статистическая значимость между выраженностью экспрессии генов *NF- κ B* (χ^2 с непараметрической поправкой 9,89; $p < 0,001$), *HIF-1 α* (χ^2 6,74; $p < 0,001$), *VEGFA* (χ^2 8,21; $p < 0,001$), *BCL2* (χ^2 4,12; $p < 0,001$) и прогрессированием основного заболевания.

Выводы. У больных локализованным РПЖ после простатэктомии раннее рецидивирование заболевания ассоциировано с исходным повышением в операционных биоптатах экспрессии транскрипторных генов *HIF1 α* и *NF- κ B1*, гена фактора неопластического геноза *VEGFA*, антиапоптотического гена *BCL2*, а также снижением экспрессии проапоптотического гена *BAX*. Наиболее выраженное влияние на раннее рецидивирование локализованного РПЖ оказывает повышение опухолевой экспрессии генов в ряду *NFKB1–VEGFA–HIF1 α –BCL2*.

Количественное определение мутантного *KRAS* в плазме крови больных раком толстой кишки

И. В. Ботезату, И. О. Панчук, В. Н. Кондратова,
А. А. Коломейцева, Н. Н. Мазуренко, В. П. Шелепов,
А. В. Лихтенштейн

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Разработан высокочувствительный метод «обогащенной» ПЦР (посредством применения зондов TaqMan как блокирующих агентов) и последующего плавления ДНК (DNA Melting Analysis, DMA) для выявления низких концентраций мутантного *KRAS* в избытке аллелей дикого типа. Метод пригоден для экспресс-диагностики мутантных ДНК в тканях и биологических жидкостях организма. Кроме того, в изначально качественный тест введена дополнительная процедура компьютерной обработки пиков плавления (программа итеративной аппроксимации кривых

PeakFit), делающая его количественным и применимым в жидкостной биопсии (имеется в виду определение числа копий мутантных аллелей в 1 мл плазмы крови). Этот количественный показатель дает возможность объективно судить о динамике опухолевого процесса.

Проведено тестирование ДНК опухолевой ткани и плазмы крови 29 больных раком толстой кишки. Мутантные последовательности *KRAS* выявлены в 11 образцах плазмы крови и в 26 образцах опухолевой ткани. Через 6 мес после начала исследования повторно проведен анализ плазмы 3 больных. В 2 случаях мутантные аллели в ДНК не обнаружены, что свидетельствует об эффективности лечения. В 3-м образце количество мутантной ДНК возросло.

Онкогенное действие miR-196A в мультиформной глиобластоме путем ингибирования I κ Ba *in vitro*

И. Ф. Гареев¹⁻³, Y. Guang^{2,3}, Z. Shiguang^{2,3}, О. А. Бейлерли¹⁻³

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

²Харбинский медицинский университет, Харбин, Китай;

³Институт мозга человека, Харбинский медицинский университет, Харбин, Китай

Введение. Результаты недавних исследований показали, что микроРНК miR-196a активируется в клетках злокачественных глиальных опухолей или мультиформных глиобластом (GBM) и коррелирует с клиническим исходом пациентов с GBM. Однако о ее потенциальном участии в механизмах возникновения и развития GBM не сообщалось.

Материалы и методы. Мы использовали количественную ПЦР в реальном времени для оценки уровней экспрессии miR-196a в 132 образцах GBM. Онкогенную способность miR-196a детектировали с помощью анализов апоптоза и пролиферации в клетках U87MG и T98G. Иммуногистохимический (ИГХ) анализ использовали для определения экспрессии I κ Ba в тканях GBM, проводили репортерный анализ с помощью люциферазы, чтобы подтвердить, является ли I κ Ba прямой мишенью miR-196a.

Результаты показали, что miR-196a может непосредственно взаимодействовать с I κ Ba 3'-UTR для подавления экспрессии I κ Ba и впоследствии способствовать активации ядерного фактора κ B (NF- κ B), что приводит к распространению и подавлению апоптоза в клетках GBM *in vitro*. Результаты нашего исследования подтвердили, что экспрессия miR-196a в образцах GBM была повышена и высокие уровни miR-196a в значительной степени коррелировали с плохим исходом в большой когорте пациентов с GBM.

Выводы. MiR-196a оказывает свое онкогенное действие, ингибируя I κ Ba. Наши результаты дают новое представление о патогенезе GBM и указывают

на то, что miR-196 может прогнозировать клинические исходы пациентов с GBM и являться новой терапевтической целью для лечения GBM.

Полиморфизм гена *GSTP1* (Ile105Val, Ala114Val) как фактор, влияющий на эффективность химиотерапии у больных раком яичников

Д.Р. Долгова, И.Р. Мягдиева, И.О. Колодий

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»,
Ульяновск

Введение. Платиносодержащая ХТ является частью комбинированного лечения распространенного рака яичников (РЯ). Считается, что в 80–90 % случаев эффективность и токсичность цитостатиков генетически детерминированы и зависят, в частности, от активности ферментов II фазы детоксикации ксенобиотиков – глутатион-S-трансфераз (GST). Известно, что чувствительность опухоли к цисплатину также определяется полиморфизмом генов GST, которые с разной степенью эффективности инактивируют активные метаболиты платины внутри клетки путем конъюгирования с глутатионом с последующим выведением нетоксичного продукта из клетки (Е.В. Калинина, 2009).

Задачи исследования. Изучить влияние полиморфизмов гена *GSTP1* (Ile105Val, Ala114Val) на эффективность платиносодержащей ХТ при РЯ.

Материалы и методы. Исследовали геномную ДНК 120 первичных больных РЯ, получавших стандартную ХТ по схеме AP. Для определения полиморфизмов Ile105Val, Ala114Val гена *GSTP1* применяли метод аллель-специфической ПЦР. В качестве группы сравнения проанализирована ДНК практически здоровых женщин ($n = 86$). В статистическом анализе использовали критерий Фишера, χ^2 и *log-rank* тест.

Результаты. Установлено, что наличие в генотипе женщин функционально ослабленного аллеля *GSTP1* (генотип Ile/Val или Val/Val) является фактором риска возникновения РЯ (ОР 1,82; 95 % ДИ 1,1–2,8; $p = 0,02$). В случае второго функционально значимого SNP – Ala114Val – показано, что аллель *GSTP1*¹¹⁴Val встречается у больных РЯ с частотой 19 %, что выше, чем в контрольной группе – 5,5 % (ОР 3,20; $p = 0,023$). Выявлено, что в группе больных РЯ с ранними рецидивами (в течение 6 мес после завершения ХТ 1-й линии) по сравнению с группой пациентов с рецидивами, развившимися через 12 мес и позднее, или без рецидивов, чаще встречается генотип Ile/Ile *GSTP1* (ОР 4,30; 95 % ДИ 1,25–14,81; $p = 0,05$). Безрецидивный период в группе РЯ с генотипом Ile/Ile составил 22,4 мес, в группе с генотипом Ile/Val или Val/Val – 30,7 мес ($p = 0,121$). Высокая активность фермента

при варианте *GSTP1*¹⁰⁵Ile позволяет поддерживать повышенный уровень детоксикации цитостатиков в опухоли при РЯ. При этом генотипы Ile/Val и Val/Val *GSTP1*, с одной стороны, являются патогенетическим фактором возникновения РЯ, с другой – при применении схемы ХТ с включением цисплатина выполняют протективную роль в отношении ранних рецидивов.

Эффективность работы фермента *GSTP1* различается в зависимости от субстрата: аллель *GSTP1*¹⁰⁵Val улучшает результат ХТ с использованием антрациклинов при РМЖ, при этом снижая общую выживаемость больных РЯ, получавших схемы с цисплатином (Howells R., 2004; Моисеев А.А., 2008).

Выводы. Возможно, гиперэкспрессия *GSTP1* участвует в формировании резистентности опухолевых клеток при РЯ к схемам ХТ с включением цисплатина. Определение полиморфизма гена *GSTP1* может быть целесообразно для прогноза эффективности стандартной ХТ у пациентов с распространенным РЯ.

Значение полиморфизма гена *MDR1* в развитии хронического лимфолейкоза

А.А. Дубровина, В.А. Овсепян, Е.Л. Назарова, Е.Н. Зотина
ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови
ФМБА России», Киров

Введение. Отрицательную роль в развитии хронического лимфолейкоза (ХЛЛ) играют нарушения процессов биотрансформации ксенобиотиков. Известно, что Р-гликопротеин, кодирующийся геном *MDR1*, участвует в реализации одного из путей метаболизма ксенобиотиков, а также в формировании устойчивости к терапии. Степень экспрессии гена связывают с индивидуальными различиями в процессах биотрансформации, которые могут быть обусловлены однонуклеотидными полиморфизмами. Однако значение полиморфизма гена *MDR1* в развитии ХЛЛ не доказано.

Задачи исследования. Оценить значение полиморфизма гена *MDR1* в развитии ХЛЛ.

Материалы и методы. Обследованы 243 пациента с ХЛЛ (медиана возраста 63 года), из них 146 (60,1 %) мужчин и 97 (39,9 %) женщин. В группу сравнения вошли 309 здоровых добровольцев (медиана возраста 58 лет), из них 155 (60,2 %) мужчин и 154 (49,8 %) женщины. Распределение пациентов по стадиям (классификация Rai) было следующим: 0 стадия – 40 (16,5 %) пациентов, I стадия – 69 (28,4 %), II стадия – 102 (42,0 %), III стадия – 20 (8,2 %) и IV стадия – 12 (4,9 %). Анализ полиморфизма гена *MDR1* проводили в 2 локусах (1236 и 3435) с помощью метода аллель-специфической ПЦР с последующим этапом рестрикции.

Результаты. Распределение частот мутантных аллелей 1236С и 3435С гена *MDR1* в общей группе больных практически не отличалось от среднепопу-

ляционного значения (27,4 % против 27,2 % для полиморфизма С1236Т и 20,9 % против 15,2 % для С3435Т). При сравнительном анализе распределения частот аллелей и генотипов с учетом гендерных и возрастных характеристик групп, а также стадий заболевания статистически значимых результатов не получено. Комбинация MDR-1236ТТ/MDR-3435СТ, выявленная у 5 (2,1 %) больных и у 22 (7,1 %) добровольцев, обеспечивает низкий риск развития заболевания (ОР 0,27; $\chi^2 = 7,38$; $p = 0,007$). Установлено, что у больных ХЛЛ достоверно чаще встречался генотип 1236СС3435СС (37 (15,4 %) пациентов), чем у добровольцев (28 (9,1 %) человек), что свидетельствует о высоком риске развития предрасположенности к заболеванию (ОР 1,82; $\chi^2 = 5,14$; $p = 0,02$) у лиц с данной комбинацией локусов.

Заключение. Таким образом, большую роль в формировании предрасположенности к ХЛЛ играют межлокусные комбинации гена *MDR1*: генотип 1236СС3435СС является маркером высокого риска возникновения заболевания, генотип 1236ТТ3435СТ – низкого.

МикроРНК – новые маркеры светлоклеточного рака почки

Н.А. Иванова¹, А.М. Бурденный¹, Е.А. Филиппова¹,
И.В. Пронина¹, С.С. Лукина², Т.П. Казубская³,
Э.А. Брага¹, В.И. Логинов¹

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

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России, Москва;

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

Введение. Метилирование промоторных CpG-островков может подавлять экспрессию большого числа генов, в том числе генов микроРНК (миРНК), что может приводить как к возникновению, так и к прогрессированию рака.

Задачи исследования. Определение роли метилирования генов миРНК в патогенезе светлоклеточного рака почки (скРП), а также поиск новых маркеров для диагностики скРП и прогноза возникновения метастазов.

Материалы и методы. В работе использована выборка, состоящая из 70 парных (опухоль/норма) образцов скРП и 19 постсмертных тканей почки от людей без онкологии в анамнезе. Анализ метилирования проводили с использованием метода метилспецифичной ПЦР в реальном времени с использованием набора реактивов qPCRMix-HS SYBR (Евроген). Оценку уровня экспрессии миРНК выполняли с применением методов ПЦР в реальном времени на приборе фирмы Bio-Rad (CFX96) с использованием лицензионных наборов фирмы Applied Biosystems – Taq Man MicroRNA

Assays Kit (США). Расчеты проводили в системе для статистического анализа данных SPSS 20.

Результаты. В результате анализа уровня метилирования 19 генов миРНК в 70 парных образцах скРП было показано, что 15 генов (*MIR-124-1/2/3*, *-125b-1*, *-129-2*, *-132*, *-137*, *-193a*, *-34b/c*, *-9-1/3*, *-107*, *-130b*, *-1258*) статистически значимо гиперметилированы, а 2 гена миРНК (*MIR-191*, *-212*) гипометилированы. На выборке из 14 образцов скРП продемонстрировано, что 11 генов миРНК являются генами со сниженной экспрессией. Нами выявлена статистически значимая корреляция изменения уровня экспрессии миРНК с метилированием их промоторных районов для 8 генов: *MIR-124-3*, *-125b-1*, *-129-2*, *-137*, *-34b/c*, *-375*, *-9-3*. Также показана связь гиперметилирования большинства изученных генов миРНК с прогрессированием скРП (стадией, размером опухоли, степенью дифференцировки, наличием метастазов). В частности, гиперметилирование 6 генов (*MIR-125b-1*, *-129-2*, *-203a*, *-375*, *-107*, *-1258*) значимо коррелирует с наличием метастазов.

Для диагностики скРП и прогноза возникновения метастазов предложены 2 системы маркеров – *MIR-125b-1*, *-375*, *-137*, *-193a* и *MIR-125b-1*, *-375*, *-107*, *-1258*, *-203a* соответственно. Обе системы характеризуются высокой клинической чувствительностью и специфичностью (86 и 95 % соответственно (площадь под ROC-кривой 0,93)).

Выводы. Показано гиперметилирование 14 генов миРНК и ассоциация 6 миРНК с метастазированием при скРП, предложены новые системы маркеров для диагностики скРП и предсказания возникновения метастазов.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований для государственных академий на 2013–2020 гг. (№ 0520-2014-0030).

Роль андрогенового, прогестеронового и эстрогенового рецепторов в регуляции экспрессии микроРНК

Т.С. Калинина, В.В. Конончук, Л.Ф. Гуляева

ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН»,
Новосибирск

Введение. Изменение экспрессии микроРНК может происходить в результате воздействия ксенобиотиков, часть которых представлена эндокринными разрушителями. Например, инсектицид дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), активное использование которого в прошлом привело к мировому загрязнению данным соединением, обладает эстрогенными и антиандрогенными свойствами. Эстрогеновый и андрогеновый рецепторы (ER и AR соответственно) играют

значительную роль в прогрессии гормонозависимых опухолей, что указывает на возможную роль ДДТ в увеличении риска инициации опухоли, которая, среди прочего, сопровождается нарушением экспрессии микроРНК.

Задачи исследования. Исследование экспрессии микроРНК, потенциально регулируемых рецепторами ER, AR, а также прогестероновым рецептором (PGR), в культурах клеток эндометрия человека, обработанных ДДТ, и в образцах РМЖ. Поскольку экспрессия PGR регулируется рецептором ER, роль PGR в изменении экспрессии микроРНК под действием ксеноэстрогена ДДТ также представляет интерес.

Результаты. С помощью биоинформатического анализа были выбраны микроРНК, экспрессия которых может регулироваться указанными рецепторами: miR-190a, -190b, -196a, -27a, -23a, -24. Методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени в культуре нормальных клеток эндометрия человека показано увеличение экспрессии miR-190b, -24, -27a под действием 1 мкМ ДДТ, однако в культуре раковых клеток экспрессия miR-23a, -24, -27a снижалась, при этом увеличивался уровень матричных РНК их гена-мишени *APAF1*. Для оценки связи выявленных микроРНК с гормонозависимым канцерогенезом уровень их экспрессии был измерен в образцах злокачественных опухолей молочной железы. Выявлено, что экспрессия miR-23a, -24, -27a, -190a, в промоторах которых показано наличие сайтов связывания ER, AR и PGR, зависит от фенотипа опухоли: уровень микроРНК снижался при люминальном раке типа В, но экспрессия miR-23a, -24, -27a увеличивалась при люминальном раке типа А. Экспрессия ER-регулируемой miR-190b увеличивалась в образцах всех положительных по статусу ER фенотипов.

Выводы. Нарушение экспрессии микроРНК может происходить в результате изменения активности ядерных рецепторов ER, PGR и AR, на которую могут влиять ксенобиотики, в частности ДДТ.

Значение экспрессии ядерного рецептора *PPARβ/δ* в выживаемости клеток множественной миеломы человека

Н.Н. Калитин¹, Н.С. Кострица²

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

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

Введение. Ядерный рецептор *PPARβ/δ* является лигандактивируемым транскрипционным фактором, регулирующим большое число процессов в нормальных и неопластических клетках. Благодаря образова-

нию гетеродимерных белковых комплексов, например с ретиноид-Х рецепторами (RXRs), *PPARβ/δ* взаимодействует со специфическим респонсивным элементом в промоторе *PPARβ/δ*-таргетных генов и контролирует их экспрессию.

В ряде экспериментов *in vivo* и *in vitro* было выявлено участие *PPARβ/δ* в канцерогенезе при РМЖ, раке легкого, РПЖ и др. В то же время роль *PPARβ/δ* в патогенезе множественной миеломы (ММ) остается неисследованной.

Задачи исследования. Оценить экспрессию гена *PPARβ/δ* у пациентов с ММ и ее связь с общей выживаемостью. Исследовать влияние ингибирования *PPARβ/δ* на выживаемость клеток культивируемых линий ММ.

Материалы и методы. В исследование были включены 23 пациента с впервые выявленной ММ. Аспираты костного мозга пациентов разделены в градиенте плотности фикола, полученные мононуклеарные фракции были использованы для дальнейшего анализа экспрессии гена *PPARβ/δ* с помощью метода ПЦР в реальном времени. Клетки линий ММ RPMI-8226 и NCI-H929 культивировали в среде RPMI-1640 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Для подавления экспрессии *PPARβ/δ* использовали селективный антагонист GSK0660 (Tocris, США). Эффективность ингибирования *PPARβ/δ* определяли по снижению экспрессии известного *PPARβ/δ*-таргетного гена *PLIN2* в 2 временных точках (4 и 8 ч). Влияние подавления *PPARβ/δ* на пролиферацию оценивали колориметрическим МТТ-тестом. Исследование апоптоза и клеточного цикла выполняли с помощью проточной цитометрии. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 5.02.

Результаты. Выживаемость пациентов с высокой и низкой экспрессией *PPARβ/δ* достоверно различалась (медианы выживаемости 35 и 95 мес соответственно; $p < 0,01$). Экспрессия белка *PPARβ/δ* была выше в клетках линии NCI-H929, и именно эта линия была наиболее чувствительной к дозозависимому подавлению пролиферации с помощью GSK0660 ($p = 0,0005$). При этом ингибирование *PPARβ/δ* с помощью GSK0660 не влияло на апоптоз клеток NCI-H929 даже в максимальной концентрации антагониста (10 мкМ). Однако GSK0660-опосредованное подавление *PPARβ/δ* приводило к статистически значимому уменьшению числа клеток в фазе S ($p < 0,05$) и увеличению количества клеток в фазе G₂/M ($p < 0,05$).

Выводы. Наши результаты свидетельствуют о том, что экспрессия гена *PPARβ/δ* связана с выживаемостью пациентов с первичной ММ. Избирательное подавление активности *PPARβ/δ* приводит к снижению пролиферации клеток ММ *in vitro*, не влияя на апоптоз, но останавливая клетки в фазе G₂/M клеточного цикла.

Влияние носительства герминальных мутаций в гене *CHEK2* на прогноз при локализованном и местно-распространенном раке предстательной железы

А.А. Киричек, Л.Н. Любченко, В.Б. Матвеев
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Задачи исследования. Изучение прогностического влияния мутаций в гене *CHEK2* на отдаленные результаты радикального лечения у больных РПЖ.

Материалы и методы. В исследование включены 102 пациента с гистологически верифицированной аденокарциномой предстательной железы локализованной (T2N0M0) или местно-распространенной (T3/T4N0/N1M0) стадии заболевания, которые находились под наблюдением после радикального лечения. Всем пациентам проведена ДНК-диагностика на наличие клинически значимых патогенных герминальных мутаций 1100delC, I157T и IVS2+1C/A в гене *CHEK2* с помощью метода ПЦР в режиме реального времени. Показатели выживаемости до развития биохимического рецидива заболевания у носителей мутантного и дикого типа гена *CHEK2* были вычислены по методу Каплана–Майера. Для оценки прогностического влияния факторов был выполнен одно- и мультивариантный регрессионный анализ Кокса.

Результаты. Медиана наблюдения в исследовании составила 66,377 мес (9,15–202,59 мес). Мутации в гене *CHEK2* обнаружены у 15,69 % пациентов. Показатель выживаемости до биохимического рецидива был достоверно ниже у носителей мутаций *CHEK2* (медиана 4,787 мес; 95 % ДИ 0–9,992 мес), чем у носителей дикого типа гена (медиана 38,459 мес; 95 % ДИ 25,124–51,794 мес; χ^2 13,574; $p = 0,000$). Статистически достоверные различия выживаемости показаны в группах пациентов с местно-распространенным РПЖ pT3 – T4N0M0 (медианы 7,41 мес; 95 % ДИ 0–15,675 мес у носителей мутаций против 18,262 мес; 95 % ДИ 5,859–30,666 мес у носителей дикого типа *CHEK2*; χ^2 4,108; $p = 0,0403$) и лимфогенно-диссеминированным РПЖ pТлюбаяN1M0 (медианы 3,213 мес; 95 % ДИ 0–7,096 мес у носителей мутаций против 30,238 мес; 95 % ДИ 11,638–49,018 мес у носителей дикого типа *CHEK2*; χ^2 7,426; $p = 0,006$). В группе больных локализованным РПЖ pT2N0M0 обнаружена статистическая тенденция снижения выживаемости до биохимического рецидива в зависимости от носительства мутаций (медианы 6,852 мес; 95 % ДИ 0–37,587 мес при мутантном *CHEK2* против 66,393 мес; 95 % ДИ 23,838–108,949 мес при диком типе гена; χ^2 2,658; $p = 0,103$). По данным однофакторного анализа Кокса, наиболее сильным фактором прогноза оказалось наличие

мутаций в гене *CHEK2* (ОР 2,973; 95 % ДИ 1,618–5,462; $p = 0,000$), также показана прогностическая ценность низкодифференцированной опухоли с суммой баллов по шкале Глисона ≥ 8 (ОР 2,193; 95 % ДИ 1,169–4,115; $p = 0,014$), стадии $\geq pT2c$ (ОР 2,358; 95 % ДИ 1,165–4,773; $p = 0,017$), местно-распространенной стадии pT3/T4 (ОР 1,803; 95 % ДИ 1,110–2,929; $p = 0,017$), вовлечения регионарных лимфатических узлов pN1 (ОР 1,897; 95 % ДИ 1,116–3,225; $p = 0,018$). Мультифакторный анализ Кокса показал независимую прогностическую ценность носительства мутаций *CHEK2* ($p = 0,000$), низкодифференцированной опухоли с суммой баллов по шкале Глисона ($p = 0,018$), стадии $\geq pT2c$ ($p = 0,041$).

Выводы. Наряду с низкодифференцированным строением опухоли и стадией первичной опухоли $\geq pT2c$, носительство герминальных мутаций в гене *CHEK2* является независимым фактором неблагоприятного прогноза в отношении выживаемости без биохимического рецидива у больных локализованным и местно-распространенным РПЖ.

Клинико-морфологические корреляции герминальных мутаций в гене *CHEK2* при локализованном и местно-распространенном раке предстательной железы

А.А. Киричек, Л.Н. Любченко, В.Б. Матвеев
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Задачи исследования. Изучение клинико-морфологических характеристик у больных локализованным и местно-распространенным РПЖ в зависимости от носительства герминальных мутаций в гене *CHEK2*.

Материалы и методы. В исследование включены 102 пациента с гистологически верифицированной аденокарциномой предстательной железы локализованной (pT2N0M0) или местно-распространенной (pT3/T4pN0/N1M0) стадии заболевания. Всем пациентам проведена ДНК-диагностика на наличие клинически значимых патогенных герминальных мутаций 1100delC, I157T и IVS2+1C/A в гене *CHEK2* с помощью метода ПЦР в режиме реального времени. Для оценки достоверности различий в группах применяли методы параметрической (критерий Стьюдента) и непараметрической (U-тест Манна–Уитни) статистики в зависимости от вида распределения данных. Для выявления статистической зависимости между клинико-морфологическими характеристиками и носительством мутаций применяли χ^2 -тест Пирсона. Для оценки силы зависимости рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена или коэффициент сопряженности признаков Пирсона (в зависимости от переменных). Стати-

стически значимыми считали различия при $p < 0,05$ (95 %-й уровень значимости).

Результаты. Герминальные мутации в гене *CHEK2* обнаружены у 15,69 % пациентов. Средний возраст на момент начала заболевания больше у носителей мутаций — $63,81 \pm 9,874$ года (51–89 лет), чем у носителей дикого типа гена *CHEK2* — $60,35 \pm 6,48$ года (41–76 лет), однако тенденция не достигает статистической значимости ($p = 0,076$). Средний уровень простатического специфического антигена при выявлении заболевания значимо не различается в обеих группах: $19,14 \pm 16,806$ нг/мл у носителей мутантного гена и $17,13 \pm 16,345$ нг/мл у носителей дикого типа *CHEK2* ($p = 0,653$). Выявлена слабая отрицательная корреляция носительства мутаций с возрастом начала заболевания ≤ 65 лет ($\chi^2 4,312$; $p = 0,044$; коэффициент корреляции $-0,206$; $p = 0,0308$).

Отсутствует статистическая зависимость между носительством мутаций *CHEK2* и возрастом начала заболевания ≤ 55 лет ($p = 0,349$), уровнем простатического специфического антигена (ПСА) на момент выявления заболевания ≥ 10 нг/мл ($p = 0,422$) или ≥ 20 нг/мл ($p = 0,558$), клиническими стадиями сТ ($p = 0,515$), сN ($p = 1,000$), патоморфологическими стадиями pT ($p = 0,42$), pN ($p = 1,000$), местно-распространенным опухолевым процессом стадии pT3/T4 ($p = 0,281$), гистологической градацией опухоли по ISUP в биопсийном ($p = 0,392$) и операционном ($p = 0,122$) материале, низкодифференцированной формой опухоли с суммой баллов по шкале Глисона ≥ 8 ($p = 0,619$), наличием криброзных структур в опухоли ($p = 0,109$) и перинеуральной инвазии ($p = 0,783$).

Выводы. Герминальные мутации в гене *CHEK2* являются распространенными у больных локализованным и местно-распространенным РПЖ. Носительство мутаций в гене *CHEK2* значимо не зависит от стадии заболевания и валидированных клинико-морфологических характеристик.

Анализ ассоциации полиморфного варианта A-4889G гена *CYP1A1* с онкопатологией легкого у якутов

В.М. Николаев, Е.К. Румянцев, Е.В. Цыпандина,
С.И. Сафронова

ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», Якутск

Введение. Ген *CYP1A1*, локализованный на длинном плече 15-й хромосомы (15q22q24), протяженностью около 6 т. п. о., кодирует гидроксилазу ароматических углеводородов, которая отвечает за 1-й этап окисления в метаболизме большого количества ксенобиотиков (Utamaheswaran G. et al., 2014). В сообщениях многих исследователей полиморфный вариант A-4889G гена *CYP1A1* ассоциируется

с онкологическими заболеваниями легких (Ezzeldin N. et al., 2017).

Материалы и методы. Нами обследованы 60 больных раком легкого якутской этнической принадлежности. Диагноз рака легкого был подтвержден морфологически и рентгенологически. В контрольную группу вошли здоровые лица ($n = 60$), соответствующие по этническому происхождению и полу, не имеющие онкологических заболеваний.

Для выделения ДНК использовали стандартный метод фенольно-хлороформной экстракции. Анализ полиморфного варианта A-4889G гена *CYP1A1* проводили с использованием методов ПЦР на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Амплификацию и полиморфизм длин рестрикционных фрагментов выполняли по методике, предложенной Gronau и соавт. (2003).

Результаты. Согласно полученным нами данным, у больных раком легкого частота аллеля *CYP1A1**A была выше (82,4 %; $\chi^2 11,09$; $p = 0,0008$; ОР 0,41; 95 % ДИ 0,23–0,72), чем в контрольной группе (65,6 %). Гомозиготный генотип *CYP1A1**A/A встречался чаще в группе больных (72,97 %; $\chi^2 10,77$; $p = 0,001$; ОР 0,33; 95 % ДИ 0,16–0,68), чем в контрольной группе (46,75 %).

Частота мутантного аллеля *CYP1A1**G была меньше в группе больных раком (17,97 %; $\chi^2 11,09$; $p = 0,008$; ОР 2,46; 95 % ДИ 1,39–4,37), чем в контрольной группе (34,41 %). Частота гомозиготного генотипа по мутантному аллелю *CYP1A1**G/G в контрольной группе была выше в 1,9 раза, чем в группе больных (15,58 и 8,10 % соответственно), но различия не достигали статистически значимых показателей.

Частота гетерозиготного генотипа *CYP1A1**A/G в группе больных была ниже контрольного значения (18,90 и 37,66 % соответственно; $\chi^2 6,51$; $p = 0,01$; ОР 2,59; 95 % ДИ 1,16–5,83).

Выводы. Установлено, что маркерами повышенного риска развития рака легкого у якутов являются аллель *CYP1A1**A и генотип *CYP1A1**A/A, маркерами пониженного риска — аллель *CYP1A1**G, генотип *CYP1A1**G/G.

Возможная роль полиморфизма гена *TNFA* в патогенезе хронического миелолейкоза

В.А. Овсепян, Е.В. Трегубова, А.С. Лучинин, Н.В. Минаева
ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови
ФМБА России», Киров

Введение. Хронический миелолейкоз (ХМЛ) — трехфазное клональное миелолиферативное заболевание, пусковым механизмом развития которого является специфическая транслокация t(9;22)(q34;q11), в результате чего на укороченной (так называемой

«филадельфийской», Ph) хромосоме 22 образуется химерный онкоген *BCR-ABL*, приводящий к продукции конституционально активной тирозинкиназы. Появление слитной тирозинкиназы *BCR-ABL* (p210) в гемопоэтических предшественниках приводит к нарушению нормального функционирования клетки и ее злокачественной трансформации. В то же время в последние годы появляется все больше данных, указывающих на то, что определенный вклад в развитие и прогрессирование злокачественных новообразований наряду с приобретенными мутациями могут вносить также конституциональные особенности генома, в частности полиморфизм генов цитокинов.

К числу вероятных генов-кандидатов, ассоциированных с развитием ХМЛ, следует отнести, несомненно, ген цитокина *TNF α* – ключевого медиатора иммунных и воспалительных реакций, который в зависимости от клеточного контекста может индуцировать различные эффекты, такие как апоптоз, некроз, ангиогенез, пролиферация и дифференцировка клеток. Эти процессы играют важную роль как в противоопухолевом иммунном надзоре, так и в развитии и прогрессии опухоли, поэтому неудивительно, что в зависимости от условий *TNF α* проявляет как про-, так и противоопухолевые эффекты.

Задачи исследования. Анализ возможной ассоциации полиморфизма локуса –308G>A гена *TNFA* (rs1800629) с риском развития ХМЛ.

Материалы и методы. Материалом для исследования полиморфизмов послужили ДНК, выделенные из лейкоцитов венозной крови 122 больных ХМЛ и 315 практически здоровых лиц. Генотипирование полиморфизма локуса –308G>A гена *TNFA* проводили методом аллель-специфичной двухраундовой ПЦР.

Результаты. Установлено, что носительство аллеля –308A повышает риск развития ХМЛ (доминантная модель наследования: ОР 1,77; 95 % ДИ 1,02–3,07; $p = 0,04$; мультипликативная модель наследования: ОР 1,68; 95 % ДИ 1,00–2,84; $p = 0,05$). Возможная патогенетическая роль предрасполагающего (рискового) аллеля –308A обусловлена, скорее всего, повышением уровня экспрессии гена *TNFA*, что является результатом изменения консенсусного сайта связывания транскрипционного фактора – активаторного белка 2 (AP-2) – вследствие однонуклеотидной замены –308G>A. Повышенная продукция *TNF α* , по-видимому, увеличивает уровни антиапоптотических регуляторов и провоспалительных эффекторов, опосредованных через сигнальный путь универсального фактора транскрипции NF- κ B (nuclear factor κ B), контролирующего экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла.

Выводы. Таким образом, впервые в российской популяции выявлен возможный генетический маркер развития ХМЛ, являющийся полиморфным вариантом гена *TNFA*.

Соматические мутации в гене *EGFR* при немелкоклеточном раке легкого

Н.А. Огнерубов, В.Л. Чанг, В.Д. Сычев

ГБУЗ «Тамбовский областной онкологический клинический диспансер», Тамбов

На сегодняшний день хорошо известны онкогены, мутации которых ассоциированы со злокачественными образованиями различных локализаций: НМРЛ, колоректальный рак, рак поджелудочной железы и яичника.

Задачи исследования. Изучить частоту и спектр мутаций в гене *EGFR* у 107 пациентов (81 (75,7 %) мужчины и 26 (24,3 %) женщин) с НМРЛ, получавших лечение в Тамбовском областном онкологическом клиническом диспансере в 2014–2018 гг.

Большинство пациентов имели железистую дифференцировку – 73 (68,2 %) больных, а у 34 (31,8 %) пациентов был плоскоклеточный рак. Возраст больных составил 25–85 лет; наибольшее число пациентов (53 %) находилось в возрастной группе 55–65 лет. Мутации в гене *EGFR* наблюдались у 15 (14 %) больных, причем чаще всего (54 %) они отмечались в возрасте 55–65 лет. Исследование частоты мутации в зависимости от пола выявило достоверное ($p < 0,007$) преобладание их у лиц женского пола – 33,4 %. Это соответствует данным литературы.

Изучение спектра мутаций в гене *EGFR* выявило преобладание делеции в экзоне 19 – у 9 (60 %) больных. Причем частота их у мужчин и женщин составила 80 и 50 % соответственно. Вторая по частоте мутация в гене *EGFR* – однонуклеотидная замена лицина на аргинин в кодоне 858 экзона 21 (L858R) обнаружена у 6 (40 %) пациентов, причем в 20 % случаев она была выявлена у мужчин и в 50 % – у женщин.

Возрастной анализ позволил обнаружить, что в случаях замены L858R эта мутация чаще встречалась в возрастной группе 60–65 лет (медиана 66,5 года), а делеция в экзоне 19 – у лиц более молодого возраста – 55–63 лет (медиана 57 лет) ($p = 0,81$).

Согласно полученным данным соматические мутации в гене *EGFR* при НМРЛ у жителей Тамбовского региона представлены 2 основными типами: делециями в экзоне 19 и точечной заменой L858R в экзоне 21.

Клинико-морфологические особенности и экспрессия белка BCL-2 в карциномах молочной железы при мутации 5382insC гена BRCA1

Н.В. Павлова¹, А.А. Должиков², М.И. Чурносков²

¹ОГКУЗ «Белгородский онкологический диспансер», Белгород;

²ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород

Проведены молекулярно-генетическое исследование наличия мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2* у 217 больных РМЖ и 160 здоровых женщин, патоморфологическое и ИГХ-исследование опухолей при наличии мутаций. Для сравнения морфологическое и ИГХ-исследование выполнено в 66 случаях sporadического рака.

У 7 (3,2 %) из 217 пациенток с РМЖ выявлен вариант мутации 5382insC гена *BRCA1*. Ни в одном случае не обнаружено мутации 185delAG в гене *BRCA1* и мутации 6174delT в гене *BRCA2*. Скрининг этих мутаций у 160 здоровых женщин выявил гомозиготный статус дикого типа.

Средний возраст больных РМЖ при наличии мутации *BRCA1* 5382insC был достоверно ($p < 0,05$) меньше, чем при sporadическом раке (41,2 и 59,1 года соответственно).

При наличии генетически доказанной мутации *BRCA1* и клинических признаках, указывающих на высокую вероятность ее наличия (билатеральный рак), выявлена высокая пролиферативная активность опухолевых клеток по количеству как митозов, в том числе патологических, так и клеток с экспрессией Ki-67, которая в ряде случаев превышала 50 %. По гистологическим признакам и экспрессии p53 выявлялась высокая выраженность апоптоза опухолевых клеток. Гистологически все опухоли были инвазивными карциномами неспецифического типа.

В 66,7 % случаев BRCA1-ассоциированные опухоли были эстроген-рецептор-отрицательными, тогда как при sporadическом раке более 70 % опухолей рецептор-положительными. Гиперэкспрессия белка Her2/neu при наличии мутации выявлена только в 1 из 7 случаев. Определены различия экспрессии BCL2 при наличии мутации и без нее.

Показательными были ИГХ-отличия содержания BCL2 в метастатических клетках в сопоставлении с окружающими лимфоцитами, а также между опухолевыми клетками, в том числе при внутрипротоковом раке, и внутриопухолевыми лимфоцитами или миоэпителиальными клетками. В клетках метастазов реакция на BCL2 была низкой или отсутствовала. Во внутрипротоковых опухолевых структурах она также была низкой в BRCA1-ассоциированных карциномах. В sporadических карциномах низкий уровень экспрессии BCL2 выявлен в инвазивных структурах. При этом

в неинвазивном внутрипротоковом компоненте интенсивность реакции была высокой. Таким образом, низкая интенсивность реакции на BCL2 или ее отсутствие характеризуют BRCA1-ассоциированные карциномы и более агрессивные инвазивные и метастатические структуры как в связанных с мутацией, так и sporadических карциномах.

Имеется связь экспрессии BCL2 с гистологическим типом и, соответственно, дифференцировкой опухолевых структур как при BRCA1-ассоциированных, так и sporadических карциномах. В более дифференцированных железистых структурах уровень экспрессии был выше, чем в менее дифференцированных трабекулярных структурах и разрозненных опухолевых клетках.

На связь экспрессии BCL2 с биологическими особенностями карцином молочной железы указывают и отдельные клинические наблюдения. Мы наблюдали случаи инвазивной карциномы с метастазами в регионарных лимфатических узлах, яичниках, контрлатеральной молочной железе и редким вариантом метастазов — в желудке со скirroзным ростом. В метастазах всех локализаций экспрессия BCL-2 была низкой или отсутствовала, тогда как в первичной опухоли она была среднего уровня. Генетическое исследование в данном случае по объективным причинам не проведено. Однако можно с большой вероятностью считать, что низкий уровень BCL2 был ассоциирован с более агрессивным метастатическим клоном опухолевых клеток.

Роль метилирования промоторных CpG-островков генов микроРНК-9-1, -9-3, -34-b/c, -129-2 и -193A при раке молочной железы

Д.А. Рябчиков¹, И.А. Дудина², А.М. Казаков¹, И.К. Воротников¹, Д.А. Денчик¹, Т.П. Казубская¹, А.М. Бурденный³, В.И. Логинов³

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

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва;

³ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва

Задачи исследования. Изучить взаимосвязь между метилированием промоторных районов генов микроРНК-9-1, -9-3, -34b/c, -129-2, -193A и клинико-морфологическими характеристиками РМЖ.

Материалы и методы. Материалом исследования явились полученные интраоперационно парные образцы опухолевой и расположенной рядом гистологически неизменной ткани молочной железы 62 пациенток с диагнозом РМЖ. Молекулярно-генетические исследования проведены на базе лаборатории патогеномики и транскриптомики НИИ общей патологии и патофизиологии (заведующий лаборато-

рией д.б.н., проф. Э.А. Брага). Для оценки метилирования CpG-островков промоторных областей генов микроРНК-9-1, -9-3, -34b/c, -129-2 и -193A использовали метод метилспецифичной ПЦР, основанный на бисульфитной конверсии ДНК.

Результаты. Частота метилирования генов микроРНК при РМЖ по сравнению с парными образцами прилежащей гистологически нормальной ткани была выше в 2,9 раза для микроРНК-9-1 ($p = 0,0018$), в 3,7 раза – для микроРНК-9-3 ($p = 0,0006$), в 3,8 раза – для микроРНК-193a ($p = 0,00001$), в 4,3 раза – для микроРНК-129-2 ($p = 0,00001$) и в 5,7 раза – для микроРНК-34b/c ($p = 0,00001$). При сравнении профиля метилирования различных молекулярно-биологических подтипов РМЖ выявлено статистически значимое многократное увеличение частоты метилирования генов микроРНК-193a и микроРНК-9-3 при люминальном РМЖ. Также была установлена прямая статистически значимая связь профиля метилирования гена микроРНК129-2 с возрастом пациенток ($p < 0,05$), микроРНК-34b/c – с размером опухоли (20,1 % против 54,1 %; $p < 0,05$), стадией РМЖ (23,2 % против 53,3 %; $p < 0,05$), экспрессией Ki-67 (63,2 % против 25 %; $p < 0,05$); микроРНК-193a – с количеством пораженных лимфатических узлов (45,0 % против 77,8 %; $p < 0,05$), степенью G при люминальном РМЖ (0 % против 83,3 %; $p < 0,05$).

Выводы. Все исследуемые микроРНК продемонстрировали повышенный уровень метилирования CpG-островков. Статистически значимое многократное превышение частоты метилирования микроРНК-193A в люминальных подтипах РМЖ может использоваться в качестве перспективного маркера для оценки прогноза и мишени для терапии РМЖ данных подтипов. Большинство выявленных взаимосвязей между профилем метилирования микроРНК и клинико-морфологическими характеристиками опухоли были определены впервые. Широко распространенное при РМЖ гиперметилирование 5 генов микроРНК, подтвержденное в этом исследовании, дополняет концепцию о том, что эпигенетическая нестабильность является важным и решающим событием канцерогенеза.

Ассоциация полиморфизма генов у больных раком молочной железы в казахской популяции

Н.К. Сейдалин¹, Н.А. Шаназаров¹, А.А. Ахетов¹,
Т.А. Вошенкова¹, Г.А. Ермаханова¹, А.М. Рахимбеков²

¹РГП на ПХВ «Больница медицинского центра управления делами Президента РК», Астана, Республика Казахстан;

²РГП на ПХВ «Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева», Астана, Республика Казахстан

Введение. РМЖ является одой из ведущих проблем в практической онкологии в связи с высокой

распространенностью и расходами на лечение и реабилитацию. Уровень заболеваемости РМЖ неуклонно растет и занимает 1-е место среди всех онкологических патологий. Результаты эпидемиологических исследований показали значимую роль генетических факторов в развитии РМЖ. В настоящее время определено большое количество одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP), ассоциированных с риском развития, прогнозом течения РМЖ и ответом на лечение, однако нет убедительных данных для их клинического применения.

Материалы и методы. Проведено генотипирование 128 SNP у 96 пациенток с РМЖ и 96 здоровых женщин казахской популяции с использованием метода чипирования. Средний возраст пациенток составил 55 лет, медиана – 58 лет. Среднее время от момента установления диагноза до момента включения в исследование – 4 года, с медианой наблюдения 2 года. Распространенность основного заболевания на момент установления диагноза: I стадия – 21,3 %; II стадия – 48,2 %; III стадия – 15,8 %; IV стадия – 14,7 %.

По молекулярному ИГХ-профилю больные с люминальным типом А составили 66,3 %, с люминальным типом В – 7,9 %, с Her2⁺ – 10,5 %, с трижды негативным раком – 15,3 %.

Связь между SNP и РМЖ исследована методом логистической регрессии.

Результаты. Выявлен ряд SNP, имеющих наибольшую частоту различий в исследуемых группах.

Малые аллели rs121434592 с SNP C/C были сильно связаны с относительным риском РМЖ в популяции с коэффициентом 7,373 (95 % ДИ 4,51–12,03). Значимость C/C SNP в rs4415084 для ассоциации между локусами восприимчивости относительного риска РМЖ составили 4,512 (95 % ДИ 3,084–6,601) и также имели сильную связь.

По результатам исследования у больных РМЖ выявлена статистически значимая замена однонуклеотидного основания A/G на G/G в rs2229774 гена *RARG*, абсолютный риск (EER) составил 0,85, в то время как у здоровых женщин абсолютный риск (CER) составил 0,09 при относительном риске RR 9,5 ($\chi^2 111,6$; $p < 0,001$ с прямой сильной связью (+0,76)). Чувствительность и специфичность теста составили 0,92 и 0,84 соответственно. Таким образом, данный SNP был связан с высоким риском развития РМЖ в популяции.

Выводы. Как показывают результаты нашего исследования, SNP в rs121434592 и rs4415084 связаны с РМЖ в казахской популяции. Замена однонуклеотидного основания A/G на G/G в аллеле rs2229774 гена *RARG* имеет высокую диагностическую значимость в прогнозе развития РМЖ.

Древние гены регуляции энергообеспечения клетки в геноме железобактерий и человека

И.В. Тюмин¹, В.А. Мельников¹, О.В. Тюмина^{1,2},
Д.Ю. Ключников², В.В. Соколова¹

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара;

²ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия», Самара

Аналитический обзор научных работ по эволюции способа получения энергии растительными и животными клетками выявил первичную эволюционную роль автотрофного способа получения энергии. Первым на земле возник хемосинтез, при усложнении данной реакции появился фотосинтез, крайним этапом эволюции явился гетеротрофный тип питания, который используют в норме все клетки нашего организма.

Мы предположили возможное сохранение в геноме человека древних генов, ответственных за хемосинтетические реакции, которые в норме находятся в спящем состоянии, но при воздействии мутагенных факторов начинают экспрессироваться и приводить к явлению «энергетической метаплазии» и канцерогенезу.

Задачи исследования. Найти в геноме человека гомологи генов бактерии вида *Acidithiobacillus ferrooxidans*, которые отвечают за хемосинтетические реакции с участием железа.

Биоинформатический анализ данных генома железобактерий и человека проведен совместно с научной группой компании Ксивелью (Москва).

На 1-м этапе составлен список генов *Acidithiobacillus ferrooxidans*, для которых имеет смысл провести поиск потенциальных гомологов. Определены идентификаторы, названия, описания и аминокислотные последовательности этих генов. Далее гены из этого списка будем называть искомыми генами.

На 2-м этапе выполнен поиск гомологов искомых генов в геноме человека. Мы искали гомологи искомых генов в геноме человека 2 программами:

- blastp. Запрос — аминокислотная последовательность искомых генов, база — все белки человека;
- Exonerate, которая учитывает потенциальные интронные вставки в находках. Запрос — аминокислотная последовательность искомых генов, база — транслированный полный геном человека.

Мы считали находками выравнивания со следующими условиями:

- выравнивание покрывает хотя бы треть искомого белка с идентичностью не ниже 30 %;
- белки по длине отличаются не более чем в 2 раза.

С этими условиями в геноме человека нашлось 6 белков. Значимость находок указана по программе blastp, программа Exonerate новых находок не обнаружила.

Проведен поиск по последовательности доменов. Искали гомологи доменов искомых генов в геноме человека программой jackhmmer с параметрами jackhmmer -N 3-E 0.0001. Она использует скрытые марковские цепи для поиска цепочек гомологичных доменов, которые могут находиться в различных участках белка и в разном порядке. Запрос — аминокислотная последовательность искомых генов, база — все изоформы всех белков человека.

Мы отфильтровали результаты поиска, убрав находки в пределах изоформ одного и того же человеческого белка. Затем мы прочитали описание каждого человеческого белка в этом списке и выделили те из них, которые могут иметь отношение к метаболизму железа. Гены *BDH2_HUMAN* и *CYB_HUMAN* нашлись в обоих списках гомологов.

Таким образом, в геноме человека найдено несколько белков и доменов, которые с высокой значимостью похожи по последовательности на гены из бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Вероятно, эти гены в определенных условиях экспрессируются и происходит смена энергетического обеспечения клетки.

Влияние молекулярно-генетических aberrаций на выживаемость больных увеальной меланомой

М.Р. Хлгатын¹, С.В. Саакян¹, А.Ю. Цыганков¹, А.Г. Амирян¹,
А.М. Бурденный², В.И. Логинов²

¹ФГБУ «МНИИ глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, Москва;

²ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва

Введение. В последние годы при прогнозировании течения увеальной меланомы ряд авторов уделяют большое внимание роли молекулярно-генетических aberrаций. Наиболее ключевыми считаются полная потеря одной копии (моносомия) хромосомы 3, делеция короткого плеча хромосомы 1, полисомия хромосомы 8q и специфический набор генов (*GNAQ/GNA11*, метилирование промоторных районов гена *RASSF1A*, полиморфизм гена *ABCB1/MDR1*).

Задачи исследования. Определить 5-летнюю выживаемость больных увеальной меланомой после энуклеации в зависимости от молекулярно-генетических aberrаций.

Материалы и методы. Обследованы и пролечены 30 больных увеальной меланомой в возрасте 23–83 лет. Во всех случаях проведена энуклеация. Удаленные глаза подверглись морфологическому и молекулярно-генетическому анализу (потеря гетерозиготности на хромосомах 1, 3 и 8, метилирование гена *RASSF1A*,

полиморфизм гена *ABCBI*). Медиана наблюдения составила 61 мес.

Результаты. За период наблюдения 10 из 30 пациентов погибли от метастатической болезни. Кумулятивная 5-летняя доля выживших больных составила $63 \pm 9\%$. Больные с моносомией хромосомы 3 демонстрировали более низкие показатели 5-летней выживаемости, чем больные с частичной моносомией и без потери гетерозиготности в хромосоме 3 (*log-rank* тест, $\chi^2 14,111$; $p = 0,001$). Потеря гетерозиготности на хромосомах 1 и 8, метилирование гена *RASSF1A* и полиморфизм гена *ABCBI* не были ассоциированы с худшим витальным прогнозом больных увеальной меланомой.

Выводы. Молекулярно-генетические aberrации играют важную роль в прогнозировании течения опухолевого процесса и определении риска гематогенного метастазирования у больных увеальной меланомой. Доказана ведущая роль для витального прогноза выявления полной моносомии хромосомы 3 и ее ассоциация с молекулярно-генетическими изменениями. В связи с относительно малой выборкой, а также временным фактором роль других молекулярно-генетических изменений не подтверждена.

Этиология почечно-клеточного рака: современные представления

О.В. Шаньгина, А.Ф. Мукерия, Д.Г. Заридзе
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Рак почки представлен 2 основными гистогенетическими формами: почечно-клеточным раком (ПКР) и переходно-клеточным раком. ПКР составляет более 90 % рака почки. Заболеваемость ПКР в мире достаточно высока и во многих развитых странах продолжает расти, в том числе и в России. Динамика смертности стабилизировалась.

Задачи исследования. Обобщить результаты собственных исследований и другие опубликованные научные данные по эпидемиологии и этиологии ПКР.

Материалы и методы. В процессе проведения анализа использовалась база данных медицинских и биологических публикаций PubMed, а также научной электронной библиотеки eLibrary.

Результаты. Доказанными факторами риска спонтанного, т.е. не наследственного, ПКР являются курение, избыточная масса тела, ожирение, гипертония, некоторые профессиональные факторы, экспозиция к пестицидам и трихлорэтилену. Факторы образа жизни, например курение, не только повышают риск развития ПКР, но и влияют на выживаемость больных. Так, например, риск смерти от неонкологических причин у продолжающих курить больных ПКР в 2 раза выше по сравнению с никогда не курившими больными, а риск развития второй опухоли у продолжающих курить больных ПКР более 20 сигарет в день в 5 раз выше, чем у некурящих пациентов.

В этиологии спонтанного ПКР важную роль играет низкопенетрантный генетический полиморфизм, который, в отличие от высокопенетрантных мутаций, встречается довольно часто. Однако риск развития рака, ассоциированный с этим типом наследственности, невысок. Тем не менее большинство опухолей человека развиваются в результате комбинированного эффекта большого числа генов с низкой пенетрацией, т.е. имеют полигенную этиологию.

Результаты молекулярно-эпидемиологических исследований, основанных на предварительной гипотезе, выявили варианты генетического полиморфизма генов *GST*, *MTHFR*, *TUMS*, *VHL*, связанные с риском развития ПКР и экзогенными факторами, экспозиция к которым повышает риск ПКР, такими как курение, питание и профессиональные вредности. В результате полногеномных исследований идентифицированы около 20 однонуклеотидных полиморфизмов высокого риска, которые, впрочем, объясняют лишь 10 % риска семейных случаев ПКР.

Выводы. Будущие полногеномные исследования, направленные на идентификацию однонуклеотидных полиморфизмов высокого риска, поиск новых полиморфных вариантов генов, повышающих риск ПКР, приведут к лучшему пониманию биологии ПКР и будут способствовать разработке новых направлений профилактики, ранней диагностики и лечения этого заболевания.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Доклады

Белки системы инсулиноподобных факторов роста в асците при раке яичников

А.Б. Виллерт, Л.А. Коломиец, Н.В. Юнусова

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Асцит при раке яичников (РЯ) представляет собой легкодоступный и ценный источник клеточного и внеклеточного компонентов, задействованных в овариальном канцерогенезе. Прогностические факторы, связанные со злокачественным асцитом при РЯ, в настоящее время изучены недостаточно. Среди растворимых компонентов асцита ведется активный поиск дополнительных прогностических и предикторных факторов, позволяющих уточнить молекулярный фенотип рака и персонализировать лечение.

Задачи исследования. Изучение параметров системы insulin-like growth factors (IGF) и компонентов IGF-опосредованного сигнального пути при РЯ, поскольку имеются данные о том, что высокий уровень IGFBP-3 до ХТ и высокий уровень IGF-II после ХТ в асците у больных РЯ коррелирует с низкой общей выживаемостью.

Материалы и методы. В исследование включены 40 больных с диагнозом РЯ IIIС–IVА стадии, проходивших лечение в отделении гинекологии НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН». Во всех случаях был верифицирован high-grade серозный рак. Всем больным проводили забор асцитической жидкости, и в ее бесклеточной части определяли тотальный (внутриклеточный и внеклеточный) пул свободных IGF, а также IGFBP-3, IGFBP-4 и PAPP-A с использованием наборов ELISA (R&D Systems, DSL, Abcam), содержание белка определяли по методу Лоури.

Результаты. Уровни обоих факторов роста и связывающих белков в асците превышали соответствующие показатели в первичной опухоли более чем в 10 раз. Различий в отношении PAPP-A выявлено не было. Исследован уровень факторов роста и связывающих белков в зависимости от объема асцита. Максимальные

уровни IGF-II и PAPP-A выявлены при диссеминированном РЯ при умеренном количестве асцита (от 200 до 1000 мл). При большом количестве асцитической жидкости (>1000 мл) при высоком уровне PAPP-A уровень обоих факторов роста, особенно IGF-II, снижался ($p < 0,05$).

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о значимости изучения параметров системы IGF в асцитической жидкости. Уровень белков системы IGF значительно зависит от объема асцитической жидкости, что не противоречит существующим данным о различных молекулярных профилях низкодифференцированных серозных аденокарцином с малым и большим (>1000 мл) объемом асцита.

Влияние нокаута метилтрансферазы Set7/9 на чувствительность клеток карциномы легкого человека к генотоксическим агентам

А.А. Дакс¹, В.А. Мамонтова¹, О.А. Федорова¹,
А.В. Петухов^{1,2}, О.Ю. Шувалов¹, Н.А. Барлев¹

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

²ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России,
Санкт-Петербург

Метилтрансфераза Set7/9 изначально была описана как гистонспецифическая метилтрансфераза, способная метилировать 4-й лизин гистона H3 (H3K4). Позднее было показано, что данный фермент способен модифицировать до 30 различных негистоновых мишеней, в том числе онкосупрессор p53. Как известно, p53 является регулятором таких клеточных процессов, как продвижение по клеточному циклу, аутофагия, апоптоз и ответ клетки на различные стрессовые воздействия.

Ранее нашей группой было показано, что белок Set7/9 способен влиять на активность p53 и чувствительность клеток к генотоксическим химиопрепаратам. С помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 мы создали линию немелкоклеточной

карциномы легкого человека A549 с нокаутом гена *SETD7*, кодирующего метилтрансферазу Set7/9. Используя данную клеточную модель, мы продемонстрировали, что нокаут Set7/9 приводит к повышению чувствительности клеток немелкоклеточной карциномы легкого к генотоксическим препаратам различного типа действия — доксорубицину и цисплатину, а также вызывает повышение уровня апоптоза при обработке клеток этопозидом и цисплатином. Мы также продемонстрировали, что Set7/9 подавляет образование фокусов белков репарации γ -H2AX. На основании полученных нами данным можно сделать вывод о том, что метилтрансфераза Set7/9 вовлечена в клеточный ответ на генотоксический стресс и может рассматриваться как потенциальный маркер эффективности генотоксической ХТ рака легкого человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-315-20013 мол_а_вед).

Исследование компенсаторных механизмов в клетках нейробластомы с подавленной экспрессией рецепторной тирозинкиназы KIT

Т.Д. Лебедев, П.В. Спиринов, Э.Р. Ваганова, П.М. Рубцов, А.А. Буздин, В.С. Прасолов

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

Нейробластома представляет собой эмбриональную опухоль, возникающую из клеток нервного гребня. На долю нейробластом приходится почти 15 % всех

смертей, связанных с педиатрическими онкологическими заболеваниями. Одним из наиболее эффективных подходов к лечению злокачественных заболеваний является таргетная терапия. Однако для нейробластом до сих пор отсутствуют эффективные подходы в таргетной терапии. Это связано в первую очередь со способностью злокачественных клеток приобретать резистентность к противоопухолевым препаратам. Рецепторная тирозинкиназа KIT экспрессируется в значительном количестве нейробластом, а также во множестве других злокачественных опухолей. KIT-положительные клетки нейробластом характеризуют агрессивную субпопуляцию раковых стволовых клеток, и ингибирование KIT приводит к снижению роста опухоли, поэтому KIT считается перспективной мишенью для лечения. Мы показали, что подавление экспрессии KIT с помощью РНК-интерференции в клетках нейробластом приводит к активации компенсаторных механизмов. Эти механизмы связаны в первую очередь с действием ростовых факторов, которые спасают злокачественные клетки от гибели. Мы обнаружили, что одним из ключевых компонентов таких компенсаторных механизмов являются киназы ERK1/2. Ингибирование ERK1/2 приводит к гибели клеток с подавленной экспрессией KIT и, кроме того, усиливает действие таргетного препарата иматиниба, одной из мишеней которого является KIT. Ингибирование ERK также блокирует способность клеток нейробластом адаптироваться к действующим концентрациям иматиниба.

Результаты получены в рамках Программы фундаментальных исследований для государственных академий на 2013–2020 гг. (грант № 01 201 363 823). Эксперименты с функциональной клеточной культурой выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-04-01 697А).

Постеры

Экспрессия нуклеолина и нуклеофозмина при раке почки

А.В. Балбуцкий, Л.Ф. Морозова, А.В. Онян, С.Д. Бежанова, А.А. Лушникова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Ежегодно в мире регистрируется 210 тыс. новых случаев рака почки (РП), 80–90 % которых составляет светлоклеточный рак (СРП). Для него характерна относительная резистентность к ХТ при отсутствии диагностических маркеров. На линиях клеток СРП и опухолевых биоптатах РП мы выявили высокую молекулярно-генетическую гетерогенность и поликлональность РП. Основными компонентами ядрышек в активно пролиферирующих опухолевых клетках являются шаперонные белки нуклеолин (NCL) и нуклеофозмин (NPM), которые также высоко экспрессируются в цитоплазме, а NCL – и на поверхности этих клеток.

Задачи исследования. Анализ особенностей экспрессии NCL и NPM в клетках первичного и метастатического РП с целью определения возможности использования этих белков в качестве мишеней для молекулярно-направленной терапии.

Материалы и методы. Исследовали 3 клеточные линии СРП от пациентов с метастазами и 25 биопсийных образцов (из них 21 – СРП), включая 16 метастазов СРП. Анализ экспрессии NCL и NPM в клеточных линиях показал высокий уровень матричной РНК и белков с преобладанием нуклеолина за счет его гиперэкспрессии на поверхности клеток. Для иммуногистохимического окрашивания клеток или срезов опухолей использовали моноклональные антитела к NCL или NPM (LabVision), анализ и статистическую обработку изображений выполняли в программе MatLab 6.0.

Результаты. Показано, что в первичном РП суммарная экспрессия различных фракций белков ниже, чем в метастатическом ($p < 0,05$); в ядрах клеток метастатического РП увеличивалось количество окрашенных фибриллярных центров, число которых сильно варьировало – от 18 до 50, в первичных опухолях – от 5 до 20; относительная плотность окрашенных белковых гранул в фибриллярных и нуклеонемных участках в регионарных и отдаленных метастазах РП значительно превышала таковую в первичном РП и культурах клеток, что отражает высокую функциональную активность и вклад NCL и NPM в метастазирование РП. Эти белки необходимы для ключевых клеточных процессов, в том числе для регуляции транскрипции,

трансляции, синтеза ДНК, процессинга матричной РНК и биогенеза рибосом, пролиферации, клеточно-го сигналинга, апоптоза, молекулярного транспорта.

Выводы. Ингибирование NCL и NPM путем связывания с различными лигандами (например, с катионными пептидами) индуцирует апоптоз по типу ядрышкового стресса с участием каспаз. Наличие клонов клеток с многочисленными активными ядрышками и высокими уровнями экспрессии NCL и NPM в клетках характерно для метастатических опухолей. Поэтому оценка экспрессии NCL и NPM при РП позволяет прогнозировать риск метастазирования и выживаемость больных.

Активация антиапоптотических сигнальных путей в клетках лейкоза человека в ответ на подавление KIT

Э.Р. Вагапова^{1,2}, П.В. Спиринов¹, Т.Д. Лебедев¹, Н.Ю. Пойменова¹, А.А. Буздин¹, П.М. Рубцов¹, В.С. Прасолов^{1,2}

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

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Москва

Для 80 % случаев острого миелоидного лейкоза характерно наличие экспрессии протоонкогена *KIT*. Рецепторная тирозинкиназа *KIT* является перспективной мишенью для разработки антилейкозных препаратов. На данный момент ингибиторы *KIT* не используются для лечения острого миелоидного лейкоза, так как не являются достаточно эффективными и не приводят к полной ремиссии. Вероятно, что клетки с мутантным *KIT* могут адаптироваться к терапевтическому воздействию за счет активации в них компенсаторных механизмов. Однако механизмы, обуславливающие появление резистентных к ингибиторам *KIT* клонов, до сих пор не изучены. Нами было выполнено подавление экспрессии *KIT* в перевиваемых клетках лейкоза человека методом РНК-интерференции. Было показано, что в ответ на подавление *KIT* скорость роста клеток снижается, а также происходит изменение уровней экспрессии циклинов и циклинзависимых киназ. Анализ данных полногеномного секвенирования на микрочипах продемонстрировал существенное изменение целого ряда сигнальных каскадов в ответ на подавление *KIT*. Показано, что активируются сигнальные пути, ответственные за выживание, уход от апоптоза и стимуляцию пролиферации клеток, и большинство этих путей являются ERK-ассоциированными. Кроме того, повышается активность

сигнальных путей, связанных с продукцией цитокинов и ответом на их связывание.

Таким образом, в ходе работы обнаружены компенсаторные механизмы, реализуемые в злокачественных кроветворных клетках в ответ на подавление *KIT*, большая часть из которых осуществляется при участии киназы ERK2.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 17-04-01555, № 17-29-06049).

Результаты по исследованию жизнеспособности клеток выполнены при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-14-01089-П).

Результаты иммуногистохимического анализа Sonic Hedgehog – ключевого фактора патогенеза базальноклеточной карциномы

О.В. Волков, Е.В. Моисеенко-Голубович, А.Б. Иванова, В.В. Грома

Рижский университет им. Паула Страдина, Рига, Латвийская Республика

Введение. Базальноклеточная карцинома (БКК) является одной из самых обсуждаемых проблем нынешней онкологии. Опухоль занимает 1-е место среди немеланоцитарных опухолей кожного покрова, и заболеваемость постоянно увеличивается. Это связано с рецидивами, частота которых достигает 20–40 %. Сигнальный путь Sonic Hedgehog (Shh) – это путь, который регулирует процессы пролиферации и дифференциации клеток во время эмбриогенеза человека. Нарушения сигнального пути Shh, индуцируемые мутациями, играют ключевую роль в развитии БКК.

Задачи исследования. Изучение особенностей экспрессии Shh в операционном материале, представляющем нодулярный (Н), микронодулярный (МН), суперфициальный (С) и инфильтративный (И) типы БКК.

Материалы и методы. Экспрессия Shh оценена полуквантитативно, путем анализа результатов иммуногистохимических реакций в 3 районах операционного материала – в опухоли, опухолевой строме и строме пограничных тканей.

Результаты. В ходе исследования были найдены различия в экспрессии между типами БКК. Статистически достоверные различия отмечены между типами И и С, где экспрессия в строме пограничных тканей выше, чем в строме опухоли. Чаще всего (55 % случаев) экспрессия в строме пограничных тканей встречалась в БКК типа И, напротив, реже всего (35 %) – в БКК типа Н. В случае БКК типов С и МН экспрессия Shh была положительной в 45 и 44 % соответственно. В строме опухоли положительная экспрессия чаще

всего (66 %) встречалась в БКК типа С, реже всего (40 %) – в БКК типа Н. БКК типов МН и И демонстрировали положительную экспрессию в 50 и 63,3 % случаев соответственно. В опухоли самая высокая экспрессия (97,6 %) наблюдалась в БКК типа С. Самая низкая (83,4 %) экспрессия была отмечена в БКК типа И.

Выводы. Выявление особенностей экспрессии Shh в разных районах операционного материала в зависимости от типа БКК позволит точнее предвидеть и, возможно, снизить риск развития рецидивов в будущем.

Изучение экспрессии генов-мишеней арил-гидрокарбонowego рецептора в культурах клеток остеогенной саркомы человека

Ю.Е. Воронцова, О.Б. Симонова

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН», Москва

Введение. Остеогенная саркома – агрессивная злокачественная опухоль костной ткани, возникающая в молодом возрасте (10–19 лет). Арил-гидрокарбонový рецептор (Aryl Hydrocarbon Receptor, AHR) – лиганд-зависимый транскрипционный фактор, который связан с детоксикацией ксенобиотиков и канцерогенезом. Предварительный анализ показал высокую концентрацию AHR в культурах клеток остеогенной саркомы по сравнению с нормальными и другими опухолевыми клетками. Однако в мировой литературе отсутствуют работы, посвященные исследованию экспрессии этого фактора и его целевых генов в клетках остеосаркомы.

Задачи исследования. Сравнительный анализ уровня экспрессии AHR, его партнера ARNT (AHR Nuclear Translocator) и генов-мишеней AHR из семейства цитохрома P450 (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B*) до и после активации AHR его лигандами в полученных клеточных культурах остеогенной саркомы и других культурах неопухолевого (HEK293, MSC) и опухолевого происхождения (Mcf7, PC3, Sus/fP2).

Материалы и методы. Из биопсийного материала злокачественных опухолей костной ткани пациентов, находящихся на лечении в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, с соблюдением всех этических норм мы получили 3 первичные культуры (O.src25/16, O.src17/18a, O.src17/18b). Для активации AHR использовали его известные лиганды: индол-3-карбинол и индирубин. Уровень экспрессии оценивали с помощью ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга.

Результаты. В отсутствие лиганда клеточные культуры остеосарком характеризовались высоким уровнем экспрессии AHR и *CYP1B* по сравнению с другими линиями, при этом уровень экспрессии ARNT во всех

используемых линиях, кроме НЕК293, был очень низкий. После воздействия лигандами экспрессия генов-мишеней АНР повышалась во всех линиях, кроме НЕК293. Самым чувствительным к воздействию лигандов оказался ген *CYP1A1*. Однако положительной корреляции между уровнем экспрессии генов семейства *CYP* и типом лиганда в исследуемых культурах клеток не выявлено.

Выводы. Полученные данные, возможно, позволят понять молекулярные процессы, которые лежат в основе агрессивного течения, характерного для остеогенных сарком, и открыть новые направления для возможных терапевтических воздействий.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-34-00162 мол_а) и раздела Государственного задания ИБР РАН № 0108-2018-0001.

Взаимосвязь компонентов VEGF/PI3K/АКТ-сигнального пути с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы

Т.А. Дронова^{1,2}, Н.Н. Бабышкина^{1,2}, С.В. Паталяк¹, М.В. Завьялова^{1,3}, Е.М. Слонимская^{1,3}, Н.В. Чердынцева^{1,2}, Ю.Г. Кжышковска^{2,4}

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

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

⁴Университет Гейдельберга, Гейдельберг, Германия

Введение. Взаимодействие внутриклеточных сигнальных каскадов рецепторов факторов роста с эстрогеновыми рецепторами может обуславливать развитие резистентности/чувствительности к гормональной терапии тамоксифеном.

Задачи исследования. Оценить взаимосвязь основных компонентов VEGF/PI3K/АКТ-сигнального пути с эффективностью адъювантной терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым РМЖ.

Материалы и методы. Согласно отдаленным результатам лечения сформированы 2 группы больных: тамоксифен-резистентная (пациентки с прогрессированием заболевания на фоне терапии тамоксифеном) и тамоксифен-чувствительная (больные без признаков прогрессирования заболевания). Уровень экспрессии мРНК *ESR1*, *VEGFR2*, *AKT1*, *PTEN*, полиморфные варианты генов *ESR1* (rs2077647, rs2228480, rs1801132), *KDR* (rs2071559, rs2305948), *AKT1* (rs1130233) и *PTEN* (rs11202592) изучены с помощью ПЦР в режиме реального времени. ИГХ-методом проведена оценка экспрессии VEGFR2, ERα, Akt (pS473) и PTEN.

Результаты. Установлено, что уровень белковой экспрессии как VEGFR2, так и Akt (pS473) был значительно выше среди пациенток тамоксифен-резистентной группы по сравнению с тамоксифен-чувствительной ($p = 0,042$ и $0,048$ соответственно). Гетерогенный характер распределения ERα чаще наблюдался в опухолях больных с прогрессированием заболевания на фоне терапии тамоксифеном ($p = 0,003$). Высокий уровень экспрессии мРНК *ESR1* и мутантный вариант *ESR1* 2014AA (rs2228480) были ассоциированы с резистентностью к тамоксифену ($p = 0,041$ и $0,013$ соответственно).

Выводы. Уровень белковой экспрессии VEGFR2, Akt (pS473), экспрессии мРНК *ESR1*, SNP *ESR1* (rs2228480) и характер распределения ERα могут быть потенциальными прогностическими маркерами в отношении ответа на терапию тамоксифеном.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-29-06037).

Роль сигнального пути Notch в регуляции опухолевых стволовых клеток рака легкого и толстой кишки

М.В. Новикова¹, Н.В. Хромова¹, В.А. Рыбко¹, В.Б. Дугина², Б.П. Копнин¹, П.Б. Копнин¹

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

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Введение. Данные последних исследований указывают на ключевую роль опухолевых стволовых клеток (ОСК) в метастазировании, резистентности к химио- и радиотерапии, рецидивировании большинства солидных опухолей. Сигнальный путь Notch задействован во внутри- и межклеточных взаимодействиях различных типов клеток как в эмбриогенезе, так и в клеточной регуляции тканей взрослого организма. Онкогенная роль Notch в процессах выживания, пролиферации и миграции опухолевых клеток, а также в поддержании популяции ОСК доказана для многих типов солидных опухолей.

Задачи исследования. Изучение влияния подавления экспрессии *NOTCH1* на популяцию и свойства ОСК в клеточных линиях рака легкого (A549) и толстой кишки (HCT116) человека.

Материалы и методы. В исследовании использованы клеточные сублинии A549 и HCT116 с подавленной в результате экзогенной экспрессии специфичной малой интерферирующей РНК функцией *NOTCH1*. Методом ПЦР-анализа в них была верифицирована экспрессия генов плюрипотентности, индукторов

эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и онкогена *C-MYC*. Доля CD133⁺ клеток была оценена методом проточной цитофлуориметрии. Влияние подавления *NOTCH1* на свойства ОСК изучалось с использованием классических методов детекции ОСК в гетерогенных культурах опухолевых клеток: способность к колониеобразованию в полужидкой среде, активность ABC-транспортеров, обеспечивающая множественную лекарственную устойчивость ОСК, а также определение минимальной прививочной дозы при подкожном введении бестимусным иммунодефицитным мышам (туморогенность *in vivo*).

Результаты. Подавление экспрессии *NOTCH1* приводило к снижению экспрессии генов плюрипотентности (*SOX2*, *POU5F1*, *NES*), индукторов ЭМП (*TWIST1*, *HES1*, *SNAIL1*), маркера ОСК (CD133), *C-MYC*, повышению экспрессии *CDH1* и его продукта E-кадгерина, что свидетельствует о вовлеченности Notch1 в индукцию ЭМП. Потеря Notch1 приводила к снижению скорости пролиферации *in vitro* и миграционного потенциала клеток, а также к элиминации черт, характерных для фенотипа ОСК, — к снижению способности к формированию колоний в неприкрепленных условиях, увеличению минимальной прививочной дозы *in vivo* и снижению активности ABC-транспортеров (в сублинии A549). Отсутствие изменения активности ABC-транспортеров в сублинии HCT116 может быть связано с тем, что в данных клетках она регулируется сигнальным путем TAZ/YAP. Анализ васкуляризации ксенографтов показал, что экспрессия Notch1 необходима для ангиогенеза, но не для закладки новых сосудов в процессе опухолевой прогрессии.

Выводы. Сигнальный путь Notch необходим для поддержания популяции ОСК в некоторых типах солидных опухолей, а его компонент Notch1 может служить потенциальной мишенью для таргетной терапии рака легкого и толстой кишки человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 14-15-00467).

Усиление действия селективного ингибитора BRAF-V600E на фоне подавления экспрессии гена *PTPN11* в клеточной модели рака щитовидной железы

Л.В. Путляева, А.М. Шварц

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

Мутация V600E гена *BRAF* обнаруживается в различных типах злокачественных опухолей, в особенности при меланоме и опухолях щитовидной железы, и ассоциируется с плохим ответом на традиционную ХТ и плохим клиническим прогнозом для пациентов. Возникновение

мутации V600E приводит к многократному усилению киназной активности BRAF и, как следствие, к конститутивной активации компонентов сигнального каскада RAS/RAF/MAPK/ERK. Обычно при терапии BRAF-V600E-содержащих опухолей используют селективные ингибиторы данного мутантного белка, что сопряжено с проблемой возникновения резистентности для некоторых типов рака. Такая резистентность может быть связана с активностью протеинтирозинфосфатазы SHP-2, кодируемой геном *PTPN11*. Фосфатаза SHP-2 является ключевым медиатором PD-1- и VTLA-сигнальных путей, а также регулятором выживания и пролиферации клеток. Механизм участия SHP-2 в активации сигнального каскада RAS/RAF/MAPK/ERK не до конца выяснен, однако было показано, что ингибирование SHP-2 может предотвращать реактивацию каскада RAS/RAF/MEK/ERK, опосредованную активацией EGFR в клеточных моделях рака прямой кишки и мышшиной модели легочной аденокарциномы. Также экспрессия SHP-2 повышена у пациентов с опухолями щитовидной железы, что коррелирует с низкой степенью дифференцировки раковых клеток, увеличением количества метастазов в лимфатических узлах и высоким уровнем злокачественности.

В данной работе проведено сравнение совместного действия селективного ингибитора BRAF-V600E вемурафениба (PLX4032) и нокдауна гена *PTPN11* с помощью малых интерферирующих РНК для оценки перспективности комплексной блокады сигнальных путей факторов роста при опухоли щитовидной железы. На модели клеток Nthy-ori-3.1, трансдуцированных лентивирусом, содержащим ген *BRAF* с мутацией V600E, мы показали, что при подавлении BRAF-V600E вемурафенибом происходит увеличение экспрессии гена *PTPN11* в 2, 3 и 5 раз на 2, 3 и 4-й дни после активации соответственно. При совместном использовании вемурафениба и малых интерферирующих РНК против *PTPN11* отмечается снижение экспрессии *PTPN11* примерно на 95 %, а также изменение морфологии клеток с вытянутой и веретенообразной на многоугольную. Таким образом, можно предположить, что совместное подавление *PTPN11* и BRAF-V600E может иметь значение при терапии BRAF-V600E-содержащих опухолей щитовидной железы вследствие подавления пути реактивации каскада RAS/RAF/MAPK/ERK через тирозинфосфатазу SHP-2.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-315-00171 мол_а).

Влияние ингибиторов MAPK1/2 на чувствительность клеток лейкоза к анти-KIT-препаратам

П.В. Спирин, Э.Р. Вагапова, Т.Д. Лебедев, П.М. Рубцов, В.С. Прасолов

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

В настоящее время в мире активно ведутся исследования механизмов, отвечающих за чувствительность злокачественных клеток к химиотерапевтическим препаратам. Известно, что использование таких препаратов для лечения злокачественных новообразований различной природы нередко приводит к развитию резистентности или к рецидивам заболевания. Считают, что это может быть связано с активацией широкого спектра компенсаторных механизмов, реализуемых в злокачественных клетках в ответ на состояние стресса, вызванного применением химиотерапевтических препаратов. Нами исследован вклад ERK2-киназы в развитие резистентности злокачественных клеток острого миелоидного лейкоза к ингибиторам рецепторной тирозинкиназы KIT (иматиниб, акситиниб). Показано, что ингибирование ERK2 с помощью низкомолекулярных ингибиторов значительно увеличивает чувствительность клеток острого миелоидного лейкоза к иматинибу и акситинибу. Также показано, что подавление экспрессии KIT увеличивает чувствительность клеток острого миелоидного лейкоза к ингибиторам ERK2. Полученные результаты демонстрируют, что использование низкомолекулярных ингибиторов ERK2 может быть перспективно для использования в комбинационной терапии злокачественных заболеваний для снижения риска возникновения химиорезистентности.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 17-04-01 555, № 17-29-06 049).

Результаты по исследованию жизнеспособности клеток выполнены при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-14-01 089-П).

Экспрессия компонентов АКТ/М-TOR-сигнального пути, AR, ER в ткани папиллярного рака щитовидной железы с мутацией BRAF-V600E

Л.В. Спирина^{1,2}, С.Ю. Чижевская¹, И.В. Кондакова¹

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;
²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Задачи исследования. Изучить экспрессию компонентов АКТ/м-TOR-сигнального пути, AR и ER

в папиллярном раке щитовидной железы в зависимости от наличия мутации BRAF-V600E.

Материалы и методы. В работу включено 40 пациентов с папиллярным раком щитовидной железы и 22 пациента с фолликулярной аденомой. Экспрессию АКТ, *c-Raf*, *GSK-3*, *PDK1* и *m-TOR*, *70-S64*, *E-BP1*, *AR*, *ERα* и *ERβ* определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Мутацию BRAF-V600E определяли в аллель-специфической ПЦР в реальном времени.

Результаты. При изучении экспрессии компонентов АКТ/м-TOR-сигнального пути (*AKT*, *c-Raf*, *GSK-3β*, *PDK1* и *PTEN*) в ткани доброкачественных новообразований и в опухолевой ткани щитовидной железы отмечено увеличение уровня матричной РНК протеинкиназы *AKT* в 8,6 раза ($p = 0,041$) на фоне компенсаторного роста уровня матричной РНК *PTEN* в 8,1 раза ($p = 0,037$). При этом выявлено снижение экспрессии гена *c-Raf* в 2,1 раза ($p = 0,048$) в ткани папиллярного рака щитовидной железы по сравнению с доброкачественной патологией.

Мутация BRAF-V600E выявлена у 21 % больных. Отмечено снижение экспрессии генов *AKT* и *GSK-3β* у пациентов с мутацией в 42,3 и 19,55 раза соответственно по сравнению с больными без нее. При этом экспрессия гена *c-Raf* повышалась в 15,1 раза при наличии мутации. Также было обнаружено снижение экспрессии *AR* и *ERα* у пациентов с мутацией BRAF-V600E в 66,7 и 6,7 раза соответственно по сравнению с больными с нормальным белком BRAF.

Выводы. В ткани папиллярного рака щитовидной железы происходит изменение экспрессии *AKT*, *PTEN*, *c-Raf*. Мутантный белок BRAF способствует снижению экспрессии *AKT* и *GSK-3β*. При этом экспрессия *c-Raf* повышена, что является следствием гиперактивации MAPK-MEK-ERK-сигнальных путей за счет гетеродимеризации BRAF.

Роль транскрипционных факторов GLI в поддержании стволового статуса клеток злокачественных глиом

Т.А. Штам^{1,2}, А.В. Волницкий¹, В.С. Бурдаков¹, Р.А. Ковалев¹, А.Ю. Конев¹, М.В. Филатов¹

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Ленинградская обл.;

²ФГБУ «НИИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Злокачественная трансформация клеток связана с потерей ими дифференцированного статуса. Возможной причиной этого процесса является вовлечение механизмов, обуславливающих стволовое состояние клеток. Транскрипционные факторы GLI1,

GLI2 и GLI3 необходимы для эмбрионального развития позвоночных, в частности для формирования нервной системы (N. Dahmane и соавт., 2001). В представленной работе мы изучали активность этих транскрипционных факторов в злокачественных глиомах и их роль в поддержании стволоподобного статуса и выживаемости опухолевых клеток. В исследовании были использованы линии A-172 и T98G, 18 первичных культур клеток злокачественных глиом и образец нормальной ткани взрослого головного мозга.

В отличие от нормальной ткани головного мозга, в глиомах обнаружена экспрессия генов-мишеней GLI, включая *GLI1*, *FOXM1* и *BM11*. Инкубация с GANT61, специфически ингибирующим транскрипционную активность GLI, а также нокдаун GLI с помощью интерференции РНК вызывали гибель опухолевых клеток. Возможной причиной такого ответа на подавление экспрессии GLI является наблюдаемое снижение экспрессии генов *GLI1*, *FOXM1*, *BM11*, *SOX2* и *OCT4*, поддерживающих стволовой статус клеток, и гена *TET1*, участвующего в деметилировании ДНК и перепрограммировании клеток.

Транскрипционный репрессор GLI3R, появившийся в результате сайт-специфического протеолиза

белка GLI3, конкурентно ингибирует транскрипционную активность GLI1, GLI2 и своей полноразмерной формы GLI3FL (X. Wen и соавт., 2010). Интересно, что в некоторых линиях наряду с экспрессией генов-мишеней GLI было обнаружено высокое содержание GLI3R. Соотношение GLI3FL и GLI3R в этих линиях было таким же, как в нормальной ткани головного мозга, где экспрессии генов-мишеней не было. Однако нокдаун GLI3 приводил к снижению экспрессии генов-мишеней, указывая на то, что в клетках глиом GLI3 действует больше как активатор, нежели репрессор транскрипции. Мы предполагаем, что GLI3R не предотвращает транскрипцию генов-мишеней, а лишь замедляет ее.

Таким образом, транскрипционные факторы GLI проявляют аномальную активность в клетках злокачественных глиом, внося значительный вклад в выживаемость и поддержание стволоподобного статуса опухолевых клеток, и вместе с регулируемым ими белками могут рассматриваться как потенциальные мишени адресной терапии глиом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-015-00289).

Тезисы

Действие разобщителя дыхания и фосфорилирования в митохондриях 2,4-динитрофенола на рост перевиваемой аденокарциномы молочной железы мышей Ca-755 в опытах *in vivo*

Е.Е. Антошина, Т.Г. Горькова, В.А. Кобляков,
Л.С. Труханова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Одним из основных метаболических факторов, характеризующих функционирование опухолевых клеток, является их обеспечение энергией посредством гликолиза. Митохондриальное дыхание в большинстве опухолевых клеток ингибировано благодаря эффекту Варбурга. В то же время известны ингибиторы митохондриальных функций, обладающие противоопухолевыми свойствами. К таким соединениям относятся ингибиторы I комплекса дыхательной цепи митохондрий – метформин и ротенон. Помимо ингибиторов дыхательной цепи митохондрий в последнее время привлекают внимание в качестве потенциальных противоопухолевых соединений вещества из группы так называемых разобщителей дыхания и фосфорилирования. Эти вещества являются слабыми липофильными кислотами, транспортирующими протоны через мембрану. В митохондриях они функционируют как АТФазы, вызывая «обезэнергичивание» клеток и, как следствие, активацию АМРК (АМФ-протеинкиназа) и ингибирование мТОР. Исследования *in vitro* ряда разобщителей дыхания и фосфорилирования, таких как 2,4-динитрофенол, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone и куркумин, демонстрируют, что эти соединения вызывают гибель опухолевых клеток в культуре благодаря усилению апоптоза и активации АМРК. В немногочисленных экспериментах *in vivo* показано, что исследованные разобщители дыхания и фосфорилирования, такие как неморозон, обладают противоопухолевыми свойствами. В данной работе мы изучали действие классического разобщителя дыхания и фосфорилирования 2,4-динитрофенола на рост перевиваемой аденокарциномы молочной железы мышей Ca-755. Мыши получали препарат неограниченно с питьевой водой, концентрации растворов составляли 200 и 800 мг/л. Торможение роста опухоли отмечалось на ранних сроках эксперимента при концентрации вещества 200 мг/л. При концентрации вещества 800 мг/л на ранних сроках противоопухолевый

эффект был менее ярко выражен, а на поздних сроках наблюдалась тенденция к стимуляции роста опухоли.

Таким образом, для ответа на вопрос о противоопухолевом потенциале данного класса соединений требуется постановка дополнительных экспериментов с использованием более широкого круга разобщителей дыхания и фосфорилирования.

Активация сигнальных путей Wnt, Hedgehog и Notch в иммуногистохимических подтипах рака молочной железы с высоким и низким содержанием опухолевых стволовых клеток

А.А. Бриллиант¹, Ю.М. Бриллиант¹, С.В. Сазонов^{1,2}

¹ГАОУ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
Екатеринбург;

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург

Введение. Активация сигнальных путей Wnt, Notch и Hedgehog в опухолевых клетках приводит к увеличению агрессивности опухоли и ее резистентности к ХТ.

Задачи исследования. Изучение сигнальных путей Wnt, Notch и Hedgehog в опухолях с высоким и низким содержанием опухолевых стволовых клеток.

Материалы и методы. В работе использовался материал 219 случаев инвазивного долькового РМЖ. Исследование проводили при помощи ИГХ-метода. Для определения стволовых клеток в опухолевой популяции исследовали наличие белка ALDH1A1 в клетках опухоли. Также определялась экспрессия молекул Wnt, Notch, Hedgehog. Во всех случаях также были исследованы рецепторы эстрогенов, прогестерона, HER2/neu-рецепторы, а также экспрессия белка Ki-67.

Результаты. В случаях с высоким содержанием стволовых опухолевых клеток активация сигнальных путей Wnt и Notch с равной вероятностью (11 %) выявлена в случаях трижды негативного подтипа, а также в случаях гормон-рецептор-отрицательного HER-положительного подтипа (Wnt – 25 %, Notch – 36 %). В случаях гормон-рецептор-положительного HER-положительного подтипа обнаружена активация только сигнального пути Notch. Не выявлено случаев активации сигнального пути Hedgehog. В случаях РМЖ с низким содержанием опухолевых стволовых клеток в клетках опухоли трижды негативного подтипа

активируются сигнальные пути Wnt, Notch и Hedgehog (33, 25 и 14 % соответственно). В группе опухолей гормон-рецептор-отрицательного HER-положительного подтипа отмечена активация сигнального пути Hedgehog (7 %). В клетках опухолей гормон-рецептор-положительного HER-положительного подтипа активируются сигнальные пути Wnt, Notch и Hedgehog (43, 50 и 19 % исследуемых случаев соответственно). Для опухолей люминального А и В подтипов не получено статистически достоверных данных.

Выводы. Активация сигнальных путей Wnt, Notch и Hedgehog происходит в разных ИГХ-подтипах ALDH1A1-отрицательного РМЖ. При этом сигнальный путь Hedgehog характерен только для опухолевых клеток гормон-рецептор-отрицательного HER-положительного подтипа. В случае ALDH1A1-положительного РМЖ сигнальный путь Notch активируется в опухолевых клетках разных подтипов, сигнальный путь Wnt характерен для опухолевых клеток трижды негативно-го и гормон-рецептор-отрицательного HER-положительного ИГХ-подтипов, в то время как активация сигнального пути Hedgehog не выявлена ни в одном случае.

Убиквитинлигаза PIRH2 участвует в формировании устойчивости раковых клеток к химиотерапии

В.А. Мамонтова¹, А.В. Петухов^{1,2}, О.А. Федорова¹,
О.Ю. Шувалов¹, Н.А. Барлев¹, А.А. Дакс¹

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

²ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России,
Санкт-Петербург

Убиквитинлигаза Pirh2 — фермент, направляющий на протеасомную деградацию главный онкосупрессорный белок клетки — p53. При этом транскрипционный фактор p53 является активатором экспрессии гена *RCHY1*, кодирующего Pirh2, и так формируется регуляторная петля отрицательной обратной связи. Таким образом, подавляя активность p53, белок Pirh2 является потенциальным онкогеном. Однако на сегодняшний день известно, что более 50 % опухолей характеризуются либо отсутствием p53, либо наличием мутаций в данном белке, и роль белка Pirh2 в таких клетках остается неизученной.

Мы исследовали онкогенные характеристики клеток немелкоклеточной карциномы легкого H1299, в которых отсутствует p53, с различным статусом Pirh2. В результате данной работы было показано, что Pirh2 вызывает повышение пролиферации и, соответственно, увеличение числа клеток в S-фазе клеточного цикла, а также способствует повышению миграционной активности раковых клеток. Кроме того, мы продемонстрировали влияние Pirh2 на чувствительность клеток к химиотерапевтическим

препаратам различного механизма действия — доксорубину и цисплатину. Согласно нашим данным, чувствительность клеток H1299 к цисплатину практически не зависит от статуса Pirh2, в то время как повышенная экспрессия Pirh2 способствует развитию устойчивости исследуемой клеточной модели к доксорубину. Действительно, уровень апоптоза в клетках с повышенной экспрессией Pirh2, обработанных нефлуоресцирующим ингибитором топоизомеразы II этопозидом, был достоверно ниже по сравнению с контрольными клетками. Мы также исследовали изменения клеточного цикла и показали, что Pirh2 способствует увеличению числа клеток в G2/M-фазе при обработке низкими дозами этопозидом, что по крайней мере частично может объяснить механизм Pirh2-опосредованной устойчивости клеток НМРЛ к ингибиторам топоизомеразы II.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-75-10076).

Роль сигнального пути AKT1-UB1-LRP в ретиноид-резистентности В-лимфобластоидных клеток

Н.Н. Калитин¹, Н.С. Кострица²

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

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

Введение. Резистентность к естественным ретиноидам, таким как полностью транс-ретиноевая кислота (АТРА), или синтетическим (фенретирид, тамибаротен и др.) является одним из важнейших факторов, ограничивающих их применение в клинической практике. Несмотря на то что эти препараты по некоторым данным продемонстрировали свою противоопухолевую эффективность посредством индукции дифференцировки клеток и их апоптоза в ряде солидных и несолидных опухолей, их использование в монотерапии и/или в дополнение к традиционным режимам лечения может приводить не только к развитию устойчивости к самим ретиноидам (ретиноид-резистентность), но и к формированию множественной лекарственной устойчивости. Между тем молекулярные механизмы, связанные с устойчивостью к ретиноидам, не до конца исследованы.

Задачи исследования. Исследовать влияние АТРА на В-лимфобластоидные клетки и определить возможные молекулярные мишени действия АТРА на эти клетки.

Материалы и методы. В работе использовались В-лимфобластоидные клетки линии IM-9. Клетки культивировались в среде RPMI-1640 с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой. В-лимфобластоидный статус клеток линии IM-9 был верифицирован с помощью проточной цитометрии. АТРА куплена в фирме Sigma

(США) и разведена в диметилсульфоксиде. Действие ATRA на клетки линии IM-9 оценивали посредством колориметрического МТТ-теста. Экспрессию белков при инкубировании с ATRA и в контроле (0,1 % диметилсульфоксид) определяли с помощью вестерн-блоттинга. Использовали антитела к Akt и pAkt-Ser473 (EMD Millipore, США), YB1 (Santa Cruz Biotechnology, США) и pYB1-Ser102 (Cell Signaling, Нидерланды), LRP (Santa Cruz Biotechnology, США). В качестве контроля загрузки использовали экспрессию b-актина. Интенсивность хемилюминесцентных сигналов на мембранах оценивали с использованием программы ImageJ. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью GraphPad Prism 5.02.

Результаты. Мы не обнаружили статистически значимого влияния ATRA на выживаемость клеток линии IM-9 в широком диапазоне концентраций (от 1 до 50 мкМ). При этом мы выявили, что ATRA способна индуцировать экспрессию белка LRP дозозависимым образом: добавление ATRA в малых дозах (1; 2,5 и 5 мкМ) приводило к увеличению его количества в клетках линии IM-9 ($p < 0,001$). Кроме того, мы обнаружили, что обработка клеток линии IM-9 препаратом ATRA приводила к активации одного из важнейших регуляторов экспрессии LRP — транскрипционного фактора YB1. Количество фосфорилированной формы белка YB1 было увеличено после обработки ATRA клеток IM-9 в течение 24 ч. Также мы показали, что добавление ATRA к клеткам линии IM-9 и связанное с ним увеличение экспрессии белка LRP и количества фосфорилированной формы белка YB1 наблюдались на фоне повышения количества фосфорилированной формы протеинкиназы Akt1.

Выводы. Мы предполагаем, что один из возможных механизмов ретиноид-резистентности, в частности к ATRA, может быть связан с активацией сигнального пути Akt1-YB1-LRP.

Биологические характеристики первичных сарком костей при планировании и проведении терапии

Д.Ш. Полатова, М.А. Гафур-Ахунов, М.С. Гильдиева,
Х.Г. Абдикуримов, У.Ф. Исломов, Б.Б. Султанов,
Р.Р. Давлетов

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр онкологии и радиологии Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан

Задачи исследования. Изучение прогностической ценности пролиферативной и апоптотической активности опухолей у больных остеосаркомой с целью определения онкогенов, вовлеченных в патогенез и прогноз.

Результаты. Под наблюдением находился 221 пациент с остеосаркомой. Анализ 1-, 3- и 5-летней кумулятивной выживаемости всех обследованных больных остеосаркомой показал, что однолетняя кумулятивная выживаемость наблюдалась в 95,1 % случаев, 3-летняя — в 51,8 %. До 5 лет дожили 87 (39,37 %) больных. Результаты анализа кумулятивной выживаемости, полученные по методу Каплана—Мейера, среди больных, сгруппированных в зависимости от уровня экспрессии исследуемых онкомаркеров (p53, BCL-2, Ki-67), показали, что экспрессия мутантного гена p53 ниже, чем в 10 % опухолевых клеток, Ki-67 — до 20 %, а BCL-2 — больше, чем в 20 % клеток, способствует увеличению доли выживших больных без рецидивов, а доля выживших больных без метастазов повышается только у тех, у кого отсутствует мутантный ген p53, низкая экспрессия Ki-67 (до 20 %) и положительная экспрессия BCL-2 (выше 10 %). Ранние рецидивы появились у 18 (35,3 %) больных в сроки до 9 мес, в сроки 10–12 мес — у 13 (25,5 %), в сроки 13–18 мес — у 20 (39,2 %). Безрецидивная 3- и 5-летняя выживаемость больных остеосаркомой после неоадьювантной полихимиотерапии, длительной внутриартериальной регионарной ХТ и адьювантной ХТ составила в среднем 65 % и зависела от уровня экспрессии изученных онкомаркеров. Так, экспрессия мутантного гена p53 в опухолевых клетках ниже 10 %, Ki-67 — до 20 %, а BCL-2 — более 20 % способствует увеличению доли выживших больных без рецидивов.

Выводы. Можно констатировать информативность ИГХ-маркеров апоптоза и пролиферации для оценки и прогноза эффективности терапии остеосаркомы.

Анализ экзосомальных белковых маркеров в различных фракциях экстраклеточных везикул, секретируемых клетками немелкоклеточного рака легкого

Г.О. Скрябин¹, А.В. Комельков¹, Е.Г. Евтушенко²,
Д.В. Багров², С.А. Галецкий¹, М.Е. Аксельрод¹,
Е.М. Чевкина¹

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

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

Экстраклеточные везикулы (ЭКВ) представляют собой гетерогенную популяцию наночастиц, секретируемых клетками для горизонтального обмена информацией. Основными классами ЭКВ являются экзосомы и микровезикулы (МВ), главное различие между которыми (помимо функциональных отличий) заключается в их биогенезе — формирование внутри эндосомальной сети или отпочкование от плазматической

мембраны соответственно. На сегодняшний день задача селективного выделения различных классов везикул остается нерешенной прежде всего за счет «перекрытия» ЭКВ по размерам, плотности и морфологии. В связи с этим поиск специфических маркеров, позволяющих разделять экзосомы и МВ, является актуальной задачей. Ряд белков, включая тетраспанины (CD9, CD81, CD63) и некоторые белки липидных рафтов (флотиллины), принято считать маркерами экзосом, однако их селективность вызывает большие вопросы. При этом направленного сравнения экзосомальных маркеров в 2 типах ЭКВ практически не проводилось, за исключением единичных работ, где показано присутствие некоторых тетраспанинов в обоих типах ЭКВ.

В данной работе мы сравнили присутствие маркеров экзосом (CD9, флотиллин-1 (Flot-1) и флотиллин-2 (Flot-2)) в различных фракциях ЭКВ, полученных из кондиционированной среды клеток НМРЛ (A549, H1299, H460), а также из плазмы крови пациентов с НМРЛ и здоровых доноров. В тех же образцах анализировали белок стоматин. ЭКВ выделяли методом дифференциального ультрацентрифугирования, разделяя фракции, соответствующие среднему размеру МВ (осаждение при 20 000 xg 1,5 ч) и экзосом (100 000 xg, 3 ч). Плазму крови предварительно разводили в натрий-фосфатном буфере 1:3, клетки культивировали в среде DMEM с фетальной сывороткой, предварительно очищенной от ЭКВ. Количество частиц и качество препаратов оценивали методом анализа траектории движения наночастиц (NTA) и с помощью просвечивающего электронного микроскопа. Анализ белков проводили методом иммуноблоттинга.

Результаты показали, что все исследуемые белки-маркеры экзосом представлены на высоком уровне в обеих фракциях ЭКВ как плазмы крови, так и кондиционированной среды, причем в сопоставимых количествах. Соотношение уровней Flot-1, Flot-1 и CD9 в экзосомах и МВ отличалось для разных линий клеток и варьировало в образцах плазмы крови. Присутствие стоматина в экзосомах и МВ ранее было показано лишь для ретикулоцитов и эритроцитов, а также при некоторых лейкозах. Нами впервые обнаружено, что этот белок представлен на высоком уровне в экзосомах и МВ всех исследуемых клеток НМРЛ, плазмы крови пациентов и здоровых доноров, причем уровень стоматина в препаратах экзосом был существенно выше, чем в образцах МВ. Таким образом, экзосомальные маркеры CD9, Flot-1 и Flot-2 не могут быть использованы для дифференциации экзосом и МВ. Стоматин является, по-видимому, универсальным компонентом ЭКВ и может быть рекомендован в качестве маркера, причем более селективного в отношении экзосом по сравнению с исследованными маркерами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 18-04-00038А).

Сравнительное изучение детерминант Wnt/ β -катенин-каскада в CD133⁺-опухолевых стволовых клетках и CD133⁻-дифференцированных клетках мультиформной глиобластомы для поиска потенциальных терапевтических мишеней

В. Е. Шевченко, Ю. Д. Василец, Н. Е. Арноцкая

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Мультиформная глиобластома (МГБ) является первичной злокачественной опухолью мозга с крайне неблагоприятным прогнозом, который связывают с существованием CD133⁺-стволовых клеток глиобластомы (СКГ), ответственных за резистентность к терапии и рецидив опухоли. СКГ способны к самообновлению, пролиферации, дифференцировке, образованию опухоли головного мозга при их трансплантации иммунодефицитным мышам. Изучение внутриклеточных сигнальных путей, которые регулируют стволовость и туморогенность СКГ, позволит разработать более эффективные подходы к лечению пациентов с МГБ.

Задачи исследования. Сравнительное изучение детерминант Wnt/ β -катенин-каскада в CD133⁺-СКГ и CD133⁻-дифференцированных клетках МГБ для поиска потенциальных терапевтических мишеней заболевания.

Материалы и методы. Использовали CD133⁺-СКГ и CD133⁻-дифференцированные клетки, полученные иммуносортингом по маркеру CD133⁺ из глиомасфер культуры клеточной линии глиобластомы человека U87MG. Сравнительное изучение клеточных протеомов проводили методом нано-высокоэффективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии.

Результаты. В клеточных лизатах в целом идентифицировано 1990 белков. Экспрессия 11 белков Wnt-каскада (CACYPB, CSNK2A2, CSNK2B, STBP1, STBP2, CTNBNB1, CTNNA1, CUL1, RAC2, RHOA, RUVBL1) увеличена более чем в 2 раза в протеоме CD133⁺-СКГ по сравнению с CD133⁻-дифференцированными клетками МГБ. Кроме того, обнаружена повышенная экспрессия 7 белков (CCAR2, PSMA1, PSMA3, PSMB5, PSMD1, PSMD10, PSMD13), которые положительно регулируют активность Wnt/ β -катенин-каскада.

Выводы. Активность Wnt/ β -катенин-каскада значительно повышена в CD133⁺-СКГ по сравнению с CD133⁻-дифференцированными клетками МГБ, что указывает на важную роль данного каскада в патогенезе МГБ. По нашему мнению, таргетирование

Wnt/ β -катенин-каскада в СКГ является чрезвычайно важным аспектом терапии МГБ.

Действие гипоксии на секретом клеточной линии U-251 мультиформной глиобластомы

В.Е. Шевченко, Т.И. Кушнир, И.А. Кудрявцев,
Н.Е. Арноцкая

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. Мультиформная глиобластома (МГБ) характеризуется целым рядом процессов, приводящих к прогрессированию заболевания: увеличенной инвазией, резистентностью к химио- и радиотерапии, иммуносупрессией, рецидивированием. Все эти изменения, включая еще и геномную нестабильность, потерю апоптотического потенциала, экспрессию онкогенов и аномальный ангиогенез, опосредованы действием гипоксии. Преимущество изучения секрета перед протеомом клеток заключается в том, что секретируемые белки могут входить в состав лиганд-рецепторных комплексов и представлять значительный интерес для поиска потенциальных терапевтических мишеней.

Задачи исследования. Изучить действие гипоксии на секретом клеточной линии U-251 МГБ для поиска потенциальных терапевтических мишеней.

Материалы и методы. Методом протеомной масс-спектрометрии высокого разрешения исследовали секретомы клеточной линии U-251 МГБ, культивируемые в условиях гипоксии и нормоксии.

Результаты. Идентифицированные протеины показали достаточно высокую частоту «перекрытия» для 2 клеточных популяций: 816 (61 %) белков детектировались во всех клеточных секретоммах, 317 (24 %) белков – только в клетках U-251 при нормоксии, и 209 (15 %) белков были уникальными для клеток U-251 после действия гипоксии. Среди 1342 идентифицированных белков статистически значимые изменения в экспрессии ($p < 0,05$) зарегистрировали для 390 белков; 343 протеина изменяли экспрессию более чем в 2 раза: 153 – увеличивали, а 190 – уменьшали. Повышение экспрессии более чем на 2 порядка наблюдали у 11 протеинов: S100A6, HEY1, ZIP3, BAG6, ATP11A, S100A4, BAZ2B, ZNF350, PSMA1, SORCS3, ZEB2.

Выводы. Гипоксия существенно влияет на секретом опухолевых клеток МГБ. Роль 7 дифференциально экспрессированных протеинов (S100A6, HEY1, ZIP3, BAG6, S100A4, ZEB2, TRPM1) ранее доказана в патогенезе МГБ, что указывает на возможность их использования в качестве потенциальных терапевтических мишеней или биомаркеров при лечении этого заболевания.

БИОЛОГИЯ И МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ (ПАМЯТИ ПРОФ. Ю.М. ВАСИЛЬЕВА)

Доклады

Реорганизация актинового цитоскелета и межклеточных адгезионных контактов на ранних стадиях эпителиально- мезенхимального перехода

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

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) играет важную роль в эмбриональном развитии и во взрослом организме при заживлении ран. ЭМП считается главным механизмом неопластической эволюции раковых клеток, запускающим инвазионно-метастатический каскад. На линии IAR-20 иммортализованных эпителиальных клеток печени крысы были изучены изменения структур актинового цитоскелета и межклеточных адгезионных контактов (АК) на ранних этапах ЭМП при воздействии эпидермального фактора роста (EGF).

Видеомикроскопическое исследование показало, что для клеток контрольной культуры был характерен ярко выраженный контактный паралич, однако уже через 5 мин после добавления EGF (40 нг/мл) в культуральную среду происходила утрата контактного паралича: на межклеточных границах появлялись псевдоподии, а через 15–20 мин появлялись разрывы в клеточном монослое. В клетках IAR-20, стабильно экспрессирующих маркер актина F-tractin-tdTomato, через 5–10 мин после добавления EGF на межклеточных границах наблюдались разрушение кольцевого актинового пучка, стабилизирующего структуру АК, и образование актиновой сети. Одновременно с индукцией псевдоподиальной активности в ответ на EGF мы также детектировали возникновение ретроградного тока на межклеточных границах, который может быть вовлечен в появление у эпителиальных клеток переднезадней поляризации и индукцию

направленной миграции. Вестерн-блот-анализ показал, что через 5–15 мин после начала инкубации с EGF резко повышалось фосфорилирование актин-связывающего белка EPLIN, ассоциированного с кольцевым актиновым пучком, что приводит к его протеасомной деградации. Можно предположить, что разрушение кольцевого актинового пучка, связанное с фосфорилированием EPLIN в присутствии EGF, и высвобождение мономерного актина стимулируют полимеризацию актиновой сети и образование псевдоподий на межклеточных границах. Деорганизация кольцевого актинового пучка также определяет реорганизацию АК, которая наблюдалась на самых ранних сроках после начала действия EGF. Как показала конфокальная микроскопия живых клеток IAR-20, стабильно экспрессирующих GFP-E-кадгерин, через 10 мин после добавления EGF в среду стабильные линейные АК, образованные E-кадгерином, замещались радиальными АК, которые были чрезвычайно динамичны и нестабильны. Таким образом, EGF-сигналинг может приводить к очень быстрым изменениям актиновых структур и АК эпителиальных клеток, инициирующим миграционную активность последних.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 16-15-10288) и РФФИ (гранты № 16-04-01016, № 18-54-16005).

Новые маркеры прогрессирования рака гортани и гортаноглотки

Г.В. Какурина¹, О.В. Черемисина¹, И.В. Кондакова¹,
Е.Л. Чойнзонов^{1,2}

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;
²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск

Введение. Несмотря на то что плоскоклеточный рак гортани и гортаноглотки (РГ) является «визуальной» локализацией, существуют объективные трудности в мониторинге опухоли и диагностике рецидивов (Е.Л. Чойнзонов и соавт., 2016). Поэтому актуален

поиск факторов прогноза РГ для формирования групп риска прогрессирующего заболевания.

Задачи исследования. Анализ содержания протеин-фосфатазы 1В (PPM1B), кофилина-1 (CFL1), аденилциклазы ассоциированного протеина 1 (CAP1), альфа-2-макроглобулина (A2MG) и активности циркулирующих протеасом (ц-протеасом) в сыворотке крови больных РГ в зависимости от наличия регионарных метастазов.

Материалы и методы. В исследование вошли первичные больные РГ (со стадиями T1–4N0M0 – 26 пациентов, со стадиями T1–4N1–3M0 – 51 пациент). Проведен анализ сыворотки крови с помощью ИФА-наборов Human PPM1B, A2MG, CFL1 и CAP1 ELISA Kit (Cloud-Clone Corp., США) на микропланшетном ИФА-ридере Anthos Reader 2020. Измеряли активность ц-протеасом (ХТПА и КПА) согласно методике W. Ma и соавт. (2008). Статистический анализ результатов проводили с использованием программного пакета Statistica 6.0.

Результаты. Выявлено, что содержание CAP1 в 2 раза ($p \leq 0,01$) выше, а содержание A2MG в 1,5 раза ($p \leq 0,05$) ниже у больных РГ с метастазами в лимфатические узлы шеи по сравнению с больными РГ без метастазов. Выявлена связь в общей группе больных РГ между содержанием в сыворотке крови CAP1 и CFL1 ($r = 0,75$): в группе больных РГ T1–4N1–3M0 – между содержанием CAP1 и PPM1B ($r = 0,8$), а в группе больных РГ T1–4N0M0 – между содержанием A2MG и КПА ц-протеасом ($r = 0,9$). После проведения комбинированной терапии у 42 % больных РГ в течение года отмечено прогрессирующее заболевание. У этих больных до лечения содержание CFL1 было в 1,7 раза выше, чем у больных РГ без прогрессирующего заболевания. Отмечена положительная связь между содержанием CAP1 и КПА ц-протеасом ($r = 0,7$), а в группе больных без прогрессирующего – между содержанием CAP1 и ХТПА ц-протеасом ($r = 0,5$), и ХТПА и КПА ц-протеасом ($r = 0,5$).

Выводы. Полученные результаты указывают на участие исследуемых белков в патогенезе РГ и перспективность определения содержания CAP1, CFL1 и PPM1B, и оценки ХТПА ц-протеасом сыворотки крови для формирования групп риска рецидивирования и метастазирования на этапах лечения и мониторинга больных.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-04-00198А).

Взаимосвязь экспрессии мРНК актин-связывающих белков с метастазированием немелкоклеточного рака легкого

Е. С. Колегова¹, И. В. Кондакова¹, А. Ю. Добродеев¹,
Д. Н. Костромицкий²

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;
²ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер»,
Томск

Введение. Прогрессирование злокачественных опухолей характеризуется изменениями в составе, функциях и структуре белков различных классов, в том числе актин-связывающих белков (АСБ), осуществляющих тредмиллинг актиновых филаментов. Однако вовлеченность АСБ в прогрессирование НМРЛ мало изучена.

Задачи исследования. Изучение экспрессии матричной РНК белков, участвующих в ремоделировании актинового цитоскелета – аденилатциклазы ассоциированного протеина 1 (CAP1), кофилина (KFL), профилина (PFL) и эзрина (EZR) – в тканях больных НМРЛ в связи с лимфогенным и гематогенным метастазированием.

Материалы и методы. Материалом для исследования явилась опухолевая и неизменная ткань больных НМРЛ ($n = 35$). Анализ экспрессии матричной РНК АСБ выполняли методом ПЦР в реальном времени. Нормализацию экспрессии проводили на условно неизменную ткань и референсный ген «домашнего хозяйства» фермента GAPDH. Уровень АСБ оценивали с помощью метода вестерн-блоттинга с применением первичных антител мыши в разведении 1:1500 и вторичных антимышиных антител в разведении 1:2000 (Cell Signaling Technology, США). Статистическую обработку результатов проводили с применением пакета программ IBM SPSS Statistics 20.0.

Результаты. Показано, что при лимфогенном метастазировании (стадии T2–3N1M0 и T2–3N2M0) уровень матричной РНК CAP1 стабильно повышается в ткани первичной опухоли больных НМРЛ. Экспрессия же матричной РНК кофилина, профилина и эзрина изменялась нелинейно: сначала возрастала на начальных этапах метастазирования (стадии T2–3N1M0), а затем значительно снижалась при стадиях T2–3N2M0. Корреляционный анализ показал коэкспрессию генов АСБ ($r_{CAP1-KFL} = 0,750$, $r_{KFL-PFL} = 0,672$, $r_{KFL-EZR} = 0,555$, $r_{PFL-EZR} = 0,650$, $p < 0,05$). Полученные закономерности в изменении экспрессии матричной РНК АСБ были подтверждены изучением содержания этих белков методом вестерн-блоттинга. Проведена оценка 2-летней безметастатической выживаемости пациентов. Из 30 обследованных у 6 развились гематогенные метастазы в течение 2 лет после операции. Среди изучаемых белков была показана значимая связь уровня матричной РНК CAP1 в опухолевой ткани с 2-летней безметастатической выживаемостью. Методом χ^2 показано,

что увеличение экспрессии матричной РНК белка *CAP1* в ткани опухоли в 3 раза по сравнению с неизмененной тканью увеличивает риск возникновения метастазов в 3,5 раза ($\chi^2 = 3,840$, $p = 0,050$).

Выводы. Показана зависимость экспрессии матричной РНК изучаемых АСБ от наличия метастазов у больных НМРЛ. Полученные данные свидетельствуют о вовлеченности *CAP1*, кофилина, профилина и эзрина в процессы опухолевой прогрессии при НМРЛ. Уровень матричной РНК *CAP1* в опухоли влияет на безметастатическую выживаемость пациентов и может быть предложен как дополнительный тканевой маркер течения НМРЛ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-415-703 003p_мол_a).

Шаперон HSP70 в пространстве между погибающими и растущими опухолевыми клетками

Б.А. Маргулис

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Удаление злокачественной ткани путем радиотерапии или ХТ часто влечет за собой рецидив опухолевого роста, причем вновь образующиеся раковые клетки более устойчивы к терапии, поэтому проблема рецидивов опухолевого роста является одной из наиболее актуальных в современной онкологии. По современным представлениям погибающие от воздействия терапевтических средств раковые клетки передают окружающим клеткам некую информацию, которая стимулирует их рост подобно тому, как происходит регенерация нормальной ткани. В процессе передачи информации участвуют несколько белков и микроРНК, которые присутствуют в межклеточном пространстве в свободном, циркулирующем виде и в форме везикулярных структур. Среди белков, ответственных за передачу информации от погибающих клеток к живым, значительную роль может играть шаперон Hsp70, который, с одной стороны, участвует в проопухоловой функции экзосом, а с другой — генерирует противоопухольевый иммунный ответ. Из результатов нашего исследования и данных группы С. Garrido следует, что Hsp70 действительно находится в составе экзосом, повышающих агрессивность принимающих их клеток, т. е. внеклеточный шаперон усиливает туморогенность клеток. В то же время экзогенный Hsp70 создает все условия для экспозиции опухоли клеткам врожденного и адаптивного иммунитета. Основное внимание в докладе будет уделено тем структурам и белкам, взаимодействуя с которыми вне клетки, Hsp70 осуществляет свою функцию по передаче проопухолового фенотипа клеткам микроокружения и регулирует взаимоотношения между

умирающими раковыми клетками и возрождающейся популяцией.

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

Протеазы экзосом у больных раком молочной железы

С.Н. Тамкович^{1,2}, А.В. Сомов¹, Н.В. Юнусова^{3,4},
Е.А. Тугутова³, К.В. Проскура^{1,5}, Т.А. Штам⁶, М.Н.
Стахеева³, И.В. Кондакова³, П.П. Лактионов^{1,7}

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

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск;

³НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;

⁴ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск;

⁵ГБУЗ НО «Новосибирский областной клинический онкологический диспансер», Новосибирск;

⁶ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

⁷ФГБУ «НМИЦ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск

Введение. Для повышения эффективности ранней диагностики онкологических заболеваний и выявления новых терапевтических стратегий актуальной задачей является изучение механизмов метастазирования опухолей. Секретируемые раковыми клетками экзосомы влияют на развитие как первичной опухоли, так и отдаленных метастазов путем горизонтального переноса РНК и белков.

Задачи исследования. Оценка уровня тетраспанин-ассоциированных (ADAM-10) и тетраспанин-неассоциированных (20S-протеасом) протеаз в экзосомах в крови при развитии РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены препараты экзосом из культуральной среды MCF-7 и HUVEC, плазмы крови здоровых женщин ($n = 30$), больных мастопатией ($n = 28$) и больных РМЖ ($n = 32$); везикулы были выделены и охарактеризованы в соответствии с рекомендациями Extracellular Vesicle Society. Уровни экспрессии 20S-протеасом и ADAM-10 в экзосомах определяли методами вестерн-блот-анализа и проточной цитофлуориметрии соответственно.

Результаты. Показано, что уровень экспрессии ADAM-10 в субпопуляции CD9-положительных экзосом и уровень экспрессии 20S-протеасом достоверно повышены в экзосомах из культуральной среды MCF-7 и плазмы крови онкологических больных по сравнению с контрольными образцами.

Выводы. Полученные данные косвенно подтверждают роль экзосомальных протеаз в прогрессировании опухоли.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-415-540012.

Раково-тестикулярные антигены семеногелины 1 и 2: потенциальные биологические функции в опухолевых клетках

О.Ю. Шувалов¹, А.И. Кизенко¹, А.В. Петухов^{1,2},
О.А. Федорова¹, А.А. Дакс¹, Н.А. Барлев¹

¹ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;
²ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России,
Санкт-Петербург

Семеногелины 1 и 2 являются основными белковыми компонентами семенной жидкости человека и экспрессируются главным образом железистым эпителием семенных пузырьков, эпидидимиса и рядом других тканей, принимающих участие в обеспечении репродуктивной функции организма. Семеногелины регулируют подвижность и созревание сперматозоидов, а также защищают их от бактерий. Вместе с тем семеногелины являются раково-тестикулярными антигенами, так как они часто детектируются в злокачественных новообразованиях различного генеза. При этом их функции в неопластических клетках в настоящее время неизвестны.

В рамках данного исследования мы провели биоинформатический анализ выживаемости онкобольных с различными неоплазиями в зависимости от уровня экспрессии семеногелинов. С использованием иммуноблоттинга мы также показали, что семеногелины 1 и 2 часто экспрессируются в различных клеточных моделях неоплазий человека.

С целью прояснения потенциальных молекулярных механизмов вовлеченности семеногелинов 1 и 2 в биологические процессы мы провели GST pull-down анализ и идентифицировали 60 белков, взаимодействующих с семеногелинами 1 и 2. Значительная доля этих белков оказалась представлена метаболическими ферментами. Мы показали, что экспрессия семеногелинов 1 и 2 в клеточных моделях аденокарцином легкого, поджелудочной железы, молочной железы человека приводила к повышению как энергетического статуса клеток, так и уровня эндогенного окислительного стресса. Кроме того, мы обнаружили, что экспрессия семеногелинов в данных клеточных моделях вызывала снижение миграционного потенциала клеток и делала их более чувствительными к генотоксическим препаратам.

Таким образом, мы показали, что раково-тестикулярные антигены семеногелины 1 и 2 в опухолевых клетках могут быть вовлечены в различные биологические процессы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-75-10205).

The role of alcohol-induced Golgi fragmentation for androgen receptor signaling in prostate cancer

S. Manca¹, C.P. Frisbie¹, Ch.A. LaGrange², C.A. Casey³,
J.-J.M. Riethoven^{4,5}, A. Petrosyan^{1,5,6}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology,
College of Medicine, Lincoln, USA;

²Division of Urologic Surgery, Department of Surgery, Lincoln,
USA;

³Department of Internal Medicine, University of Nebraska Medical
Center, Lincoln, USA;

⁴Center for Biotechnology, University of Nebraska – Lincoln,
Lincoln, USA;

⁵The Nebraska Center for Integrated Biomolecular
Communication, Lincoln, USA;

⁶The Fred and Pamela Buffett Cancer Center, Omaha, USA

Chronic alcohol abuse and alcoholism are considered risk factors for prostate cancer (PCa) progression; however, the underlying mechanisms are unknown. We have recently found that Golgi fragmentation correlates with the progression of PCa; ethanol induces Golgi disorganization that is caused by the impaired dimerization of the largest Golgi matrix protein giantin; this, in turn, impacts on the Golgi docking for the resident Golgi proteins. It is known that the structural maturation of AR and its intranuclear translocation are regulated by the heat shock protein 90 (HSP90). HSP90 is activated via deacetylation by the phosphorylated form of histone deacetylase 6 (HDAC6). Here, it is determined that in normal prostate cells, HDAC6 localizes in the cytoplasm and nucleus, while its kinase, glycogen synthase kinase β (GSK3 β), primarily resides in the Golgi. Progression of PCa is accompanied by Golgi scattering, translocation of GSK3 β from the Golgi to the cytoplasm, and the cytoplasmic shift in HDAC6 localization. Alcohol dehydrogenase generated metabolites induces Golgi disorganization in androgen-responsive LNCaP and 22Rv1 cells, facilitates tumor growth in a mouse xenograft model and activates anchorage-independent proliferation, migration, and cell adhesion. Ethanol-treated cells demonstrate reduced giantin and subsequent cytoplasmic GSK3 β ; this phenomenon was validated in giantin-depleted cells. Redistribution of GSK3 β to the cytoplasm results in phosphorylation of HDAC6 and its retention in the cytoplasm, which, in turn, stimulates deacetylation of HSP90, AR import into the nucleus, and secretion of prostate-specific antigen.

Finally, the relationship between Golgi morphology, HDAC6 cytoplasmic content, and clinicopathologic features was assessed in human PCa patient specimens with and without a history of alcohol dependence. Thus, this study demonstrates the importance of alcohol-induced Golgi fragmentation in the activation of AR-mediated proliferation.

Постеры

Рецептор ароматических углеводов как дополнительный прогностический маркер аденокарциномы толстой кишки человека

М.А. Быстрыкова¹, С.А. Кошкин¹, А.В. Гаврилюков²,
Е.Н. Толкунова¹

¹ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;
²ГБУЗ «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)», Санкт-Петербург

Введение. Одной из главных задач онкологии является поиск дополнительных молекулярных маркеров, более точно характеризующих степень злокачественности опухоли. Их идентификация позволит индивидуализировать лечение и разработать новые терапевтические подходы. Анализ фенотипических маркеров и условий функционирования стволовых клеток злокачественных опухолей может быть перспективным подходом в поиске дополнительных прогностических маркеров.

Задачи исследования. Анализ взаимосвязи между уровнями экспрессии выбранных потенциальных прогностических маркеров и клиническими данными пациентов.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 11 пациентов, перенесших плановую резекцию аденокарциномы толстой кишки. Проводился анализ клинических данных (пол, возраст, наличие сопутствующих заболеваний, стадия pTNM, а также 2-летняя выживаемость). В качестве потенциальных дополнительных прогностических маркеров были выбраны следующие молекулы: формы транскрипционного фактора OCT4 (OCT4A, OCT4B, OCT4B1), факторы гипоксии (HIF-1 α), участники сигнального пути диоксинового рецептора (AhR, CYP1A1, CYP1B1), белки семейства IGF (IGFBP3). Данные были получены с помощью метода количественной ПЦР при исследовании образцов опухолей и нормальной слизистой кишки.

Результаты. Взаимосвязь между уровнями экспрессии HIF-1 α , IGFBP3, изоформ OCT4 и клинико-морфологической стадией заболевания (pTNM) не выявлена, но обнаружена корреляция между экспрессией IGFBP3 и AhR. Был проведен нокаут гена IGFBP3 в клетках первичной клеточной культуры аденокарциномы толстой кишки человека БСК8, проанализирована активность сигнального пути AhR. При нокауте гена IGFBP3 клоны линии БСК8 демонстрировали

увеличение времени удвоения и повышение резистентности к антагонисту пиримидинов (5-фторурацил) при активации AhR его агонистом (индол-3-карбинол).

Выводы. На основании полученных результатов мы предполагаем, что исследование уровня AhR перспективно в качестве дополнительного прогностического маркера аденокарциномы толстой кишки.

Особенности воспалительного инфильтрата в зависимости от морфологической гетерогенности плоскоклеточных карцином области головы и шеи

В.А. Бычков^{1,2}, Л.Н. Бондарь¹, Л.А. Таширева¹,
О.В. Черемисина¹, В.М. Перельмутер¹

¹ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;
²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

Введение. Многочисленные работы свидетельствуют, что внутриопухолевая гетерогенность обуславливает рост опухоли, образование метастазов, возникновение рецидивов и резистентности после терапии. Морфологическая вариабельность плоскоклеточных карцином области головы и шеи давно известна патологам, и на ее основе разработаны различные критерии прогноза течения болезни. Нами был предложен дополнительный способ оценки морфологической гетерогенности на основе выделения в карциноме 5 типов клеточных структур. Ранее проведенная оценка прогностической значимости наличия тех или иных структур показала, что наличие одиночно расположенных опухолевых клеток (структуры 5-го типа) и высокополиморфных клеток (структуры 4-го типа) тесно ассоциировано с лимфогенным метастазированием. Также показана связь лимфогенного метастазирования с низким уровнем воспалительной реакции. Естественным продолжением работы стала попытка подробнее изучить клеточный состав воспалительного инфильтрата у пациентов с учетом морфологической гетерогенности плоскоклеточных карцином.

Задачи исследования. Анализ ассоциации 5 типов клеточных структур плоскоклеточных карцином головы и шеи с выраженностью и клеточным составом воспалительного инфильтрата.

Материалы и методы. У 44 пациентов проводилась оценка морфологической гетерогенности опухоли, уровня воспаления и распространенности CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и макрофагов, опреде-

ленных с помощью ИГХ-окрашивания срезов тканей с применением первичных антител (Dako, США).

Результаты. У пациентов с метастатическим поражением лимфатических узлов наблюдается снижение уровня воспалительного инфильтрата и количества CD3⁺ Т-клеток по сравнению с пациентами с интактными лимфатическими узлами. У больных с наличием в опухоли одиночных опухолевых клеток (5-й тип структур) также наблюдается снижение выраженности воспаления. У пациентов с метастатическим поражением лимфатических узлов выявлено уменьшение количества CD3⁺ Т-лимфоцитов при наличии структур 5-го типа, а также повышенный уровень цитотоксических CD8⁺ Т-клеток при наличии структур 2-го типа и их сниженный уровень при наличии структур 3-го типа.

Выводы. Морфологическая гетерогенность опухоли может иметь связь с окружением иммунокомпетентных клеток.

Влияние цисплатина на индукцию аутофагии и протуморогенных молекулярных процессов в раковых клетках

Р.Т. Габбасов, А.М. Мазитова, Ю.А. Топчу,
Э.М. Биктагирова, З.И. Абрамова

Научно-исследовательская лаборатория «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний» ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Республика Татарстан

Введение. Цисплатин является одним из основных препаратов, использующихся в терапии злокачественных опухолей различного происхождения. Развитие устойчивости к химиотерапевтическим препаратам, в том числе к цисплатину, остается одной из важнейших проблем молекулярной онкологии. Аутофагия — механизм клеточного выживания, запускающийся в условиях стресса, в частности химиотерапевтического. Показано, что аутофагия в раковых клетках может индуцироваться цисплатином, а также влиять на проонкогенную сигнализацию.

Задачи исследования. Определение влияния цисплатина на индукцию аутофагии и проонкогенные молекулярные процессы в клетках эпителиального рака яичника (ЭРЯ) и НМРЛ.

Материалы и методы. Клеточные линии ЭРЯ (CaOV3 и OVCAR8) и НМРЛ (A549) инкубировали в стандартных условиях. Выживаемость и подвижность клеток исследовали при помощи МТТ-анализа и анализа миграции клеток в рану в монослое соответственно. Для получения резистентных линий CaOV3-R и A549-R клетки инкубировали в возрастающих концентрациях цисплатина в течение 2 и 4 мес соответственно.

Результаты. Предварительно мы определили полуживительные концентрации цисплатина, составившие

5,0; 5,4 и 4,16 мкмоль/л для CaOV3, OVCAR8 и A549 соответственно. Во всех 3 клеточных линиях инкубирование клеток в среде с содержанием цисплатина в концентрациях, вдвое превышающих полуживительные, привело к 2-кратному повышению экспрессии белка LC3B, маркера аутофагии, после 3–12 ч инкубации. Далее на линиях OVCAR8 и A549 провели анализ влияния цисплатина на способность клеток к миграции в рану в монослое, который показал повышенную миграционную активность обеих клеточных линий в присутствии препарата. При этом в клетках ЭРЯ наблюдали повышение общей экспрессии киназ FAK и SRC, принимающих участие в сигнализации фокальных контактов, в то время как клетки НМРЛ проявляли признаки эпителиально-мезенхимального перехода: пониженную экспрессию эпителиального маркера E-кадгерина и повышенную — мезенхимального маркера виментина. Интересно, что в резистентных линиях CaOV3-R и A549-R наблюдали повышенный по сравнению с родительскими клетками уровень базовой экспрессии маркера аутофагии LC3B. Для дальнейшего исследования роли аутофагии в ответе раковых клеток на лечение цисплатином применили технологию CRISPR/Cas9 для нокаута одного из ключевых генов аутофагии ATG5 в клетках НМРЛ линии A549. Полученные клетки будут использованы в последующих функциональных и биохимических экспериментах. Аналогичные работы ведутся и с клеточными линиями ЭРЯ.

Выводы. Подтверждены данные литературы об ассоциации резистентности клеток ЭРЯ и НМРЛ к цисплатину и повышенной базовой аутофагии. Показана связь между цисплатин-индуцированной аутофагией и проонкогенными молекулярными процессами: эпителиально-мезенхимальным переходом в случае клеток НМРЛ и повышенной экспрессией киназ фокальных контактов в случае клеток ЭРЯ. Напрямую продемонстрировано влияние аутофагии, индуцированной цисплатином, на проонкогенный фенотип (миграционную активность) исследованных клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-315-00317).

Ассоциация экспрессии генов с клиническими характеристиками рака молочной железы

К.А. Гришина¹, Т.А. Музаффарова¹, Н.И. Поспехова²,
Ю.С. Круминь², В.А. Хайленко², А.В. Карпунин¹

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

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

Рак молочной железы (РМЖ) является 2-й наиболее распространенной формой рака во всем мире и затрагивает 1 из 8 женщин в течение всей жизни. Выбор оптимальной терапии РМЖ может зависеть

от молекулярного подтипа опухоли. В этом направлении проанализирована экспрессия наборов 74 генов, отобранных биоинформатическим путем как наиболее значимых для развития РМЖ, в образцах опухолей молочной железы по отношению к нормальной ткани молочной железы. Все больные не подвергались воздействию лучевой терапии и ХТ. При исследовании дифференциальной экспрессии генов в группах больных с I и II стадией инфильтративного протокового РМЖ выявлены 8 дифференциально экспрессирующихся генов у больных со II стадией по сравнению с I стадией: *BIRC5*, *CD151*, *mTOR*, *uPAR*, *ZEB1*, *FOXO1*, *KLF8*, *PDGFR* ($p = 0,008-0,040$).

Экспрессия указанных генов была также изучена в группах больных, различающихся по уровню экспрессии эстрогена. В 1-й группе – с повышенной экспрессией эстрогена – выявлена повышенная экспрессия гена *CSF1R* ($p = 0,01$; $OR = 17,3$). Ген *CSF1R* связан с воспалительными процессами. *CSF1R* является ключевым цитокином, который участвует в рекрутировании и активации тканевых макрофагов. Ассоциированные с опухолью макрофаги были идентифицированы как регуляторы, усиливающие ангиогенное, инвазивное и метастатическое программирование неопластической ткани. Соответственно, повышенная экспрессия *CSF1R* может указывать на риск метастазирования РМЖ. Проанализирована взаимосвязь сигнальных путей *ESR1* и *CSF1R*. С использованием базы KEGG PATHWAY найдена связь этих путей через *sucln1* и *c-Myc*. Полученные данные свидетельствуют в пользу повышенного рекрутирования макрофагов при эстроген-рецептор-положительном РМЖ.

Клетки опухолевой линии, устойчивой к 5-фторурацилу, характеризуются более агрессивным инвазивным фенотипом и изменениями в экспрессии β_{III} -тубулина

Т.М. Дорошенко^{1,2}, С.Т. Акалович², А.С. Портянко¹,
А.Н. Пундик², И.Н. Северин¹, О.Л. Пашкова²,
А.Б. Межеевский³

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», агрогородок Лесной, Республика Беларусь;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфизиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь;

³Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

Препарат 5-фторурацил (5-ФУ) входит во многие протоколы ХТ колоректального рака (КРР), и начальная либо приобретенная в ходе терапии устойчивость

к нему опухолевых клеток является важной нерешенной клинической проблемой. Путем длительного культивирования в присутствии нарастающих концентраций цитостатика нами получена устойчивая к 5-ФУ клеточная линия КРР человека НСТ-116, характеризовавшаяся в 25 раз большей химиорезистентностью к 5-ФУ по сравнению с исходной материнской линией (полуингибирующие концентрации составили 0,3 и 0,012 ммоль/л соответственно), с измененной морфологией клеток, напоминающей эпителиально-мезенхимальный переход – клетки приобрели веретеновидную форму с большим числом псевдоподий и увеличенным межклеточным пространством, что свидетельствует о потере межклеточных контактов. Мы также установили, что устойчивые клетки проявляли сниженную способность к адгезии к пластику, покрытому коллагеном, а также значительно увеличенную способность к миграции в бойденовских камерах, покрытых коллагеном или матригелем, что свидетельствует об их более инвазивном фенотипе.

Мы провели протеомные исследования клеток обеих линий и установили увеличение экспрессии ряда клеточных белков в устойчивой к 5-ФУ линии. Так как ранее мы показали усиление экспрессии β_{III} -тубулина в инвазивном крае образцов КРР человека и 5-кратное увеличение экспрессии этого белка по данным масс-спектрометрии в устойчивой линии, мы решили изучить более подробно вклад β_{III} -тубулина в агрессивный фенотип устойчивой линии. Методом вестерн-блоттинга было показано увеличение экспрессии β_{III} -тубулина в устойчивой линии в 2,5 раза по сравнению с материнской линией. Эти данные также были подтверждены методом иммунофлуоресценции. Мы также показали, что при длительном культивировании в отсутствие 5-ФУ, когда устойчивая линия постепенно теряет свою химиорезистентность с 25 до 12 раз, происходит и снижение экспрессии β_{III} -тубулина в 1,5 раза по сравнению с исходной линией.

Усиленная экспрессия β_{III} -тубулина, компонента микротрубочек, характерного для опухолевых клеток, но не для нормальных клеток, коррелирует с плохим прогнозом и ответом на проводимую терапию при целом ряде карцином. Мы впервые показали феномен усиления экспрессии β_{III} -тубулина в ходе формирования устойчивости к 5-ФУ в клетках КРР *in vitro*, что также может иметь место и *in vivo* в ходе проводимой терапии пациентам. Это позволяет рассматривать β_{III} -тубулин не только в качестве маркера неблагоприятного прогноза, но и в качестве потенциальной мишени фармакологического воздействия на пул наиболее агрессивных химиорезистентных клеток КРР.

Значение экспрессии генов сомато-стволового перехода в прогрессии рака молочной железы

М.К. Ибрагимова^{1,2}, М.М. Цыганов^{1,2}, И.В. Дерюшева¹,
Е.М. Слонимская^{1,3}, Н.В. Литвяков^{1,2}

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

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

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

Введение. На основании ранее полученных данных нами была высказана рабочая гипотеза о том, что клоны, несущие амплификации в локусах 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 19p, 18chr, являются потенциальными метастатическими клонами. Возможно, в процессе клональной эволюции опухоли соматические опухолевые клетки благодаря гиперэкспрессии генов приобретают способность к обратному переходу в опухолевые стволовые клетки — осуществляется сомато-стволовой переход. Предполагается, что только такие опухолевые клетки могут образовывать метастазы.

Задачи исследования. Оценка эффективности неоадьювантной ХТ и безметастатической выживаемости больных РМЖ на основе изучения наличия амплификационных клонов в первичной опухоли больных и оценки экспрессии генов сомато-стволового перехода.

Материалы и методы. В исследование включены 62 больных с морфологически верифицированным диагнозом РМЖ IIA–IIIB (T1–4N0–3M0). Материалом для исследования служили парные образцы биопсийного материала до лечения для каждого из пациентов. Были выделены ДНК и РНК из исследуемого материала при помощи наборов QIAamp DNA mini Kit и RNeasy mini Kit plus (Qiagen, Германия) соответственно. Наличие амплификаций определили в вышеуказанных регионах с использованием микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, США). Экспрессию генов сомато-стволового перехода оценивали при помощи метода ПЦР в реальном времени с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan.

Результаты. В резидуальной опухоли после неоадьювантной ХТ выявлена экспрессия генов сомато-стволового перехода (*TERT*, *OCT3*, *SMO*, *MYC*, *SNAI2*, *MOB3B*, *TGFBR1*, *KLF4*, *BM11*, *VIM*, *FLT3*, *LAT*, *SMAD2*, *LMNB2*, *KLF1*, *TGFb*) у больных с развившимися впоследствии метастазами. Установлено, что у больных без метастазов до лечения гиперэкспрессированы 5 генов: *OCT3*, *BM11*, *LMNB2*, *TGFb1* и *FLT3*, а у больных с метастазами — 7 генов: *OCT3*, *BM11*, *LMNB2*, *TGFb1*, *TERT*, *SNAI2*, *TGFBR1*. После проведения неоадьювантной ХТ в остаточной

резидуальной опухоли больных без гематогенных метастазов частота гиперэкспрессированных генов не меняется. У больных с метастазами после неоадьювантной ХТ в остаточной резидуальной опухоли гиперэкспрессированы 14 из 16 изученных генов — кроме *KLF1* и *SMAD2*. При этом показано, что при гиперэкспрессии в остаточной резидуальной опухоли 3 генов — *OCT3*, *LAT* и *LMNB2* — у 69 % больных (11 из 16) зарегистрировано возникновение гематогенных метастазов. При гипоекспрессии хотя бы 1 из этих генов 5-летняя безметастатическая выживаемость составляет 94 % (34 пациента из 36).

Выводы. Получена модель прогнозирования возникновения гематогенного метастазирования на основе анализа экспрессии 16 генов сомато-стволового перехода. Чувствительность прогноза метастазирования составляет 69 %, специфичность — 94 %, диагностическая точность — 82 %.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-15-01 203).

Изменения экспрессии онкобелка HER2/neu и рецепторов к эстрогену в опухолевых клетках при регионарном метастазировании рака молочной железы с неопределенным уровнем экспрессии HER2/neu в клетках первичной опухоли

К.В. Конышев, С.В. Сазонов

ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
Екатеринбург;

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург

Задачи исследования. Оценка связи изменений уровней экспрессии рецепторов к эстрогену (РЭ) и HER2/neu при регионарном метастазировании РМЖ в группе случаев с неопределенным уровнем экспрессии HER2/neu (2⁺) в ткани первичной опухоли.

Материалы и методы. Операционный материал пораженных метастазами регионарных лимфатических узлов и первичной опухоли от 19 больных инвазивным неспецифицированным РМЖ, не получавших неоадьювантную терапию, с неопределенным уровнем экспрессии HER2/neu (2⁺) в ткани первичной опухоли исследовали ИГХ-методом с антителами к РЭ (клон 1D5, Dako) и HER2/neu (клон 4B5, Ventana), ткань первичной опухоли дополнительно исследовали методом SISH для оценки амплификации гена *HER2* (технология Ventana). Результаты

оценивали в соответствии с системами оценки Allred (PЭ) и ASCO/CAP 2013 (HER2/neu, *HER2*), определяли положительный (ИГХ 3⁺ или амплификация гена *HER2*) или отрицательный (ИГХ 0/1⁺ или отсутствие амплификации гена *HER2*) HER2/neu-статус опухоли.

Результаты. Обнаружено достоверное преобладание частоты случаев со снижением ($n = 16$) над частотой случаев с повышением ($n = 1$) уровня экспрессии HER2/neu в ткани метастазов ($p < 0,001$, точный тест Фишера). Частота совпадений HER2/neu-статусов первичной опухоли и метастазов составила 84,2 % (95 % ДИ 59,5–95,8). Из 16 случаев со снижением уровня экспрессии HER2/neu при регионарном метастазировании повышение уровня экспрессии PЭ наблюдалось в 9 случаях, снижение – в 2 случаях ($p = 0,023$, точный тест Фишера).

Выводы. Обнаруженное снижение уровня экспрессии онкобелка HER2/neu, сохранение HER2/neu-статуса и одновременное повышение уровня экспрессии PЭ в клетках РМЖ при регионарном метастазировании возникает вследствие формирования метастазов преимущественно из тех клеток первичной опухоли, в которых большое количество молекул PЭ подавляет транскрипцию гена *HER2*. Мы предполагаем, что это происходит вследствие конкурентного связывания кофактора SRC и изменения соотношения субъединиц молекулы транскрипционного фактора AP-2, которая в результате этого теряет транскрипционную активность.

Взаимодействие клеточных линий рака молочной железы различных молекулярных подтипов

Ю.А. Небова^{1,2}, В.А. Бычков^{1,2}, Л.С. Ляпунова¹,
Н.В. Литвяков^{1,2}

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

Введение. Опухолевая гетерогенность – состояние, при котором опухолевый очаг содержит несколько фенотипически и генотипически различных популяций – клонов злокачественных клеток. Эти клоны могут взаимодействовать друг с другом, и по принципам популяционной экологии можно разделить типы взаимодействий на позитивные (синергизм, мутуализм, комменсализм) и негативные (конкуренция, аменсализм, хищничество, паразитизм). Мы полагаем, что тип межклональных взаимодействий связан с процессами роста опухоли, ее рецидивированием и развитием резистентности к терапии. Предположительно, при позитивном типе взаимодействия популяций будет наблюдаться прогрессирование опухоли и развитие резистентности,

а при негативном типе, наоборот, будет происходить повышение чувствительности опухоли к терапии и снижение частоты рецидивирования, что является благоприятным исходом.

Задачи исследования. Анализ типов взаимодействия между модельными клеточными линиями РМЖ разных молекулярных подтипов (люминальный А – MCF-7; люминальный В – BT-474; трижды негативный – MDA-MB-231).

Материалы и методы. Анализ роста численности клеток осуществляли в режиме реального времени с построением кривых роста с помощью клеточного анализатора iCellegence. Идентификацию клеточных линий проводили с использованием ИГХ-окрашивания клеточных линий MCF-7 (ER⁺HER2⁻), BT-474 (ER⁺HER⁺) и MDA-MB-231 (ER⁻HER2⁻) по стандартному протоколу с использованием антител к ER и HER2/neu (Dako, США).

Результаты. ИГХ-анализ и анализ динамики роста клеточных линий в режиме реального времени показали, что как при взаимодействии клеточных линий BT-474 и MCF-7, так и при взаимодействии BT-474 со средой от линии MCF-7 наблюдается статистически значимое усиление роста популяции клеток BT-474 по сравнению с контролем. Это свидетельствует о позитивном типе взаимодействия. Напротив, взаимодействие линий MDA-MB-231 и BT-474, MDA-MB-231 и среды от BT-474 приводит к значимому снижению роста клеточной линии MDA-MB-231, что говорит о негативном типе взаимодействия между этими линиями. Также на уровне тенденции установлено снижение роста клеточной линии MCF-7 в среде от BT-474 и линии BT-474 в среде от MDA-MB-231.

Выводы. На модельных системах продемонстрированы позитивный и негативный типы взаимодействия между опухолевыми линиями РМЖ различных молекулярных подтипов.

Изучение механизмов эпителиально-мезенхимальной трансформации на примере экспериментального рака желудка

М.А. Сеньчукова¹, О.Н. Томчук¹, Е.И. Шурыгина¹,
С.Н. Легута^{2,3}, Э.К. Алиджанов³, А.Н. Никиян³,
Д.А. Раздобреев³

¹ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, Оренбург;

²ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург;

³Институт микро- и нанотехнологий ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург

Введение. Эпителиально-мезенхимальная трансформация (ЭМТ) играет ключевую роль в инвазии и метастазировании злокачественных опухолей.

Задачи исследования. Изучение механизмов ЭМТ на примере экспериментального рака желудка.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 18 белых крысах породы Вистар, самцах. Животные были разделены на 2 группы: экспериментальная ($n = 15$) и контрольная ($n = 3$). Экспериментальным крысам с помощью перорального зонда вводили по 1 мл суспензии 0,05 % карбоната кальция в смеси 0,4 % формальдегида и 0,4 % перекиси водорода в соотношении 1:1 на 1-й и 3-й дни эксперимента. Контрольным животным вводили по 1 мл дистиллированной воды аналогичным образом в то же время. Гистопрепараты окрашивали гематоксилином Майера и эозином по Коссу и иммуногистохимически с использованием антител к виментину, Snail, гладкомышечному актину, цитокератину-20. Наличие и морфологию наночастиц карбоната кальция в канцерогенной суспензии исследовали методом динамического рассеивания света и атомно-силовой микроскопии.

Результаты. Через 4 мес после начала лечения у 80 % крыс и через 6 мес у 100 % крыс экспериментальной группы были выявлены злокачественные опухоли желудка, соответствующие интраэпителиальному раку с инвазией кластеров опухолевых клеток в подслизистую, мышечную и серозную оболочки органа, а также в сальник. Положительная окраска опухолевых клеток на Snail и виментин свидетельствовала о том, что в основе их инвазии лежат механизмы ЭМТ. При изучении канцерогенной смеси методом динамического рассеивания света и атомно-силовой микроскопии были выявлены округлые или сферические наночастицы карбоната кальция 2 типов: со средним радиусом $7,8 \pm 10,8$ и $155,3 \pm 86,5$ нм. При окраске гистопрепаратов желудка крыс по Коссу у крыс опытной группы были выявлены множественные микрокальцинаты в слизистой оболочке даже через 7,5 мес от начала эксперимента. В контрольной группе опухолевого поражения желудка и микрокальцинатов не выявлено.

Выводы. Полученные результаты, а также анализ данных литературы позволяют предположить, что активация механизмов ЭМТ при злокачественных новообразованиях может быть связана с образованием микрокальцинатов в опухоли.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и субъекта РФ (грант № 18-415-560 005).

Протеазы экзосом у больных раком яичника: связь с объемом асцита

Юнусова Н.В.^{1,2}, Тутутова Е.А.¹, Патышева М.Р.¹, Молчанов С.В.¹, Коломиец Л.А.¹, Тамкович С.Н.³, Кондакова И.В.¹

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

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

³ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск

Введение. Экзосомы – небольшие внеклеточные везикулы размером 30–100 нм, имеют большое значение в процессах химиорезистентности и метастазирования опухолей. Экзосомальные протеазы являются важными регуляторами передачи сигналов от рецепторов фактора роста и рецепторов адгезии и участвуют в регуляции подвижности клеток и фолдинга белков.

Задачи исследования. Оценка уровня ADAM10, ADAM17 и 20S протеасом в циркулирующих и асцитических экзосомах у больных раком яичника (РЯ) во взаимосвязи с объемом асцита.

Материалы и методы. Образцы крови и асцита у больных с пограничными опухолями яичников (ПОЯ) ($n = 15$; возраст $39,5 \pm 2,5$ года) и больных с диссеминированным РЯ IIIB–IIIC стадии ($n = 35$; возраст $56,5 \pm 2,5$ года) использовали для выделения экзосом методом ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Объем асцита измеряли клинически и путем ультразвукового исследования (УЗИ). Экзосомы были охарактеризованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Уровень тетраспанин-ассоциированных (ADAM10/ADAM17) и тетраспанин-неассоциированных (20S-протеасомы) протеаз оценивали с помощью проточной цитометрии и вестерн-блот-анализа.

Результаты. В экзосомах плазмы крови при ПОЯ и РЯ преобладает популяция ADAM10⁺/ADAM17⁻ (до 92 %). В экзосомах из асцита при ПОЯ в равной степени встречаются ADAM10⁺/ADAM17⁻ и ADAM10⁻/ADAM17⁺ (до 38 %), дабл-отрицательная популяция представлена редко (21 %). При РЯ доминирует дабл-отрицательная популяция (86 %). У больных РЯ экспрессия 20S-протеасом в экзосомах плазмы крови увеличивается в 6 раз, в экзосомах асцита – в 3 раза по сравнению с ПОЯ. С увеличением объема асцита происходит снижение экспрессии 20S-протеасом в экзосомах как в плазме крови, так и в асците. При следовых количествах асцита (хороший прогностический признак при РЯ) в плазме крови повышена доля ADAM10⁺/ADAM17⁻-экзосом, в асците эта же популяция убывает и повышается доля дабл-отрицательных экзосом.

Выводы. Дальнейшие исследования субпопуляционного состава экзосом необходимы для выяснения роли тетраспанин-ассоциированных и тетраспанин-неассоциированных протеаз в развитии и прогрессии овариального рака.

Тезисы

Современная молекулярно-биологическая классификация типов рака эндометрия и клинико-морфологические особенности опухолей у больных, страдающих и не страдающих ожирением

Л.М. Берштейн, А.О. Иванцов, А.Г. Иевлева, Д.А. Васильев, М.А. Клещев, А.Р. Венина

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Введение. Последние годы ознаменовались заменой прежнего дуалистического подхода к типированию рака эндометрия (РЭ) — заболевания, характеризующегося быстрым ростом распространенности и весьма вероятной связью с эпидемией ожирения, — на современную классификацию, подразделяющую это новообразование на 4 типа по результатам генетического и ИГХ-анализа.

Задачи исследования. Установление принадлежности случаев РЭ в обследованной группе к тому или иному типу (с мутацией *POLE*, дефектом репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR-D), экспрессией (избыточной или умеренной) онкобелка p53 и отсутствием любого из названных признаков, т.е. без характерного молекулярного профиля, или WCMР) и сравнения с учетом этого клинико-морфологических особенностей опухолевого процесса у больных с индексом массы тела (ИМТ) ≥ 30 или < 30 .

Материалы и методы. Отнесение к тому или иному типу заболевания базировалось на изучении ткани более 200 карцином эндометрия. Поиск мутаций *POLE* проводили в ДНК из архивных образцов опухоли при помощи анализа плавления ПЦР-продуктов с высоким разрешением и последующим секвенированием. Оценку экспрессии p53, белков MMR и маркера пролиферативной активности Ki-67 выполняли ИГХ-методом.

Результаты. По полученным данным, типы РЭ по частоте распределились следующим образом: с мутацией *POLE* — 5 % случаев, с MMR-D — 32,8 %, с гиперэкспрессией (5 %) или умеренной (10,1 %) экспрессией p53 (в сумме 15,1 %), тип без характерного

молекулярного профиля — 47,1 %. При сравнении отдельных типов их основные характеристики применительно к клинико-морфологическим особенностям процесса сгруппировались следующим образом: а) с мутацией *POLE* — единственный тип, где при ИМТ ≥ 30 выявлялись только аденокарциномы, все больные находились в стадии Ia или Ib (без связи с ИМТ), инвазия в подавляющем числе случаев была $< 0,5$ толщины миометрия, а индекс Ki-67 характеризовался (по сравнению с другими типами) промежуточными значениями, мало зависящими от ИМТ; б) с MMR-D — стадии Ia и Ib чаще, а IIa–IV реже при ИМТ ≥ 30 , дифференцировка (grade), как и в группе с мутацией *POLE*, более благоприятна при ИМТ ≥ 30 , инвазия $\geq 0,5$ толщины миометрия реже при избыточной массе тела, а заключение в отношении Ki-67 аналогично таковому в группе с мутацией *POLE*; в) при p53⁺ аденокарциномы встречаются реже (что известно) вне зависимости от ИМТ (что менее известно); стадии IIa–IV чаще при ИМТ ≥ 30 (что выглядит необычно), а инвазия $\geq 0,5$ — при ИМТ < 30 ; дифференцировка по сравнению с другими типами наименее благоприятна, а значение Ki-67 наиболее высоко (причем в равной степени при ИМТ < 30 и ≥ 30 в отличие от объединенной группы с избыточной и умеренной экспрессией p53); г) наконец, при типе без характерного молекулярного профиля другие гистологические варианты, кроме аденокарциномы, более редки вне зависимости от ИМТ, большая благоприятность дифференцировки тоже мало зависит от ИМТ, стадии IIa–IV и инвазия $\geq 0,5$ более редки при ИМТ ≥ 30 , а значения Ki-67 низки, причем особенно при ИМТ ≥ 30 .

Выводы. Приведенные сведения позволяют заключить, что клинико-морфологические особенности опухолевого процесса у больных РЭ своеобразным образом модифицируются как при различных молекулярно-биологических типах заболевания, так и с поправкой на величину ИМТ, что заставляет при подборе превентивных и лечебных мер ориентироваться как минимум на оба эти обстоятельства.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-015-00 026). Авторы также выражают благодарность сотрудникам отделения онкогинекологии (руководитель — проф. И.В. Берлев) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Роль метилирования генов микроРНК в патогенезе и метастазировании рака почки

А.М. Бурденный^{1,2}, В.И. Логинов^{1,3}, И.В. Пронина¹,
Н.А. Иванова¹, Е.А. Филиппова¹, Т.П. Казубская⁴,
М.В. Фридман⁵, Н.Е. Кушлинский⁴, А.В. Карпунин³,
Э.А. Брага^{1,3}

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

²ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва;

⁴ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

⁵ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН», Москва

Введение. Метилирование генов микроРНК играет системную роль в регуляции эпигенетических механизмов при онкогенезе. Однако эта модификация, изученная для широкого спектра генов микроРНК при многих видах рака, при раке почки касается единичных микроРНК, таких как miR-9 и miR-34. Светлоклеточный почечноклеточный рак (скПКР) является 3-м по распространенности онкоурологическим заболеванием и характеризуется максимальной частотой неблагоприятного исхода.

Задачи исследования. Идентификация новых супрессорных микроРНК, гиперметилируемых при скПКР, и выяснение связи этой модификации с прогрессированием скПКР.

Материалы и методы. Использована выборка из 70 парных (опухоль/норма) образцов скПКР и ткани почки от 19 умерших от неонкологических заболеваний. Применены метил-специфичная ПЦР, количественная ПЦР и наборы для анализа уровня микроРНК (Applied Biosystems, США).

Результаты. Показано, что 14 генов микроРНК (*MIR-124-1/-2/-3*, *-125b-1*, *-129-2*, *-132*, *-137*, *-193a*, *-34b/c*, *-9-1*, *-9-3*, *-107*, *-130b*, *-1258*) из 19 исследованных значимо гиперметилированы, 2 гена (*MIR-191*, *-212*) – гипометилированы. В пилотном эксперименте на выборке из 14 образцов скПКР показано, что экспрессия 11 генов микроРНК значимо снижена и для 6 генов (*MIR-124-3*, *-125b-1*, *-129-2*, *-137*, *-34b/c*, *-375*) выявлена корреляция между изменениями статуса метилирования и уровней экспрессии ($r_s \geq 0,6$; $p \leq 0,02$). Этот результат указывает на роль метилирования генов микроРНК в регуляции их экспрессии и на функциональную роль метилирования генов микроРНК в патогенезе скПКР. Кроме того, для ряда генов микроРНК установлена ассоциация их гиперметилирования с прогрессированием скПКР (более поздней клинической стадией, размером опухоли и степенью анаплазии). В частности, частота метилирования 6 генов (*MIR-125b-1*, *-129-2*, *-203a*, *-375*, *-107*, *-1258*) значимо выше в образцах пациентов

с метастазами. Определены новые маркеры для диагностики скПКР (*MIR-125b-1*, *-375*, *-137*, *-193a*) и прогнозирования метастазирования (*MIR-125b-1*, *-375*, *-107*, *-1258*, *-203*). Обе системы характеризуются высокой клинической чувствительностью (86 %) и специфичностью (95 %), *AUC* 0,93.

Выводы. При скПКР обнаружено aberrантное метилирование 18 генов микроРНК, на примере ряда микроРНК показана роль метилирования в регуляции их экспрессии и связь с метастазированием. Предложенные новые системы маркеров для диагностики и прогнозирования метастазирования скПКР могут найти применение в клинике.

Работа выполнена в рамках фундаментальных исследований для государственных академий на 2013–2020 гг. (грант № 0520-2014-0030).

Сравнительная оценка содержания матричных металлопротеиназ и компонентов сигнальной системы VEGF в сыворотке крови больных раком желудка

Е.С. Герштейн, А.П. Петросян, Н.Е. Кушлинский,
И.С. Стилиди

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Высокая частота заболеваемости раком желудка, его выявление на достаточно поздних стадиях и связанная с этим неудовлетворительность отдаленных результатов лечения определяют необходимость поиска молекулярных маркеров, характеризующих агрессивный потенциал данного заболевания и прогнозирующих риск опухолевой прогрессии. К их числу относятся молекулы, определяющие ангиогенный, инвазивный и метастатический потенциалы опухоли, – VEGF и его рецепторы, а также матричные металлопротеиназы (ММП), расщепляющие основные компоненты внеклеточного матрикса, и их тканевые ингибиторы (ТИМП). В некоторых случаях эти маркеры могут быть использованы в целях уточняющей диагностики и мониторинга заболевания.

Задачи исследования. Сравнительная оценка содержания VEGF, его рецепторов 1-го и 2-го типа (VEGFR1 и VEGFR2) и ключевых представителей семейств ММП/ТИМП в сыворотке крови больных раком желудка и здоровых доноров для оценки потенциальной клинической значимости этих маркеров.

Материалы и методы. В исследование включено 78 больных раком желудка I–IV стадии (4 из них обследованы в динамике) и 69 здоровых доноров соответствующего пола и возраста. Содержание VEGF, VEGFR1, VEGFR2, ММП-2, -7, -9 и ТИМП-1, -2 в сыворотке крови, полученной до начала специфическо-

го лечения, определяли наборами для ИФА серии Quantikine^o (R&D Systems, США).

Результаты. Содержание VEGF, VEGFR1, ММП-7 и ТИМП-2 в сыворотке крови больных раком желудка было достоверно выше, чем в группе контроля, а содержание VEGFR2 и ММП-2, напротив, было достоверно снижено. Сывороточные уровни ММП-9 и ТИМП-1 у больных раком желудка и здоровых доноров достоверно не различались. Наиболее значительным было увеличение уровней VEGF (медианы 432 и 275 пг/мл соответственно, $p < 0,00001$), ММП-7 (медианы 5,6 и 2,2 нг/мл, $p < 0,000001$) и ТИМП-2 (медианы 110 и 61 нг/мл, $p < 0,0001$). Снижение уровней ММП-2 (медианы 212 и 573 нг/мл) и VEGFR2 (медианы 8,7 и 10,6 нг/мл) также было высокодостоверным (в обоих случаях $p < 0,00001$). У больных раком желудка выявлены достоверные положительные корреляционные связи между уровнями VEGF и ТИМП-1, ММП-9 и ТИМП-1, ММП-2 и ТИМП-2 в сыворотке крови ($r = 0,43; 0,42$ и $0,32$ соответственно, $p < 0,001$), отсутствовавшие в группе контроля.

Выводы. У больных раком желудка происходят значительные и разнонаправленные изменения содержания ключевых регуляторов ангиогенеза и инвазии в сыворотке крови, что может быть использовано для разработки комплексных неинвазивных диагностических и прогностических тестов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-03-00793).

Ранняя диагностика, мониторинг терапии и прогноз СА125-отрицательного рака яичников: лабораторные аспекты

О.В. Готько, В.И. Прохорова, Л.А. Державец

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

Введение. Раннее выявление и повышение эффективности лечения рака яичников (РЯ) по-прежнему остаются актуальными проблемами в онкогинекологии, что определяется ростом заболеваемости, отсутствием эффективных программ скрининга, а также высокой частотой ложноотрицательных результатов предлагаемых диагностических тестов на ранних стадиях заболевания.

Задачи исследования. Оценка диагностической значимости уровня HE4 в крови пациенток с СА125-отрицательным РЯ для диагностики, мониторинга и прогноза заболевания.

Материалы и методы. В основу работы положены данные 173 пациенток: из них 43 пациентки

с исходным уровнем СА125 < 35 Е/мл (группа 1) и 130 пациенток с уровнем СА125 после 3 курсов адъювантной полихимиотерапии (АПХТ) < 35 Е/мл (группа 2). Уровни СА125 и HE4 в сыворотке крови определяли иммунохемилюминесцентным методом на автоматическом анализаторе Cobas e411 (Roche, Швейцария) до начала лечения, перед каждым курсом и после окончания АПХТ. Полученные данные обработаны непараметрическими методами статистического анализа с использованием программ Statistica 10.0 и SPSS 21.

Результаты. Анализ частоты встречаемости различных стадий заболевания у пациенток с исходно нормальным уровнем СА125 ($n = 43$) показал, что в 81,4 % случаев (у 35 пациенток) была диагностирована I–II стадия РЯ, причем у 30 (85,7 %) из них наблюдались повышенные уровни маркера HE4. В группе 2 ($n = 130$) изучена взаимосвязь уровня HE4 с выживаемостью после 3 курсов АПХТ до прогрессирования опухолевого процесса. В группе с повышенными значениями HE4 прогрессирование выявлено у 55 (87,3 %) пациенток, причем у 38 (69,1 %) из них – в течение 1-го года после окончания курсов АПХТ. Однолетняя и 3-летняя выживаемость до прогрессирования у пациенток с нормальным уровнем HE4 составила 97,3 и 75,5 % соответственно, у пациенток с повышенным уровнем маркера – 59,2 и 29,9 % соответственно ($p_{\log-rank} < 0,001$).

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования маркера HE4 для диагностики ранних стадий заболевания у пациенток с СА125-отрицательным РЯ, а также для мониторинга терапии и оценки прогноза заболевания у пациенток с нормализацией уровня СА125 после 3 курсов АПХТ.

Роль мутаций гена NOTCH1 в прогнозе течения хронического лимфолейкоза

Д.В. Кравченко¹, А.И. Свирновский², А.Е. Силин¹, В.Н. Мартинков¹, А.А. Силина¹

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь;

²ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь

Введение. Важным этапом ведения пациентов с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) является прогнозирование течения заболевания для оценки необходимости более раннего начала терапии и использования альтернативных методов лечения в индивидуальном порядке в зависимости от выявляемых маркеров. В последнее время большое значение в определении прогноза ХЛЛ приобретают молекулярно-генетические маркеры (NOTCH1, SF3B1 и др.).

Задачи исследования. Определить взаимосвязь клинико-лабораторных (в том числе молекулярно-генетических) прогностических маркеров с различным течением ХЛЛ.

Материалы и методы. Нами было обследовано 112 пациентов с диагнозом ХЛЛ, наблюдавшихся в ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» в период с 2015 по 2017 г. Данная когорта была разделена на 2 группы: в 1-ю группу вошли 52 пациента, наблюдавшиеся амбулаторно и не имевшие признаков прогрессии ХЛЛ на момент включения в исследование, а 2-ю группу составили 60 пациентов с клиническими признаками прогрессирования заболевания. Медиана возраста больных в 1-й группе составила 60 лет, во 2-й — 62 года. Для определения мутаций гена *NOTCH1* применяли метод SSCP-ПЦР с последующим прямым секвенированием образцов ДНК, имеющих конформационный полиморфизм. Анализ осуществляли в пределах 34-го экзона гена *NOTCH1*. Использовали методы непараметрической статистики, рассчитываемые в пакете программ Statistica 10.0.

Результаты. Пациенты из 1-й группы статистически значимо отличались от пациентов из 2-й группы по уровням β 2-микроглобулина и лактатдегидрогеназы. Уровни тимидинкиназы ($p < 0,001$) и ТРА ($p < 0,011$) также были значимо больше у пациентов из 2-й группы в сравнении с пациентами из 1-й группы. Согласно данным иммунофенотипирования статистически значимые различия были получены по маркеру Zap70.

В результате молекулярно-генетического анализа у 12 пациентов выявлены 3 различных типа клинически значимых мутаций. Была установлена значимая корреляция между наличием мутаций гена *NOTCH1* и уровнем β 2-микроглобулина в крови (коэффициент бисериальной корреляции 0,82; $p < 0,001$), а также между наличием мутаций *NOTCH1* и содержанием тимидинкиназы (коэффициент бисериальной корреляции 0,74; $p < 0,001$).

В 1-й группе среди пациентов с мутациями *NOTCH1* спустя 2 года наблюдения прогрессирование отмечалось в 40 % случаев, а среди пациентов без данной мутации — в 11,4 % случаев ($p = 0,08$, критерий χ^2). Также следует отметить, что после 2 лет от момента постановки диагноза ХЛЛ наблюдается более резкое сокращение времени до прогрессирования именно у пациентов с мутацией *NOTCH1*.

Выводы. Исследование показало, что определенной прогностической значимостью обладают такие маркеры, как лактатдегидрогеназа, β 2-микроглобулин, тимидинкиназа, ТРА, Zap70, что подтвердилось сопоставлением их уровней у пациентов с прогрессированием ХЛЛ и без него. Также с наличием вышеуказанных маркеров сопоставимы данные по наличию мутации гена *NOTCH1*, что свидетельствует о перспективности изучения данного маркера в качестве дополнительного фактора прогноза течения ХЛЛ.

Комплексное изменение цитоскелета клеток немелкоклеточного рака легкого

И.А. Мамичев, С.А. Калужный, Ю.Б. Дьякова,
Н.О. Вихлянцева, С.Д. Коломийцев, Т.А. Богуш
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. *De novo* экспрессия виментина в клетках эпителиальных опухолей при эпителиально-мезенхимальном переходе считается неблагоприятным прогностическим признаком, связанным с инвазией и метастазированием. β_{III} -тубулин (TUBB3) — изоформа белка микротрубочек β -тубулина, также ассоциированная с миграцией опухолевых клеток в окружающие и отдаленные ткани.

Цель исследования. Оценить связь между уровнем экспрессии виментина и TUBB3 в ткани НМРЛ, чтобы ответить на вопрос, являются ли эти белки частью единого фенотипического комплекса, характеризующего метастатический потенциал НМРЛ.

Материалы и методы. Количественное иммунофлуоресцентное исследование экспрессии опухолевых маркеров в 63 хирургических образцах НМРЛ проведено методом проточной цитофлуориметрии. Для выявления фракции клеток в состоянии эпителиально-мезенхимального перехода применялось двойное окрашивание на специфические эпителиальные цитокератины и мезенхимальный белок виментин. В работе использованы первичные и вторичные антитела: для TUBB3 — ab7751 и ab98729; для ЦК — M0821 и ab98726; для виментина — SP20 и ab98510. Количественную обработку данных проводили с помощью программы FlowJo. За уровень экспрессии принимали долю (%) специфически окрашенных клеток относительно показателя при инкубации с вторичными антителами.

Результаты. Выявлена значительная гетерогенность уровня экспрессии виментина (4–92 %) и TUBB3 (10–74 %) в ткани НМРЛ разных больных. Средний уровень экспрессии виментина составил $37,9 \pm 20,8$ %, а средний уровень экспрессии TUBB3 — $42,7 \pm 16,9$ %. Выявлена положительная корреляция средней силы между экспрессией в опухоли виментина и TUBB3 (коэффициент корреляции Спирмена 0,6; $p < 0,05$). Показано, что средний уровень экспрессии TUBB3 в группе пациентов с аденокарциномой легкого выше, чем в группе с плоскоклеточным раком ($48,6 \pm 15,2$ % в ткани аденокарциномы против $36,5 \pm 16,7$ % в ткани плоскоклеточного рака; $p < 0,01$). В то же время нет статистической разницы в уровне коэкспрессии специфических эпителиальных цитокератинов и виментина между подгруппами пациентов с разным гистологическим типом ($48,4 \pm 20,7$ % клеток, экспрессирующих маркер, в ткани аденокарциномы против $51,0 \pm 21,0$ % в ткани плоскоклеточного рака; $p = 0,3$).

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о комплексном изменении цитоскелета в ткани НМРЛ, включающем перестройку системы промежуточных филаментов (*de novo* экспрессия виментина) и системы микротрубочек (экспрессия опухлеассоциированной изоформы β -тубулина TUBB3). При этом уровень экспрессии TUBB3 ассоциирован с гистологическим типом опухоли. Учитывая вклад эпителиально-мезенхимального перехода в процесс метастазирования и положительную корреляцию TUBB3 и виментина по уровню экспрессии, можно предположить, что TUBB3 также участвует в реализации метастатического потенциала НМРЛ.

Профиль экспрессии длинных некодирующих РНК циркулирующими опухолевыми клетками при распространенном раке яичников

Р.Р. Мифтахова¹, С.О. Генинг², А.А. Ризванов¹,
И.И. Антонеева², Д.У. Гафурбаева¹

¹ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Республика Татарстан;

²ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск

Введение. Для понимания роли циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в канцерогенезе важен их профиль экспрессии длинных некодирующих РНК (lncRNA), в частности продукция ими опухоль-специфичных факторов прогрессирования. lncRNA — гетерогенный класс РНК, участвующих в регуляции активности генов, способствующих метастазированию. Изучение роли lncRNA *HOTAIR*, *PVT1* позволит приблизиться к оценке инвазивно-метастатического потенциала ЦОК. *HOTAIR* участвует в пролиферации, апоптозе, инвазии и метастазировании клеток (М. Najjari, 2015; J.J. Qiu, 2015). Исследование эпителиального рака яичников (РЯ) выявило взаимосвязь экспрессии гена *HOTAIR* с выживаемостью, метастазированием и агрессивностью опухоли (J.J. Qui, 2014). В экспериментах *in vitro* на клеточных линиях SCOV3, OVCA129 установлено, что повышение экспрессии lncRNA *HOTAIR* обеспечивает формирование популяции клеток, резистентных к цисплатину, провоцирует пролиферацию через активацию NF- κ B, PI3K3R3 (L. Dong, 2016), MAPK1, Wnt/ β -катенин-сигнального пути (J. Li, 2015), в то время как блокирование *HOTAIR* восстанавливает чувствительность к цисплатину (Y. Wang, 2015). Экспрессия гена *PVT1* в тканях РЯ цисплатин-резистентных пациентов была значительно выше в сравнении с экспрессией *PVT1* у цисплатин-чувствительных больных (E. Liu, 2015). Показано, что эти процессы реализуются в результате регуляции пролиферации через активацию TGF β (X. Chen, 2018).

Цель исследования. Изучение экспрессии lncRNA *HOTAIR*, *PVT1* в ЦОК больных РЯ.

Материалы и методы. Из 20 образцов периферической крови больных РЯ на III и IV клинических стадиях (по FIGO) до и после 2 курсов платиносодержащей ХТ выделены и обогащены ЦОК. Анализ нормализованной экспрессии lncRNA *HOTAIR*, *PVT1* проводился методом ПЦР в реальном времени с нормализацией через уровень гена 18S.

Результаты. Установлено, что у первичных больных РЯ уровень экспрессии *HOTAIR* в опухолевых клетках составляет $0,962 \pm 0,416$ (минимум — 0,014; максимум — 4,042), *PVT1* — $1,904 \pm 1,016$ (минимум — 0,526; максимум — 13,56). После получения 2 курсов ХТ экспрессия снизилась и составила $0,065 \pm 0,019$ для *HOTAIR* и $0,617 \pm 0,124$ для *PVT1*. Однако динамика индивидуальных изменений в процессе лечения не была однозначной. В 40 % случаев произошло повышение уровня нормализованной экспрессии *HOTAIR*, в 20 % — уровня *PVT1*. Максимальные значения были у пациентки с летальным исходом до завершения ХТ. В 90 % случаев экспрессия *HOTAIR*, *PVT1* в сыворотке больных РЯ не определялась. Корреляций экспрессии lncRNA с уровнем CA125 не выявлено.

Выводы. Первичные результаты могут свидетельствовать о возможности использования оценки уровня lncRNA *HOTAIR*, *PVT1* в мониторинге эффективности платиносодержащей ХТ.

Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

Активность ангиотензинрегулирующих ферментов у больных локализованным раком почки в зависимости от клинико-морфологических показателей

Р.А. Осокин^{1,2}, Е.Ф. Комарова³, И.А. Абоян²

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

²МБУЗ КДЦ «Здоровье», Ростов-на-Дону;

³ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Цель исследования. Определить зависимость уровня ферментов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы в ткани опухоли и периферической крови у больных раком почки (РП) от клинико-морфологических характеристик.

Материалы и методы. Проведено исследование уровня тканевой активности ангиотензинпревращающих ферментов АПФ и АПФ2 у 128 больных

локализованным РП T1N0M0 методом ИФА. Исследовали образцы ткани опухоли при проведении робот-ассистированной резекции почки. Забор крови из периферической вены у всех обследуемых проводили утром в состоянии покоя. Нормативные значения исследованных показателей периферической крови выявляли у практически здоровых лиц аналогичного возраста (здоровые доноры, $n = 35$).

Результаты. При анализе связи между тканевой активностью ферментов и полом/возрастом пациентов корреляций не обнаружено ($p > 0,05$ для всех случаев). Стратификация больных в зависимости от степени дифференцировки опухоли показывает, что активность АПФ значительно ниже в G_1 по сравнению с G_3 (G_1 против G_2 $p = 0,045$, G_1 против G_3 $p = 0,042$). АПФ2 имеет гораздо меньшую активность при G_1 по сравнению с G_4 (G_1 против G_2 $p = 0,013$; G_1 против G_3 $p = 0,024$, G_1 против G_4 $p = 0,038$). Анализ зависимости активности изученных ферментов от стадии опухолевого процесса показал повышенную активность обоих ферментов при стадии T1b по сравнению с T1a, однако разница показателей не достигла статистической значимости (для АПФ и АПФ2 $p = 0,09$ и $0,08$ соответственно). При исследовании локального опухолевого синтеза ферментов в зависимости от размера опухоли результаты оценены в 2 группах: опухоли размерами < 4 см и $4-7$ см. Содержание АПФ ниже в опухолях размером < 4 см по сравнению с опухолями размером $4-7$ см ($p = 0,010$). Уровень АПФ2 не зависит от размеров опухолевого узла.

Активность ферментов АПФ и АПФ2 в периферической крови увеличена по сравнению со здоровыми донорами. Более низкая активность АПФ наблюдается в сыворотке больных при G_1 (G_1 против G_2 $p = 0,011$, G_1 против G_3 $p = 0,027$, G_1 против G_4 $p = 0,041$). Не выявлено корреляций между уровнями изученных ферментов в периферической крови и возрастом, полом больных РП, размерами опухоли и степенью дифференцировки (только для АПФ2) ($p > 0,05$ для всех случаев).

Выводы. Уровень опухолевой активности АПФ и АПФ2 значительно коррелирует с патологическими параметрами агрессивности опухолей, такими как степень дифференцировки и размеры опухоли. Более низкая активность ферментов выявлена у больных РП с высокой степенью дифференцировки опухоли, а также в опухолях размером < 4 см (для АПФ). В периферической крови показана связь активности АПФ только со степенью дифференцировки опухоли. Дальнейшие исследования на больших выборках пациентов целесообразны для подтверждения прогностической значимости полученных данных.

Прямые маркеры фиброза в оценке гепатотоксичности химиотерапии при метастатическом колоректальном раке

В.И. Прохорова, О.В. Готько, Л.М. Шишло, Т.П. Цырусь, О.А. Грицкова

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

Введение. ELF-тест (Enhanced Liver Fibrosis Test) валидирован при широком спектре хронических заболеваний печени, однако его место в алгоритме обследования онкологических пациентов пока не определено, что говорит об актуальности исследований для создания клинко-лабораторной концепции его использования в онкологии.

Цель исследования. Определить содержание прямых маркеров фиброза у пациентов с метастатическим колоректальным раком (МКРР) и оценить возможность их использования для оценки гепатотоксичности схем ХТ FOLFOX, FOLFIRI.

Материалы и методы. Исследование проведено у 30 клинически здоровых лиц и 44 больных МКРР (32 пациента с синхронным поражением печени, IV стадия заболевания; 12 – с метасинхронным поражением печени). Определение прямых маркеров фиброза – N-терминального пептида проколлагена III (P1NP), тканевого ингибитора матриксметаллопротеиназы-1 (TIMP-1), гиалуриновой кислоты и расчет ELF проводили на автоматическом анализаторе Advia Centaur CP (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., США). Статистическая обработка полученных результатов выполнена с использованием непараметрических методов.

Результаты. Рассчитаны референсные диапазоны уровней P1NP, TIMP-1, HA и ELF-теста. Уровни прямых маркеров фиброза у больных МКРР до начала лечения статистически значимо отличались от уровней, наблюдаемых в группе контроля ($p < 0,001$), и находились в диапазоне, соответствующем выраженному фиброзу или циррозу печени. У 60 % пациентов с биохимическими признаками гепатотоксичности уровень TIMP-1 до начала ХТ в 1,5 раза превышал таковой в группе без признаков гепатотоксичности, динамические изменения показателя в изучаемых группах имели статистически значимые различия ($p = 0,05$). После 3 курсов ХТ в режиме FOLFIRI концентрация в крови TIMP-1 на 56 %, гиалуриновой кислоты – на 42 %, P1NP – на 38 % и ELF-теста – на 12 % были ниже у пациентов, которым к схеме ХТ был добавлен бевацизумаб.

Выводы. P1NP, TIMP-1, гиалуриновая кислота и ELF-тест являются перспективными показателями для оценки тяжести фиброза, и их определение у больных МКРР с поражением печени может быть использовано при выборе стратегии лечения, мониторинге течения заболевания и оценке гепатотоксичности ХТ.

Параметры провоспалительного статуса у больных немелкоклеточным раком легкого

О.Е. Савельева¹, Д.С. Письменный^{1,2}, Е.О. Родионов¹,
М.В. Завьялова^{1,2}, В.М. Перельмутер¹

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

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

Введение. Возникновение и прогрессия опухоли во многом связаны с наличием и характером воспалительных процессов в макроорганизме. Различные маркеры провоспалительного статуса, в том числе индексы NLR (neutrophil to lymphocyte ratio), PLR (platelet to lymphocyte ratio), LMR (lymphocyte to monocyte ratio) и др., могут быть использованы для оценки прогноза метастазирования и рецидивирования опухоли.

Задачи исследования. Оценить параметры провоспалительного статуса у пациентов с НМРЛ, получавших и не получавших неоадъювантную ХТ.

Материалы и методы. В исследование включены 33 больных НМРЛ в возрасте от 47 до 68 лет (22 (66,7 %) мужчины и 11 (33,3 %) женщин). Семнадцати (51,5 %) больным была проведена неоадъювантная ХТ. Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая накануне операции и через 3–5 нед после операции. С помощью стандартных гематологических методов оценивали показатели общего анализа крови и лейкоцитарную формулу крови. Проводили расчет значений «воспалительных» индексов NLR, PLR и LMR.

Результаты. Установлено, что у пациентов, не получавших неоадъювантную ХТ, показатели NLR, PLR, оцениваемые в период после операции, оказались выше, а LMR – ниже аналогичных предоперационных параметров ($p = 0,022, 0,008$ и $0,020$ соответственно), в то время как у пациентов, которым проводилась неоадъювантная ХТ, значения «воспалительных» индексов NLR, PLR и LMR до и после операции достоверно не различались ($p > 0,05$). При сравнении дооперационных показателей провоспалительного статуса между группами пациентов, получавших и не получавших неоадъювантную ХТ, достоверных различий выявлено не было ($p > 0,05$). В послеоперационном периоде у пациентов, которым назначалась неоадъювантная ХТ, значения индекса NLR были достоверно ниже, чем у пациентов, не получавших неоадъювантную ХТ ($p = 0,036$), также имелась тенденция к снижению индекса PLR ($p = 0,072$).

Выводы. Полученные данные можно трактовать как аргументы в пользу противовоспалительных эффектов неоадъювантной ХТ.

Работа выполнена в рамках гранта № МД-273.2017.7 Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых.

Феномен циркуляции гибридных опухолевых клеток в крови онкологических больных

О.Е. Савельева¹, Р.Х. Мухамеджанов², Л.А. Таширева¹,
Е.В. Денисов¹, Е.В. Кайгородова¹, М.В. Завьялова^{1,2},
В.М. Перельмутер¹

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

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

Введение. Биологический феномен межклеточно-го слияния при опухолевых процессах по-прежнему является причиной дискуссий и споров. Образование гибридов из опухолевых и нормальных клеток может приводить к усилению метастатического и пролиферативного потенциала опухоли, угнетению апоптоза опухолевых клеток и приобретению ими лекарственной резистентности.

Задачи исследования. Оценить субпопуляционный состав циркулирующих в крови гибридных опухолевых клеток (гЦОК) и его связь с лимфогенным метастазированием.

Материалы и методы. В исследование включены 20 больных НМРЛ и 22 больных инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа (ИКНТ) T1–3N0–3M0. Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая накануне операции. Субпопуляционный состав гЦОК оценивали методом проточной цитометрии с использованием антител к CD45, CK7, CD325 (ErCAM) и CD326 (N-кадгерин).

Результаты. При изучении субпопуляционного состава циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) у больных НМРЛ и ИКНТ кроме «классических» ЦОК мы обнаружили гетерогенную по своему составу популяцию гЦОК, экспрессирующих одновременно лейкоцитарный маркер CD45 и эпителиальные маркеры CK7 и/или ErCAM. В ходе дальнейшего исследования в крови пациентов были выявлены гЦОК на разных этапах эпителиально-мезенхимального перехода. Кроме того, у пациентов с ИКНТ с лимфогенными метастазами было обнаружено значительное увеличение содержания CD45⁺CK7⁻ErCAM⁺ гЦОК как с экспрессией N-кадгерина, так и без таковой по сравнению с пациентами без метастазов ($p = 0,029$ и $0,018$ соответственно).

Выводы. Значительное увеличение содержания CD45⁺CK7⁻ErCAM⁺ гЦОК у пациентов с лимфогенными метастазами позволяет предположить, что данные клетки являются «семенами» для развития лимфогенных метастазов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президента Российской Федерации (грант № МД-273.2017.7).

Проявления эпителиально-мезенхимального перехода при трижды негативном раке молочной железы

С.В. Сазонов^{1,2}, Н.В. Казанцева², К.В. Конышев¹,
С.А. Денисенко²

¹ГАОУ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург;

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург

Тройной негативный подтип (ТНП) РМЖ выявлялся ИГХ-методом путем определения наличия экспрессии к рецепторам эстрогенов, прогестерона, HER2/neu и индекса пролиферации Ki-67. Суррогатное определение ТНП осуществляли по сочетанию характеристик: ER⁻, PR⁻, HER2/neu⁻, Ki-67 любой. ИГХ-исследования проводили с использованием автоматических систем окрашивания Ventana (США) и Dako (Дания).

Исследования PanKeratin проведены в 331 образце ТНП РМЖ. ТНП составил около 5 % всех случаев РМЖ, из них в около 22 % случаев инвазивный компонент опухоли не экспрессировал маркер эпителиальных клеток PanKeratin. При ИГХ-изучении срезов таких опухолей обнаружено, что экспрессия PanKeratin полностью сохранена внутри протоков, опухолевые же клетки в инвазивном компоненте опухоли полностью или частично утрачивают экспрессию PanKeratin. При изучении экспрессии виментина обнаружено, что клетки опухоли, расположенные в протоках и экспрессирующие PanKeratin, не экспрессируют виментин, однако 85 % клеток опухоли в инвазивном компоненте экспрессируют виментин, при этом только 5 % сохраняют экспрессию PanKeratin. Исследование E-кадгеринов показало, что опухолевые клетки внутри протоков сохраняют его мембранную экспрессию, тогда как инвазия клеток за пределы протоков сопровождается ее полной потерей. Экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестерона, HER2/neu не обнаружено ни внутри протоков, ни в инвазивном компоненте. Инвазивный рост опухоли из протока сопровождается появлением у опухолевых клеток признаков, характерных для развития эпителиально-мезенхимального перехода. Контроль реорганизации актинового цитоскелета в ходе миграции опухолевых клеток осуществляет малая ГТФаза RhoA и ее эффектор — киназа ROCK.

Работа выполнена в рамках государственного задания УГМУ № 056-00 151-18-00.

Особенности экспрессии интегрин αv при метастазировании плоскоклеточного рака полости рта в регионарные лимфатические узлы

Г.М. Тугузбаева^{1,2}, В.Н. Павлов¹, Ш.М. Хуснутдинов¹,
Ш.И. Мусин¹, Ю. Нью², Ю. Бай²

¹ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа;

²Харбинский медицинский университет, Харбин, Китай

Введение. Метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов — важный фактор прогноза плоскоклеточного рака полости рта. Интегрины как основные рецепторы клеточной адгезии играют важную роль в процессах канцерогенеза. В частности, повышенная экспрессия интегрин αv обеспечивает усиленную пролиферацию и инвазию клеток плоскоклеточного рака полости рта путем активации MEK/ERK-сигнального пути. Наличие прямой зависимости между уровнем экспрессии интегрин αv и степенью поражения регионарных лимфатических узлов при назофарингеальном и гипофарингеальном раке также свидетельствует о вовлеченности данного рецептора в патогенез карцином области головы и шеи. Однако характер экспрессии αv интегрин при метастазировании плоскоклеточного рака полости рта остается невыясненным.

Задачи исследования. Изучение особенностей экспрессии интегрин αv в первичных опухолях и регионарных метастазах плоскоклеточного рака полости рта.

Материалы и методы. В исследование включены срезы тканей неметастатических опухолей (T1–3N0M0; $n = 15$) и метастатического рака полости рта (T1–3N1–2M0; $n = 15$) с соответствующими метастазами в регионарных лимфатических узлах ($n = 15$). Экспрессия интегрин αv в исследуемых образцах определена в ходе ИГХ-анализа с моноклональными антителами (клон EPR16 800, Abcam). Анализ фотоизображений выполнен с помощью программного обеспечения Image Pro Plus 6.0.

Результаты. Обнаружено значительное повышение экспрессии интегрин αv в тканях метастатического плоскоклеточного рака полости рта по сравнению с неметастатическими образцами ($p < 0,001$). Кроме того, выявлено увеличение уровня αv интегрин в опухолевых клетках регионарных метастазов относительно первичных очагов ($p < 0,05$).

Выводы. Характерное увеличение экспрессии интегрин αv при метастазировании плоскоклеточного рака полости рта свидетельствует о значительной роли этого рецептора в обеспечении инвазивного роста и диссеминации опухоли. Полученные результаты создают предпосылки для исследования терапевтического потенциала ингибиторов αv интегрин при злокачественных новообразованиях челюстно-лицевой области.

Изучение отдаленных последствий ксенотрансплантации опухолевых клеток человека в эмбрионы зебрафиш

О.Ю. Шувалов¹, А.В. Малек², Д.Р. Сафина³,
И.В. Мизгирев²

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

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава
России, Санкт-Петербург;

³ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН», Москва

Введение. Технология ксенотрансплантации опухолевых клеток (ОК) человека в эмбрионы зебрафиш (*D. rerio*) интенсивно развивается в последние годы. Этот подход основан на том, что на ранних стадиях развития из-за незрелости иммунной системы эмбрионов пересаженные трансплантаты не отторгаются организмом реципиента и даже в ряде случаев способны формировать отдаленные метастазы и индуцировать рост кровеносных сосудов. Однако в большинстве работ такие эксперименты заканчивались через 2–3 дня от момента трансплантации, и дальнейшая судьба трансплантатов и реципиентов авторами не прослеживалась.

Задачи исследования. Выяснение отдаленных последствий ксенотрансплантаций ОК в эмбрионы зебрафиш.

Материалы и методы. Исследованы следующие способы введения суспензии клеток карциномы яичника SKOV-3 и карциномы молочной железы MDA-MB-231 человека, меченных флуоресцентными репортерами, в эмбрионы *D. rerio*: трансплантация в желточный мешок эмбрионов в возрасте 48 ч; трансплантация в эмбрионы на стадии бластулы, состоящей из 1000–2000 клеток (возраст 3–5 ч); внутрибрюшинная инъекция личинкам рыб в возрасте 5 дней.

В каждый эмбрион или личинку было инъецировано по 100–200 клеток, содержащихся в объеме 5–10 нл раствора Хенкса.

Результаты. Выявлено, что инъекция ОК личинкам приводит к отторжению и гибели ксенографтов в течение 3 дней. При введении суспензии ОК в желточный мешок наблюдалось постепенное отмирание ксенографтов в течение 5 дней после трансплантации с последующей их элиминацией из организма рыб в процессе адсорбции желточной массы в кишечнике. При этом данный способ введения не оказывал заметного влияния на последующий рост и развитие реципиентов. Создание химерных организмов посредством инъекции ОК в зародыши зебрафиш на стадии бластулы приводило к формированию в процессе развития компактных опухолевых кластеров, локализованных внутри тела эмбрионов и способных к выживанию и росту в организме рыб. Время жизни реципиентов в этой серии экспериментов колебалось от 5 до 14 дней в зависимости от локализации и размера ксенотрансплантатов. Среднее время удвоения интенсивности флуоресценции опухолевых кластеров составляло 8 дней при температуре инкубации 30 °С.

Выводы. Создание химерных эмбрионов зебрафиш на данном этапе наших исследований является единственным методом получения жизнеспособных опухолевых ксенографтов человека, способных относительно долго существовать в организме рыб, сохраняя высокий уровень пролиферативной активности. С другой стороны, учитывая низкую стоимость, легкость масштабирования, а также возможность количественной оценки роста ксенографтов *in vivo*, предложенный подход в перспективе может найти применение в создании технологии персонализированного подбора противоопухолевых препаратов, основанной на трансплантации в эмбрионы рыб опухолевых клеток, полученных от онкологических пациентов.

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Доклады

Молекулярный анализ резистентности клеток аденокарциномы легкого к тирозинкиназным ингибиторам

Н.А. Барлев

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург;
ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт
(государственный университет)», Долгопрудный,
Московская обл.

Терапия пациентов с НМРЛ в случае EGFR дикого типа включает в себя применение моноклонального антитела, сетуксимаба, против этого тирозинкиназного рецептора. Мы разработали нанополимерные частицы, которые обладают не только схожей с антителами специфичностью, но и способны специфически доставлять к раковым клеткам различные генотоксические препараты. В случае приобретения EGFR мутаций обычно применяются ингибиторы тирозинкиназной активности (ТКИ): эрлотиниб, gefatinib и другие. К сожалению, пациенты, которые первоначально реагируют на терапию ТКИ, в конечном итоге приобретают резистентность. В половине случаев резистентность связана с вторичными мутациями в гене *EGFR*, из которых наиболее часто встречается мутация в экзоне 20, приводящая к замене Met790 на Tre в киназном домене.

С помощью геномного редактирования CRISPR/Cas9 мы сконструировали модельную клеточную линию H1299 с мутантным *EGFR* (L858M/M790T) и изучили возможные молекулярные механизмы, отвечающие за возникновение резистентности в клетках НМРЛ к препаратам ТКИ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-15-00816).

Структурно-ориентированный дизайн противоопухолевых соединений на основе 5-цианопиримидина

А.С. Бунев¹, Д.А. Хоченков^{1,2}, Ю.А. Хоченкова²,
Е.В. Степанова²

¹ФГБОУ ВО «Тольяттинский государственный университет», Тольятти;

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

В работе представлены основные результаты молекулярного моделирования, химического синтеза и исследования активности *in vitro* (МТТ, оценка цитотоксичности на микросфероидах опухолевых клеток, исследование клеточного цикла, индукции апоптоза, ИФА EGF/EGFR-зависимого сигнального каскада) комбинаторной библиотеки низкомолекулярных производных 5-цианопиримидина.

Синтез исследуемых соединений осуществлен на основе продуктов трехкомпонентной циклизации *S*-алкилизотиурониевых солей, малондинитрила (или этилцианоацетата) и ароматического альдегида в условиях основного катализа. Полученные производные 5-цианопиримидина в дальнейшем подвергались прямому окислению под действием оксона либо трансформировались в производные 4-амино-5-цианопиримидина с последующим окислением. Разработанный синтетический подход позволяет получать широкий спектр полизамещенных производных пиримидина.

Изучение цитотоксической активности синтезированных соединений методом МТТ-теста показало их высокую токсичность в отношении опухолевых клеточных линий (A431, A549, HCT116, SH-SY5Y, TNP-1 и др.) на уровне EC_{50} 0,29...35 мкМоль \times л⁻¹. Показано значительное снижение экспрессии фосфорилированных сигнальных киназ pEGFR, pAkt, pERK1/2 по отношению к индуцированному EGF контролю

на клеточной линии карциномы A431. Методами молекулярного моделирования продемонстрирована аффинность синтезированных соединений к EGFR дикого типа.

Полученные в данной работе результаты являются отправной точкой по выявлению нового хемотипа противоопухолевых соединений, ориентированных на ингибирование киназного домена рецептора эпидермального фактора роста.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-33-00666 и частично грант № 18-015-00321).

Молекулярные шапероны как адъюванты химиотерапии

И. В. Гужова, А. Д. Никитина, В. Ф. Лазарев,
Д. В. Сверчинский, Е. Ю. Комарова, Б. А. Маргулис
ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Молекулярные шапероны, относящиеся к семейству Hsp70, обеспечивают правильную конформацию и функцию клеточных белков, начиная от транспортировки вновь синтезированных полипептидов к клеточным органеллам и кончая их деградацией протеосомной системой клетки. Основная функция Hsp70 – защитная; повышение уровня шаперона приводит к его вмешательству в регуляцию апоптоза, и при этом гибель клеток может задерживаться на часы и дни. Опухолевые клетки обладают повышенным уровнем метаболизма, находятся в агрессивной среде, образуемой соседствующей тканью, и подвергаются действию противоопухолевой терапии; все эти факторы могут вызывать повышение уровня Hsp70, что, в свою очередь, отрицательно влияет на эффективность противоопухолевой ХТ.

Мы предположили, что ослабление шаперонной системы опухолевой клетки делает их более чувствительными к действию используемых в клинике химиопрепаратов, и провели масштабный скрининг библиотеки малых молекул компании InterBioScreen. Поиск был направлен на выявление молекул, могущих влиять на синтез Hsp70 через подавление фактора его транскрипции или способных инактивировать шаперонную функцию Hsp70. Особое внимание было уделено препаратам, способным нарушать связывание шапероном молекул, участвующих в передаче сигнала в процессе апоптоза. Выявленные препараты были исследованы в клеточных культурах опухолевых клеток и в моделях рака на животных. Ингибиторы Hsp70 эффективно снижали устойчивость опухолевых клеток к действию стандартных химиопрепаратов, таких как этопозид, доксорубин и цисплатин, и увеличивали срок жизни животных на 15–20 %. Существенный недостаток современных препаратов, применяемых для лечения онкологических заболеваний, состоит в наличии побочных

эффектов; применение ингибиторов Hsp70 в комбинации с этими препаратами позволит существенно снизить их терапевтическую дозу без ущерба эффективности.

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

PF-114 – новый ингибитор тирозинкиназы BCR-ABL для терапии хронического миелоидного лейкоза

Е. С. Иванова¹, В. В. Татарский¹, М. А. Ястребова²,
А. И. Хамидулина³, А. А. Зейфман⁴, Ф. Н. Новиков⁴,
Г. Г. Чиров⁴, А. А. Штиль¹

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

²ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

³биологический факультет ФГБОУ ВО «МГУ
им. М. В. Ломоносова», Москва;

⁴ООО «Фьюжн Фарма», Москва

Одна из проблем лечения хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ) – недостаточная эффективность ингибиторов тирозинкиназы Bcr-Abl. С использованием молекулярного моделирования создан новый ингибитор PF-114, показавший эффективность в доклинических испытаниях при мутациях Abl.

Задачи исследования. Изучение механизмов гибели клеток ХМЛ (линия K562) при действии PF-114. Установлено, что гибель клеток K562 вызывается наномолярными концентрациями ингибитора. Для Bcr-Abl-негативных лейкозов PF-114 значительно менее активен. PF-114 вызывает снижение доли клеток с фосфорилированным адапторным белком CtkL – субстратом Bcr-Abl. В первые 24 ч PF-114 вызывает блок клеточного цикла в фазе G1, снижение активности митогенактивируемых протеинкиназ, нарушение фосфорилирования транскрипционных факторов семейства STAT, дефосфорилирование проапоптотического белка Bad и других митохондриальных белков. Доля клеток, теряющих электрический трансмембранный потенциал митохондрий, увеличивается к 48 ч, одновременно нарастает доля Аннексин-V-положительных клеток. Через 48 ч регистрировали активацию каспаз 3 и 9 и протеолиз поли(АДФРибоза)полимеразы. События, вызванные PF-114, завершаются межнуклеосомной фрагментацией ДНК. Таким образом, инактивация тирозинкиназы Bcr-Abl новым ингибитором PF-114 вызывает многочисленные нарушения внутриклеточного сигналинга, завершающиеся апоптотической гибелью. Эти механизмы значительно менее выражены при повышении концентрации клеток в культуре: активируются факторы ограничения гибели.

Работа поддержана грантом Минобрнауки Российской Федерации (Соглашение 14. W03.31.002 с Институтом биологии гена РАН).

Перспективные молекулярные мишени для создания онколитиков на основе сигнальных каскадов Ras-белков

С.Г. Клочков, М.Е. Неганова

ФГБУН «Институт физиологически активных веществ РАН», Черноголовка, Московская обл.

Онкологические заболевания являются одними из наиболее значимых патологий. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, к 2030 г. количество новых случаев онкологических заболеваний возрастет примерно на 70 %, достигнув цифры 21,6 млн в год. Поэтому разработка эффективных противоопухолевых препаратов считается одной из приоритетных задач современного здравоохранения. Для ХТ опухолей используются ингибиторы белков, ферментов, рецепторов, регулирующих сигнальные пути опухолевых клеток, индукторы апоптоза. Одни из наиболее многообещающих и изучаемых сигнальных путей – это пути Raf/MEK/ERK и фосфоинозитол-3-киназы (PI-3K) (Jiang K. et al., 2000). Изменения в каскадах этих путей ведут к модуляции многих клеточных функций – роста и выживания клетки, пролиферации, дифференциации, адгезии. Эти сигнальные каскады тесно связаны с RAS-белками. Онкогенные формы RAS-белков детектируются в большом числе опухолевых заболеваний – более 30 % всех форм новообразований (Bos J.L., 1989). В настоящей работе рассмотрены ключевые этапы сигнальных каскадов, инициируемых онкогенными белками RAS, проанализированы особенности процессинга RAS-белков. Показана возможность их использования как перспективных молекулярных мишеней для разработки противоопухолевых препаратов. Приведены и обсуждены как литературные, так и собственные данные о новых стратегиях поиска эффективных антинеопластов на основе сигнальных путей RAS-белков и бифармакофорных соединениях.

Работа выполнена в рамках Госзадания 0090-2017-0018.

Цитотоксические и цитостатические эффекты воздействия на PRAME-экспрессирующую опухолевую клетку

В.А. Мисюрин¹, А.Е. Мисюрина², Д.В. Калениченко³, А.А. Рудакова¹, В.В. Тихонова¹, Ю.П. Финашутина¹, Н.А. Лыжко¹, О.В. Солопова¹, М.А. Барышникова¹, А.В. Мисюрин¹

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

²ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва;

³ФГБОУ ВО «МГАВМиБ-МВА им. К.И. Скрябина», Москва

Введение. Согласно многочисленным свидетельствам, наличие раково-тестикулярного белка PRAME в опухолевой клетке снижает ее чувствительность к химиопрепаратам, стимулирует пролиферацию, блокирует апоптоз и дифференцировку. На уровне организма это связано с ухудшением параметров выживаемости больных онкологическими заболеваниями. Функции белка PRAME тесно связаны с активностью протеасом, которые можно ингибировать.

Задачи исследования. Разработать новые подходы к терапии PRAME-позитивных онкологических заболеваний.

Материалы и методы. Анализ последовательности промотора гена *PRAME* для поиска транскрипционных факторов, активирующих его. Применение бортезомиба в сочетании с другими химиопрепаратами для блокирования функций белка PRAME. Создание антител для связывания с белком PRAME, локализованным на внешней мембране. RQ-ПЦР для оценки уровня экспрессии генов и МТТ-тест для определения цитотоксичности. Анализ данных проводился при помощи критерия Манна–Уитни.

Результаты. Установлено, что в активации гена *PRAME* значимы транскрипционные факторы PHF8 и CTCFL. Нокаут гена *PHF8* привел к падению уровня экспрессии *PRAME*, что сопровождалось снижением скорости роста клеток меланомы A875. Бортезомиб позволил снизить активность белка PRAME и сделал клетки A875 более чувствительными к цисплатину и паклитакселу. Мышиные моноклональные антитела не только связывались с поверхностью PRAME-позитивных клеток линий K562 и HT29, но и обладали цитостатической активностью.

Заключение. Нам удалось показать возможность терапии PRAME-экспрессирующих онкологических заболеваний посредством снижения уровня экспрессии гена *PRAME* при помощи нокаута его активатора PHF8, блокирования функций белка PRAME при помощи бортезомиба, а также применения антител, связывающихся с поверхностью опухолевой клетки.

Ингибирование REDD1 для повышения безопасности и эффективности глюкокортикоидной терапии злокачественных новообразований кроветворной системы

А.В. Савинкова¹, Е.С. Лылова², Л.Р. Тилова¹, К.А. Кузин¹,
О.В. Морозова¹, К.И. Кирсанов¹, А.А. Борунова¹,
Т.Н. Заботина¹, М.Г. Якубовская¹, И.В. Будунова³,
Е.А. Лесовая^{1,4}

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

²ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва;

³Northwestern University, Chicago, IL, USA;

⁴ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет Минздрава России им. акад. И.П. Павлова», Рязань

Глюкокортикоиды (GC) широко используются в терапии злокачественных новообразований системы крови. Однако их использование сопряжено с развитием побочных эффектов. Действие GC реализуется посредством активации глюкокортикоидного рецептора (GR). Побочные эффекты обусловлены индукцией трансактивации GR, в то время как терапевтическое действие опосредовано запуском трансрепрессии. Показано, что GC-зависимый ген *REDD1* обуславливает развитие осложнений при применении GC, в связи с этим актуальным является поиск ингибиторов *REDD1*. Поиск ингибиторов *REDD1* был осуществлен с помощью биоинформатического скрининга базы данных LINCS. Было отобрано 3 потенциальных ингибитора *REDD1*, модуляторы сигнального пути PI3K/Akt/mTOR Wortmannin, LY294002 и AZD8055.

Задачи исследования. Оценка возможности использования данных соединений в терапии гемобластозов для повышения ее безопасности и эффективности.

Было показано, что цитотоксический эффект дексаметазона (Dex) не снижается при комбинации с данными соединениями, для LY294002 и Dex был показан синергизм цитотоксического действия, что согласовалось с индукцией апоптоза. Подавление базальной и Dex-индуцированной экспрессии *REDD1* наблюдали после обработки всеми исследуемыми соединениями на уровне белка и мРНК. Все соединения подавляли фосфорилирование GR и его ядерную транслокацию, снижали степень запуска трансактивации, не затрагивая или усиливая трансреессию. LY294002 подавлял рост ксенографтов лимфомы *in vivo*. Снижение побочных эффектов Dex при комбинации с LY294002 показано на модели GC-индуцированного остеопороза *in vivo*.

Таким образом, данная работа подтверждает гипотезу об ингибировании *REDD1* как способа подавления развития побочных эффектов GC.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-75-20 124).

Новый ингибитор блокирует взаимодействия MYC с ремоделирующим комплексом PBAF

Н.В. Сошникова¹, В.В. Татарский^{1,2}, С.Г. Георгиева¹

¹ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

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

Повышенная экспрессия онкогена сMYC наблюдается во многих онкотрансформированных клетках и часто является причиной быстрого развития опухолей и их метастазирования. Как транскрипционный фактор сMYC стимулирует транскрипцию многих генов пролиферации и ингибирует гены-блокаторы прогрессии клеточного цикла. При активации сMYC и транслокации в ядро сMYC взаимодействует с MAX кофактором, привлекая большое количество белковых комплексов, которые осуществляют разнообразные процессы, приводящие в результате к транскрипции сMYC-зависимых генов.

В нашей работе мы изучили действие нового ингибитора сMYC, который был выделен из библиотеки химических соединений как соединение, блокирующее активность сMYC активатора. Данное химическое соединение не связывается с ДНК и приводит лишь к незначительному накоплению белков-маркеров двуцепочечных разрывов. При обработке данным ингибитором клеточных линий меланом, экспрессирующих большое количество сMYC, мы наблюдали остановку пролиферации и блок в G1/G0 у данных линий.

При дальнейшем изучении механизма действия данного ингибитора мы установили, что он существенно снижает взаимодействия между активатором сMYC и субъединицами PBAF ремоделирующего хроматин комплекса. При этом взаимодействия между сMYC и остальными коактиваторными комплексами не разрушаются. В клеточных линиях меланомы при нокдауне сMYC и при обработке ингибитором процент перекрывающихся ингибирующихся генов составил 72,1 %, а увеличивающих свою экспрессию – 47,1 %.

Таким образом, мы описали новое химическое соединение, блокирующее взаимодействия между онкогеном сMYC и ремоделирующим хроматин комплексом PBAF, что приводит к ингибированию транскрипции генов пролиферации и остановки прогрессии клеточного цикла.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 1754–33 031).

Протеинкиназы семейств DYRK и CLK как новые противоопухолевые мишени

В.В. Татарский¹, М.А. Ястребова², К.А. Демина³,
А.И. Хамидуллина², Л.Г. Деженкова⁴, Д.Н. Калюжный⁵,
А.А. Штиль¹

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

²ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

³ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

⁴ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

⁵ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Протеинкиназы семейств DYRK (dual-specificity tyrosine-regulated kinases) и Clk (CDC-like kinases) регулируют ряд важных функций опухолевых клеток: выживание, сплайсинг РНК, клеточный цикл. Для оценки перспективности этих протеинкиназ как мишеней противоопухолевой терапии синтезированы новые производные пиридо[3,4-*g*]хиназолонов. В бесклеточных системах показано ингибирование DYRK1A, -B, -2 и Clk1 лидерным соединением **1** в наномолярных концентрациях. Соединение **1** вызывает гибель ряда линий опухолевых клеток по механизму апоптоза, независимо от статуса p53. Гибели предшествует накопление клеток в фазе G2, затем выявляется нарушение целостности ДНК (фрагментация). Задержка в G2 подтверждается дозозависимым ингибированием фосфорилирования гистона 3 по остаткам серина-10 и треонина-3, что не позволяет клеткам войти в митоз. Неожиданным оказалось быстрое (в течение 30–60 мин воздействия **1**) повреждение ДНК, выявляемое по фосфорилированию белков ATM, BRCA1 и Chk2. Повышается фосфорилирование гистона H2X по остаткам серина и треонина – маркер повреждения ДНК. Активация этого ответа происходит через протеинкиназу ATM и ингибирование активности ATM, но не функционально схожей протеинкиназы ATR, предотвращает развитие ответа клеток на генотоксический стресс. Развитие этого ответа не обусловлено непосредственным взаимодействием **1** с ДНК, ингибированием топоизомеразы I или генерацией реактивных форм кислорода. Рассматриваются возможные механизмы повреждения ДНК и цитотоксичности при ингибировании активности протеинкиназ DYRK1A, -B, -2 и Clk1.

Авторы благодарны P. Moreau и Y. Esvan (Université Auvergne, Франция) за предоставление соединения **1**. Работа поддержана грантом Минобрнауки России (Договор 14. W03.31.002 с Институтом биологии гена РАН).

Механизмы противоопухолевой активности новых селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора на моделях гемобластозов

Л.Р. Тилова¹, Т.И. Фетисов¹, А.В. Савинкова¹,
Е.М. Жидкова¹, Е.С. Лылова², К.И. Кирсанов^{1,3},
А.А. Калинина¹, Г.А. Белицкий¹, М.Г. Якубовская¹,
В.З. Ширинян⁴, Е.А. Лесовая^{1,5}

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

²ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический
университет», Москва;

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»,
Москва;

⁴ФГБУН «Институт органической химии
им. Н.Д. Зелинского РАН», Москва;

⁵ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский
университет Минздрава России им. акад. И.П. Павлова», Рязань

Глюкокортикоиды (ГС) включены в большинство протоколов ХТ гемобластозов, однако их длительное применение вызывает развитие серьезных побочных эффектов. Биологическое действие ГС реализуется посредством активации глюкокортикоидного рецептора (GR), регулирующего экспрессию генов путем трансактивации (TA), обуславливающей развитие нежелательных осложнений, и транскрепрессии (TR), ассоциированной с терапевтическим эффектом. Селективные агонисты GR (SEGRA), избирательно запускающие TR, представляют собой более перспективный аналог для терапии. К классу SEGRA относится 2-(4-ацетоксифенил)-2-хлор-N-метиламмоний хлорид, или CpдA. Его противоопухолевая активность была описана на моделях гемобластозов *in vitro* и *in vivo*. В представленной работе нами был расширен список потенциальных SEGRA за счет синтеза оптических изомеров CpдA, а также химических производных данного соединения.

В отношении энантиомеров CpдA гипотеза о том, что оптические изомеры проявляют различные эффекты в биологических системах, подтверждена не была. Антипролиферативные и проапоптотические эффекты оптических изомеров CpдA, а также их влияние на TR и TA сопоставимы с подобными эффектами ГС и исходного рацемата. В отношении химических производных CpдA для CpдA-03 было показано, что он обладает аффинностью к GR, сопоставимой с аффинностью CpдA. Действие на пролиферацию, индукцию апоптоза, TA и TR было сопоставимым или превышало эффекты ГС и CpдA. Другие соединения были менее активны. Противоопухолевая активность CpдA-03 была продемонстрирована *in vivo* на модели лимфолейкоза P388 у мышей, что делает его перспективным для дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-75-20 124).

Исследование комбинированного действия паклитаксела и рапамицина на модели перевиваемой опухоли Эрлиха

М.Н. Юрова, М.Л. Тындык, Е.А. Губарева

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Увеличение эффективности современного химиотерапевтического лечения, в том числе за счет снижения чувствительности здоровых тканей к противоопухолевым агентам, является актуальной задачей современной онкофармакологии. Химиопротекция может быть достигнута путем избирательного индуцирования кратковременного ареста клеточного цикла в здоровых клетках с помощью ингибиторов пролиферативного сигнала. Целью данной работы стало исследование противоопухолевого и цитопротекторного эффекта ингибитора mTOR рапамицина (RAP) в сочетании с химиотерапевтическим препаратом паклитакселом (PAC) на модели перевиваемой солидной карциномы Эрлиха.

Самцам мышей 129/Sv с подкожным опухолевым узлом перевивной солидной карциномы Эрлиха диаметром 0,5 см² внутрибрюшинно вводили RAP (в дозе 0,45 мг/кг через день), PAC (в дозе 0,75 мг/кг 2 раза в неделю), комбинацию этих препаратов или воду для инъекций (контроль). Эффективность противо-

опухолевой терапии оценивалась по торможению роста опухолевого узла. На 28-й день эксперимента животные были подвергнуты эвтаназии с последующей аутопсией и гистологическим исследованием тканей. Для определения уровня токсичности терапии на гистологических препаратах тощей кишки, окрашенных гематоксилин-эозином, подсчитывали число апоптотических клеток в 50 продольно срезанных криптах.

Изучение динамики роста опухолей на месте перевивки показало, что наибольший прирост объема опухолей наблюдался у мышей контрольной группы. На протяжении всего эксперимента исследуемые препараты оказывали выраженное противоопухолевое действие, тормозя прирост опухолевого узла: в группе, получавшей PAC, на 14–53 %; RAP – на 25–58 %; сочетание RAP + PAC – на 30–73 % ($p < 0,05$ на 25-е сутки опыта).

Введение PAC оказывало выраженный токсический эффект, существенно увеличивая число апоптотических клеток в криптах тощей кишки мышей по сравнению с контролем ($1,2 \pm 0,07$ и $0,4 \pm 0,04$ соответственно, $p < 0,05$). RAP значительно снижал уровень токсичности PAC, достоверно снижая уровень апоптоза в криптах тощей кишки ($0,6 \pm 0,05$).

Таким образом, добавление RAP к терапии PAC оказывало протективное действие на здоровые клетки тощей кишки, усиливая противоопухолевый эффект химиотерапевтического препарата на модели перевивной карциномы Эрлиха.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-75-10112).

Постеры

Фторированные фотосенсибилизаторы хлоринового ряда в составе перфторуглеродной эмульсии вызывают некроз в гипоксии и нормоксии

А.Н. Агаева¹, Б.В. Махмудова¹, А.А. Маркова²,
Е.В. Беляева², С.В. Курков³, Н.Д. Чкаников², А.А. Штиль⁴

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

²ФГБУН «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН», Москва;

³ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Долгопрудный, Московская обл.;

⁴ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Для повышения эффективности фотодинамической терапии (ФДТ) и создания принципиальной возможности применения ФДТ в гипоксии разработаны эмульсии перфторуглеродов с фторированными хлоринами. Для введения фотосенсибилизатора в состав перфторуглеродной эмульсии, обладающей высокой способностью растворять кислород, синтезированы симметричные хлорины с перфторуглеродными заместителями ($-C_2F_5$, $-C_4F_9$, $-C_6F_{13}$), присоединенными к четырем мезо-положениям через (тетрафторфенокси)метиленовый спейсер. Повышение содержания кислорода в системе увеличивает эффективность ФДТ.

Показано, что фторхлорины в составе перфторуглеродных эмульсий обладают повышенной фотоиндуцированной цитотоксичностью по сравнению с фторхлоринами в свободном виде в субмикромольных концентрациях (темновая цитотоксичность при инкубации 72 ч отсутствует). Этот эффект показан на клетках различного тканевого происхождения, в том числе резистентных к химиопрепаратам: HCT116 (колоректальная карцинома), MCF7 (карцинома молочной железы), SKOV3 (карцинома яичника), HCT116-/- (колоректальная карцинома с двойным нокаутом p53), MCF7 dox (карцинома молочной железы, устойчивая к доксорубину), SKOV3 PT (карцинома яичника, устойчивая к цисплатину). Инкубированные в течение 24 ч с фотосенсибилизаторами клетки после освещения в нормоксии и в гипоксии (0,5 % кислорода) гибли по механизму некроза, опосредованного образованием супероксид-аниона и перекисным окислением липидов мембран. Фотосенсибилизаторы в составе перфторуглеродных эмульсий активнее, чем

в свободном виде. Эмульсии, в отличие от свободных фотосенсибилизаторов, фотоактивны в гипоксии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-315-00432).

Противоопухолевый цитокин TRAIL DR5-B V114C-Cy3 индуцирует гибель клеток колоректальной карциномы

Т.В. Балабанова¹, А.В. Яголович^{1,2}

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академ. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;

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

Ранее был получен противоопухолевый рецептор-специфичный мутантный вариант TRAIL DR5-B с повышенной аффинностью к рецептору смерти DR5, способный индуцировать апоптоз в опухолевых клетках более эффективно по сравнению с TRAIL дикого типа. На его основе был получен мутантный вариант DR5-B/V114C для конъюгации с малеимидной группой различных соединений, а также флуоресцентно меченный вариант DR5-B/V114C-Cy3 для исследования процесса связывания белка с рецептором на поверхности опухолевых клеток.

В данной работе исследована противоопухолевая активность мутантных вариантов DR5-B/V114C и DR5-B/V114C-Cy3 на линиях опухолевых клеток колоректальных карцином HCT116, HT29 и CaCo-2. Варианты DR5-B/V114C и DR5-B/V114C-Cy3 эффективно индуцировали клеточную гибель во всех трех линиях, проявив цитотоксичность, аналогичную цитокину DR5-B. Таким образом, модификация V114C на N-конце, а также присоединение флуоресцентной метки Cy3 не снизили цитотоксическую активность цитокина DR5-B. Варианты цитокина TRAIL DR5-B/V114C и DR5-B/V114C-Cy3 могут использоваться для разработки новых противоопухолевых препаратов на основе конъюгатов с наночастицами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-34-00812).

***In silico* высокопроизводительный молекулярный скрининг для поиска новых хемотипов ингибиторов EGFR^{C797S}**

А.С. Бунев¹, Д.А. Хоченков^{1,2}, Ю.А. Хоченкова²,
Е.В. Степанова²

¹ФГБОУ ВО «Тольяттинский государственный университет», Тольятти;

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

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) является одной из наиболее важных рецепторных протеинкиназ, участвующих в основных процессах жизнедеятельности клеток: клеточной пролиферации, процессах адгезии и миграции, защиты от апоптоза. Нарушение регуляции EGFR-зависимых сигнальных путей способствует развитию опухолевых процессов, включая ангиогенез и метастазирование при НКРЛ, колоректальном раке и РМЖ. Несмотря на достигнутые успехи в создании и применении таргетных ингибиторов EGFR остается проблема разработки высоко-селективных ингибиторов мутантных форм EGFR, в особенности развивающихся в ходе вторичной резистентности. Учитывая высокую финансовую стоимость широкомасштабного синтеза больших комбинаторных библиотек низкомолекулярных органических соединений и *in vitro* высокопроизводительного скрининга, представляется актуальным использование компьютерного моделирования для поиска и отбора новых хемотипов ингибиторов EGFR.

В представленной работе обобщены результаты по высокопроизводительному молекулярному докингу пятимиллионной библиотеки низкомолекулярных органических соединений из базы данных ZINC в отношении киназного домена рецептора эпидермального фактора роста, несущего мутацию C797S. С применением оригинального алгоритма *Glide* выявлено более пяти перспективных хемотипов ингибиторов, показывающих высокую аффинность к АТФ-сайту связывания киназы и рекомендованных к синтезу и скринингу *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-015-00321).

Молекулярные механизмы противоопухолевого действия антрафуранкарбоксамидов: различие свойств при сходстве структуры

Ю.Л. Володина¹, Л.Г. Деженкова², А.С. Тихомиров²,
А.К. Исагулиева¹, В.В. Татарский¹, Д.Н. Каложный³,
В.Б. Цветков⁴, А.М. Мойсенович⁵, М.М. Мойсенович⁵,
А.Е. Щекотихин², А.А. Штиль¹

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

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

³ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

⁴ФГБУН «Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН», Москва;

⁵ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Производные антрахинона — важный класс противоопухолевых препаратов. В НИИНА им. Г.Ф. Гаузе получены серии антрафуран-2- и 3-карбоксамидов, высоко активных в отношении различных линий опухолевых клеток, в т. ч. устойчивых к ряду химиопрепаратов. Исследование производных антрафуран-3-карбоксамидов ЛХТА-2181 и антрафуран-2-карбоксамидов ЛХТА-2277 и ЛХТА-2278, различающихся положением амидного фрагмента и пространственным расположением заместителей боковой цепи, соответственно, показало, что при сходстве структуры механизмы цитотоксичности различны и зависят от положения боковой цепи, а не от ее стереохимии. Так, ЛХТА-2181 вызывает гибель всех исследованных линий, а 2-изомеры — только суспензионных (гемобласты, асцитная карцинома Эрлиха). Также наблюдаются различия во внутриклеточном распределении соединений. Аффинность ЛХТА-2181 к двухцепочечной ДНК на порядок выше, чем у обоих 2-карбоксамидов, при этом ЛХТА-2277 и ЛХТА-2278 более эффективны в ингибировании топоизомеразы I в диапазоне концентраций 0,5–10 мкМ. Конечный механизм гибели клеток при действии каждого соединения — апоптоз, однако пути его инициации и реализации неодинаковы: ЛХТА-2181 вызывает повреждения ДНК, репликационный стресс и G2-арест, тогда как ЛХТА-2277 и ЛХТА-2278 практически не повреждают ДНК и тормозят клеточный цикл в фазе G1. Таким образом, антрафуранкарбоксамиды перспективны в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов; установление взаимосвязей «структура—активность» позволяет создавать близкие по структуре производные с разными механизмами действия.

Исследование проведено при частичной финансовой поддержке РФФИ и ДНТ в рамках научного проекта № 17-53-45 105 ИИД_а.

Молекулярные механизмы противоопухолевой активности производных N-гликозидов индолокарбазолов ЛХС-1208 и ЛХС-1269

Р.Г. Зенков¹, Т.И. Фетисов¹, Л.В. Эктова¹, В.А. Еремина¹,
О.В. Морозова¹, М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,2}

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

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Введение. Производные индолокарбазолов представляют интерес как источник потенциальных противоопухолевых препаратов. Некоторые соединения данной группы достигли клинических испытаний или применяются в терапии злокачественных новообразований. Новые вещества этого класса, ЛХС-1208 и ЛХС-1269, были синтезированы в лаборатории химического синтеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Они показали высокую противоопухолевую активность и низкую токсичность в доклинических исследованиях. Однако молекулярные основы действия этих агентов остаются малоизученными.

Задачи исследования. Определение молекулярных механизмов противоопухолевой активности производных индолокарбазолов ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

Материалы и методы. Цитотоксическую активность соединений исследовали с помощью метода МТТ на 7 адгезионных (MCF-7, HT29, HepG2, U251, A549, PC-3, HaCaT) и 4 суспензионных (CCRF CEM, K562, KG-1, Granta-519) линиях опухолевых клеток человека. Способность веществ образовывать комплексы с молекулами ДНК и характер связывания определяли двумя способами: по изменению электрофоретической подвижности ДНК в агарозном геле, а также методом кругового дихроизма в холестерических жидкокристаллических дисперсиях (КД-ХЖКД). Сиквенс-специфичность связывания ЛХС-1208 и ЛХС-1269 исследовали с помощью ДНК-футпринтинга. Влияние на каталитическую активность топоизомераз I и II человека изучали путем электрофоретического разделения продуктов реакции релаксации плазмидной ДНК.

Результаты. МТТ-тест ЛХС-1208 и ЛХС-1269 показал, что соединения цитотоксичны в отношении всех клеточных линий. Причем ЛХС-1208 демонстрирует более высокую активность. С помощью метода КД-ХЖКД было выявлено, что оба вещества обладают способностью связываться с ДНК, при этом ЛХС-1208 интеркалирует между парами оснований макромолекулы. О взаимодействии ЛХС-1208 с ДНК также свидетельствовали данные анализа влияния соединения на электрофоретическую подвижность ДНК. Футпринтинг ДНКазой I комплексов ДНК

с ЛХС-1208/ЛХС-1269 не выявил сиквенс-специфичности связывания исследуемых соединений с макромолекулой. Мы продемонстрировали, что ЛХС-1208 обладает способностью ингибировать топоизомеразы I и топоизомеразы II *in vitro*, тогда как ЛХС-1269 в данных тестах неактивен.

Выводы. Полученные в нашей работе данные указывают на то, что как ЛХС-1208, так и ЛХС-1269 обладают сродством к ДНК. В основе механизма противоопухолевого действия ЛХС-1208, по всей видимости, лежит его способность ингибировать ферменты метаболизма нуклеиновых кислот – топоизомеразы I и II. Высокая цитотоксическая активность ЛХС-1269 относительно 11 опухолевых клеточных линий и результаты ранее проведенных экспериментов *in vivo* свидетельствуют о высокой противоопухолевой активности данной молекулы, однако конкретные молекулярные мишени ЛХС-1269 в рамках данного исследования выявить не удалось.

Предикция эффективности химиолучевой терапии онкологических больных на основании радиочувствительности ДНК крови

С.Д. Иванов¹, Л.И. Корытова²

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

²ФГБУ «РНЦРХТ им. акад. А.М. Гранова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Задачи исследования. Апробация технологии краткосрочного определения уровня радиочувствительности (РЧ) ДНК крови как предсказательного показателя эффективности лучевой (ЛТ) и химиолучевой (ХЛТ) терапии онкологических больных.

Материалы и методы. Исследованы больные РМЖ ($n = 57$), раком поджелудочной железы ($n = 10$), мочевого пузыря ($n = 55$) и мультиформными глиобластомами ($n = 54$), получавшие стандартные режимы ЛТ и ХЛТ. Уровень РЧ ДНК нуклеоидов крови (S-индекс), определенный до начала лечения больных после тест-облучения пробы крови *ex vivo* и последующей ее инкубации в течение 3 ч (Иванов С.Д. и др., 2008) был сопоставлен с общей выживаемостью или длительностью безрецидивного периода пациентов до 10 лет после окончания терапии.

Результаты. Вариации S-индекса взаимосвязаны с изменениями числа дицентриков и кольцевых хромосом, но определение биохимического показателя осуществляется гораздо быстрее и проще, чем цитогенетического, что позволило успешно применить его в клинике. В результате проведенных испытаний показано, что продолжительности общей выживаемости

или безрецидивного периода у радиочувствительных пациентов (S-индекс >1,0) были в 1,5–2 раза больше, чем у радиорезистентных (в абсолютном выражении это увеличение составило 5–32 мес в зависимости от локализации опухоли). Для радиорезистентных лиц целесообразно применять радиосенсибилизаторы или использовать другую тактику лечения.

Выводы. Разработанный показатель РЧ ДНК крови позволяет планировать индивидуально более эффективный режим лечения, включающий ЛТ. Полученные нами результаты и данные литературы свидетельствуют о том, что в перспективе такой подход может быть использован в качестве предиктивного показателя не только для ЛТ и некоторых стандартных схем ХЛТ, но и для ХТ.

Исследование сесквитерпеновых лактонов растений рода *Inula* как источника потенциальных онколитиков

С.Г. Клочков, М.Е. Неганова, С.А. Пухов, Л.В. Аникина, С.В. Афанасьева

ФГБУН «Институт физиологически активных веществ РАН», Черногловка, Московская обл.

Растения семейства *Asteraceae* активно используются в народной медицине разных стран для лечения широкого спектра заболеваний, в том числе онкологических. В основном их активность связана с накоплением вторичных метаболитов — сесквитерпеновых лактонов (Zhang et al., 2005). Эти соединения рассматриваются в качестве перспективных скаффолдов для разработки онколитиков ввиду их активности, высокого содержания в растениях и легкости культивирования растений семейства *Asteraceae* (Bai et al., 2006).

В настоящей работе исследован химический состав растений рода *Inula* (девясил): *I. britannica* L., *I. caspica* L., *I. hirta* L., *I. helenium* L., *I. oculus-christi* L., *I. salicina* L. Было выделено более 20 лактонов, содержание некоторых из них достигало 6 % от сухого веса. Для расширения библиотеки сесквитерпеновых лактонов получены как их модифицированные скаффолды, так и различные конъюгаты с фармакофорными аминами и фрагментами известных лекарственных препаратов. Выделенные и синтезированные соединения исследовали на наличие антипролиферативной активности на панели опухолевых клеток с использованием МТТ-теста (для суспензионных культур использовали Alamar Blue). Были выявлены соединения с цитотоксичностью на уровне 10^{-7} – 10^{-8} М.

Одним из механизмов противоопухолевого действия сесквитерпеновых лактонов является инициация

апоптоза вследствие ингибирования фермента фарнезилтрансферазы. Ряд синтезированных гибридных молекул показал достаточно высокую ингибирующую активность в отношении данного фермента — на уровне 0,3–5 μ М. Кроме того, наиболее активные соединения не только останавливают клеточный цикл опухолевых линий в G2/M фазе, но и влияют на процессы сборки-разборки тубулина и формирования актинового цитоскелета клеток. Высокий уровень цитотоксичности и наличие специфических молекулярных мишеней у данных соединений позволяют использовать уникальные природные скаффолды — сесквитерпеновые лактоны растений рода *Inula* — в качестве основы для разработки эффективных антинеопластов.

Работа выполнена в рамках Госзадания 0090-2017-0018.

Фолатные липосомы для адресной доставки противораковых лекарств, полученные методом пост-модификации

О.О. Колоскова¹, А.Ю. Сапач², А.М. Гилева², Е.А. Марквичева²

¹ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Системы адресной доставки противораковых препаратов позволяют свести к минимуму побочные эффекты ХТ. Однако получение таких систем затруднено сложным и дорогим производством, а также недостаточной универсальностью многих векторных молекул, подходящих для лечения только определенных видов опухолей.

В данной работе в качестве модельного лиганда был выбран остаток фолиевой кислоты. Было предложено два метода получения фолат-ассоциированных (ФА) — липосом для адресной доставки доксорубина. Первый — традиционный метод тонкой пленки (МТП), основанный на гидратации тонкой пленки, в которой используется смесь обычных (без лигандов) и ФА-липидов (98:2, % масс). При этом часть лигандов может попадать во внутреннюю полость липосомы, уменьшая полезный внутренний объем. Второй подход — новый метод постмодификации (МПМ), в котором на первой стадии происходит формирование универсальных «базовых» липосом, загруженных препаратом, а уже затем — модификация их поверхности молекулами лиганда.

Исследование физико-химических свойств ФА-липосом показало, что использование МПМ позволяет уменьшить средний размер липосом с 238 до 135 нм, но не влияет на величину ζ -потенциала (+51 и +47 мВ для МПМ и МТП соответственно).

Поскольку ФА-липосомы рассматриваются как потенциальные носители для адресной доставки, наибольший интерес представляет система с min диаметром и max ζ -потенциалом, т.е. образец липосом, полученный МПМ. Данный образец был более эффективным по сравнению с ФА-липосомами, полученными МТП, при тестировании на модельной опухолевой линии клеток HeLa (МТТ-тест).

Таким образом, было предложено два подхода к получению ФА-липосом. Было показано, что липосомы, полученные МПМ, имели меньший средний диаметр и больший ζ , а также имели больший цитотоксический эффект, чем липосомы, полученные традиционным МТП. МПМ позволяет получать универсальные липосомы, а затем модифицировать их поверхность молекулами, отвечающими конкретным терапевтическим задачам.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-34-00919).

Пептидные лиганды нуклеолина и нуклеофозмина как неспецифичные индукторы гибели опухолевых клеток

А.А. Лушникова¹, Д.А. Понкратова¹, А.В. Костарев²,
С.М. Андреев³, К.В. Кожихова³, А.А. Рудакова¹,
Л.Ф. Морозова¹, А.М. Строганова¹, О.С. Бузова¹,
М.А. Барышникова¹

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

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

³ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Большинство злокачественных опухолей человека с поздней манифестацией заболевания и метастазами устойчивы к стандартной ХТ. Разработка молекулярно нацеленных препаратов с высокой активностью в отношении таких опухолей и с низкой токсичностью для организма — актуальная проблема современной онкологии. Ранее мы исследовали ряд катионных пептидов (КП) с молекулярной массой 1–2,5 кДа и зарядом от +4 до +16, которые не токсичны для нормальных клеток. Эти КП легко проникают в клетки, устойчивы к внутриклеточной деградации и перспективны для внутриклеточного транспорта биомолекул в форме комплексов КП-аптамер, КП-химиопрепарат и т.д. Потенциальные мишени для КП — молекулы рецепторного нуклеолина/NCL, гиперэкспрессированные на поверхности клеток в большинстве опухолей, а также ядерные фракции NCL и нуклеофозмина/NPM, взаимодействующие с множеством лигандов. Эти шаперонные белки регулируют ключевые клеточные функции, включая пролиферацию и апоптоз. Рецепторный NCL рассматривается как маркер для ранней неинвазивной

диагностики рака, а также как мишень для доставки в опухоль химиотерапевтических препаратов и тканеспецифического ингибирования роста опухолей. На панели линий опухолевых клеток различного происхождения показана высокая избирательная цитотоксичность ряда КП, обусловленная p53-зависимым апоптозом. Тестируемые КП перспективны для дальнейшего изучения *in vivo*. С помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии проанализирована динамика гибели опухолевых клеток, индуцированной этими КП, с участием каспаз 3, 8 и 9. Оценка молекулярных взаимодействий NCL, NPM и семи активных КП с помощью попарного докинга в программе Maestro 11 выявила высококонсервативные аминокислотные остатки в активных центрах NCL и NPM, образующие водородные связи с молекулами КП. На основании максимальных значений glide score для сайтов связывания мишеней и пептидных лигандов возможно моделирование оптимальных по структуре КП с высокой избирательной цитотоксичностью в отношении опухолей, для которых характерен высокий профиль экспрессии их мишеней — рецепторного нуклеолина и нуклеофозмина.

Перепрофилирование эметина и CGP60 474 для ингибирования REDD1 как новый подход к снижению побочных эффектов при терапии лимфом глюкокортикоидами

Е.С. Лылова^{1,2}, А.В. Савинкова¹, Л.Р. Тилова¹,
Е.М. Жидкова¹, К.А. Кузин¹, А.Ю. Портянникова¹,
К.И. Кирсанов¹, М.Г. Якубовская¹, Е.А. Лесовая^{1,3}

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

²ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет»; Москва;

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

Глюкокортикоиды (ГС) широко применяются в терапии гемобластозов. Однако их использование сопряжено с развитием побочных эффектов. Действие ГС реализуется посредством активации глюкокортикоидного рецептора (GR). Побочные эффекты обусловлены индукцией механизма ДНК-зависимой трансактивации GR (TA), в то время как терапевтическое действие опосредовано запуском транскрепрессии (TR). Показано, что ГС-зависимый ген *REDD1* обуславливает развитие осложнений при применении ГС, в связи с этим актуальным является поиск ингибиторов *REDD1*. С помощью биоинформатического скрининга был отобран ряд потенциальных ингибиторов *REDD1*: антипротозойное средство эметин и ингибитор протеинкиназы С CGP60 474.

Исследование проводили на клетках лимфомы Granta. Индукцию апоптоза анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии, цитотоксический эффект определяли путем прямого подсчета клеток. Экспрессию генов *REDD1*, *FKBP51*, *GILZ*, *ALOX* определяли с помощью количественной ПЦР.

Базальный и GC-индуцированный уровень экспрессии *REDD1* снижался после обработки эметином и CGP60474. Отмечено снижение экспрессии генов *GILZ*, *FKBP51*, *ALOX*, ассоциированных с ТА, при обработке CGP60474 и его комбинацией с Dex. Эметин снижал экспрессию *GILZ* и *FKBP51*, однако эффект не наблюдали в комбинации с Dex. При обработке клеток исследуемыми веществами наблюдали увеличение степени индукции апоптоза, что согласуется с тенденцией к синергизму цитотоксического эффекта комбинации ингибиторов *REDD1* с GC.

Таким образом, показано, что эметин и GCP60747 являются ингибиторами *REDD1*, а также подавляют GR-зависимую ТА. Совместно с выраженным проапоптотическим и антипролиферативным эффектом комбинации данных препаратов с Dex полученные данные демонстрируют перспективность данных исследований для разработки более эффективных протоколов ХТ гемобластозов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-75-20 124).

Противоопухолевые свойства циклических гидроксамовых кислот – индукторов открытия пор скачка митохондриальной проницаемости

Е.А. Лысова¹, В.Н. Осипов², Е.Ф. Шевцова¹, С.Г. Ключков¹, М.Е. Неганова¹

¹ФГБУН «Институт физиологически активных веществ РАН», Черноголовка, Московская обл.;

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

При неопластическом процессе происходит нарушение способности митохондрий активировать процессы, ассоциированные с открытием пор скачка митохондриальной проницаемости (Zamzami N. et al., 2001) и высвобождением проапоптотических факторов, в частности, цитохрома С и апоптоз индуцирующего фактора. В ряде опухолевых клеточных линий показаны гиперполяризация митохондриальной мембраны (Michelakis E. D. et al., 2008), а также различные изменения уровня активных форм кислорода (АФК). Падение продукции АФК приводит к закрытию редокс-зависимых каналов, митохондриальной гиперполяризации и, как следствие, устойчивости к апоптозу.

Поэтому перспективным путем создания противоопухолевых лекарственных средств является сочетание в одной молекуле различных компонентов, способных изменять редокс-статус и влиять на функциональное состояние митохондрий, как ключевого звена запуска апоптотического каскада гибели опухолевых клеток. В качестве таких соединений могут выступать предлагаемые в рамках данной работы производные циклических гидроксамовых кислот (ЦГК) на основе аминокислот и хиназолин-4(3Н)-она или дигидрохиназолин-4(1Н)-она.

Исследовано влияние ЦГК на процесс перекисного окисления липидов гомогената мозга крыс, инициируемое ионами Fe^{2+} , и функциональные характеристики митохондрий: скачок митохондриальной проницаемости и мембранный потенциал. Ряд соединений проявляли прооксидантные свойства. Большинство производных ЦГК усиливали Ca^{2+} -индуцируемое набухание митохондрий на 38–55 %, что может свидетельствовать о возможности проапоптотического эффекта данных соединений, при отсутствии влияния на мембранный потенциал. Полученные данные подтверждают перспективность использования ЦГК в качестве основы для создания потенциальных антинеопластов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-33-01 185 мол_а).

Ингибитор взаимодействия Hsp70 с GAPDH как потенциальный противоопухолевый препарат

М.А. Микеладзе, В.Ф. Лазарев, Е.А. Дутьшева, Б.А. Маргулис, И.В. Гужова

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Глиальные опухоли головного мозга остаются актуальной проблемой современного здравоохранения. Опухолевые клетки, в том числе клетки глиомы, находятся в гипоксических условиях. При легкой гипоксии у раковых клеток повышается пролиферативная активность, а при более сильной гипоксии происходит денатурация белков и их агрегация, в результате чего запускаются механизмы апоптоза. Одним из таких белков является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH), участвующий в гликолизе клетки и составляющий 5–7 % от всех ее белков. Однако в раковых клетках существуют цитопротекторные системы, одна из которых основана на Hsp70, помогающем сохранить белки в нативной конформации в стрессовых условиях и предотвратить их апоптоз. Ранее В.Ф. Лазаревым и соавт. было найдено вещество – производное колхицина (АЕАС), ингибирующее шаперонную активность Hsp70. Мы предположили, что при воздействии АЕАС на опухоль произойдет разобщение белков GAPDH и Hsp70.

Задачи исследования. Изучение влияния АЕАС на пролиферативную способность клеток глиомы головного мозга с разным количеством GAPDH в условиях гипоксии и проверка АЕАС на животной модели в условиях гипоксии.

В результате проделанной работы мы установили, что гипоксические условия повышают количество GAPDH в клетке; влияют на денатурацию GAPDH и вызывают его агрегацию. Легкая гипоксия приводит к активации пролиферации и образованию колоний клеток глиомы головного мозга. Также микромолярные концентрации АЕАС ингибируют шаперонную функцию Hsp70, препятствуя его взаимодействию с GAPDH, что приводит к агрегации фермента и индукции апоптоза. Таким образом, АЕАС подавляет пролиферативную способность клеток глиомы головного мозга в условиях гипоксии. Терапевтическое действие АЕАС было также доказано нами на животной модели.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-74-10087).

Циклические гидроксамовые кислоты – потенциальные противоопухолевые агенты: стратегия синтеза и механизмы цитотоксического действия

М.Е. Неганова¹, В.Н. Осипов², С.А. Пухов¹, Д.В. Авдеев³,
Е.Ф. Шевцова¹, С.Г. Клочков¹

¹ФГБУН «Институт физиологически активных веществ РАН», Черноголовка, Московская обл.;

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

³ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, Москва

Онкологические заболевания являются острой проблемой современной медицины (Джемал А. и др., 2014). Одним из основных методов лечения онкологических патологических состояний был и остается на данный момент метод ХТ. Поэтому поиск веществ потенциально эффективных противоопухолевых агентов среди новых направленно-синтезированных соединений является актуальной задачей.

Гидроксамовые кислоты содержат функциональные группы, способные хелатировать ионы металлов переменной валентности и тем самым ингибировать активность металлопротеаз, в частности, гистоновых деацетилаз (HDACs), содержащих в своем каталитическом центре Zn (II). Индукция апоптоза является наиболее вероятным путем HDAC – опосредованной клеточной гибели, и это имеет большое терапевтическое значение для лечения онкологических больных (Thurn K. et al., 2011).

В данной работе был получен ряд новых циклических производных хиназолин-4(3H)-она или дигидрохиназолин-4(1H)-она с гидроксаматной функцией. Проведено исследование их биологической активности (антиоксидантный потенциал по степени влияния на перекисное окисление липидов гомогената мозга крыс, способность хелатировать ионы железа, ингибиторная активность по отношению к ферменту HDAC1 и цитотоксичность на клетках опухолевых линий A549 и MCF7).

Из исследованных производных циклических гидроксамовых кислот выделено соединение-лидер ГК 4, которое является эффективным хелатором ионов железа, ингибирует активность HDAC1 и обладает цитотоксическим эффектом на клетках опухолевых линий A549 и MCF7. Таким образом, ГК 4 может рассматриваться как основа для создания потенциальных химиотерапевтических средств для лечения онкологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-33-01 185 мол_а).

Новый ингибитор активации HSF1 увеличивает чувствительность клеток колоректального рака к противоопухолевым препаратам

А.Д. Никотина, Л.В. Колударова, Е.Ю. Комарова,
Б.А. Маргулис, И.В. Гужова

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Использование комбинированной терапии в лечении опухолевых заболеваний приобретает все большую популярность. Известно, что ингибиторы ответа на тепловой шок снижают эффективность механизмов клеточного протеостаза и применяются в сочетанной терапии раковых заболеваний, однако все они либо малоэффективны, либо очень токсичны для организма. Мы предположили, что нацеленный поиск более щадящих ингибиторов ответа на тепловой шок может повысить чувствительность опухолевых клеток к известным противоопухолевым препаратам, не вызывая серьезных побочных эффектов. Активация транскрипции генов белков теплового шока осуществляется транскрипционным фактором HSF1, следовательно, ингибирование функциональной активности HSF1 может привести к ослаблению опухолевых клеток, усилению их чувствительности к химиотерапевтическим препаратам и снижению дозировки лекарств.

Используя люциферазную репортерную систему и ЛДГ-тест, мы обнаружили вещество CL-43, которое эффективно подавляло ответ на тепловой шок и не было токсичным для клеток нескольких линий, включая нормальные фибробласты человека. Помимо этого, мы установили, что CL-43 снижает миграционную и пролиферативную активность раковых клеток. Дальнейшие

исследования были нацелены на выявление эффективности сочетания ингибитора активности HSF1 с известными противоопухолевыми препаратами, такими как цисплатин, доксорубин и этопозид. Используя прибор xCelligence для отслеживания динамики темпа роста и миграции клеток в режиме реального времени, мы обнаружили, что предварительно обработанные ингибитором CL-43 клетки HCT116 гибнут от концентраций противоопухолевых препаратов, нетоксичных для необработанных клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что использование ингибитора функциональной активности транскрипционного фактора белков теплового шока вместе с противоопухолевыми препаратами ведет к увеличению эффективности терапии и позволяет снижать дозировку известных химиопрепаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 14-50-00068) и РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00973.

Создание новых ингибиторов гистондеацетилаз

В.Н. Осипов^{1,2}, Н.И. Моисеева¹, А.Н. Балаев³,
К.А. Охманович³, М.Е. Неганова⁴, Д.С. Хачатрян²

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

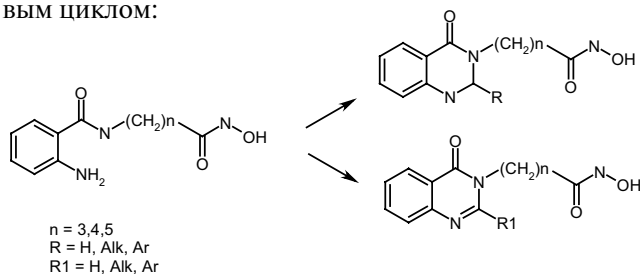
²ФГУП «ИРЕА» НИЦ «Курчатовский институт», Москва;

³АО «Фарм-Синтез», Москва;

⁴ФГБУН «Институт физиологически активных веществ РАН», Черноголовка, Московская обл.

Гистондеацетилазы являются важной мишенью в терапии онкологических заболеваний (Bolden J.E. et al., 2006). В настоящее время четыре ингибитора гистонацетилаз одобрены FDA: Вориностат для лечения кожных проявлений у пациентов с Т-клеточной лимфомой, Ромидепсин для лечения периферических Т-клеточных лимфом, Панобиностат для лечения пациентов с множественной миеломой, Белиностат получил статус орфанного препарата для лечения периферических Т-клеточных лимфом. Также ингибиторы гистонацетилаз имеют хорошие перспективы в комбинированной терапии (Suraweera A. et al., 2018) и в создании бифункциональных препаратов (Hesham H.M. et al., 2018).

В результате нашей работы в качестве потенциальных ингибиторов гистонацетилаз получены новые гидроксамовые кислоты, связанные с хинолиноновым циклом:



Полученные соединения исследованы на цитотоксическую активность на раковых клеточных линиях HCT-116, РС3, MCF-7, A549 и на нормальных эмбриональных фибробластах человека ФЭЧ. Для наиболее активного соединения ингибирующая концентрация IC_{50} равнялась 3,7 мкМ для HCT-116 и 2,2 мкМ для РС3.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках научного проекта № 14.624.21.0051.

Фотодинамическая терапия преодолевает антиоксидантные механизмы в клетках аденокарциномы яичника, устойчивых к цисплатину

А.С. Петрова¹, В.А. Ольшевская², А.В. Зайцев²,
В.В. Татарский², Я.А. Андреев¹, А.А. Штиль³,
Е.В. Калинина¹

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва;

²ФГБУН «Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН», Москва;

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

⁴ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Окислительный стресс — основной механизм повреждения опухолевых клеток при фотодинамической терапии (ФДТ). В клетках, устойчивых к противоопухолевым препаратам (в частности, цисплатину), антиоксидантная защитная система может препятствовать реализации окислительного фотоповреждения.

Мы исследовали изменение редокс-баланса в клетках, чувствительных (SKOV-3) и устойчивых (SKOV-3/CDDP) к цисплатину как фактор, определяющий их выживание или гибель при ФДТ. Изучена экспрессия генов, кодирующих ферменты, генерирующие активные формы кислорода (НАДН-оксидаза) и ферменты антиоксидантной системы (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза). Клетки нагружали новым фторированным карборанилхлоридом (фторборхлорин, ФБХ). Максимальное внутриклеточное накопление ФБХ было достигнуто в течение 36–48 ч. ФБХ практически нетоксичен в темноте ($IC_{50} > 50$ мкМ). Анализ ПЦР в реальном времени показал 4-кратное снижение уровня мРНК НАДН-оксидазы (*NOX5*), 3-кратное увеличение экспрессии гена глутатионпероксидазы (*GPx1*) и рост мРНК супероксиддисмутазы (*SOD1* и *SOD2* в 1,7 раза; *SOD3* в 2 раза). Независимо от дисбаланса экспрессии редокс-зависимых генов в клетках SKOV-3 и SKOV-3/CDDP световое воздействие (5 мкМ ФБХ, 30 Дж/см²)

приводило к быстрой некротической гибели 100 % популяции в течение первых минут воздействия.

Таким образом, рост антиоксидантной защиты в резистентных к цисплатину клетках не предотвращает их летального фотоповреждения в присутствии нового фотосенсибилизатора ФБХ. Антиоксидантные механизмы, имеющие отношение к возникновению резистентности клеток аденокарциномы яичников к цисплатину, могут быть «обойдены» индукцией фотонекроза.

Изучение цитотоксических свойств динитрозильного комплекса железа (донора NO) на клетках множественной миеломы

Т.Р. Приходченко^{1,2}, Н.П. Акентьева¹, Н.А. Санина^{1,3},
Е.С. Немирова², А.Р. Гизатуллин¹, Н.И. Шкондина¹,
Н.Н. Сусленикова^{1,4}

¹ФГБУН «Институт проблем химической физики РАН»,
Черноголовка, Московская обл.;

²ГОУ ВО МО «Московский государственный областной университет», Мытищи, Московская обл.;

³ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

⁴ФГБОУ ВО «Ивановский государственный университет»,
Иваново

Введение. В настоящее время показано, что оксид азота (NO) влияет на рост и пролиферацию опухолевых клеток в зависимости от концентрации. Установлено, что при высоких концентрациях (>1 мкМ) оксид азота ингибирует деление и стимулирует апоптоз опухолевых клеток. Показано, что доноры NO проявляют цитотоксичный эффект и повышают чувствительность опухолевых клеток к радиотерапии и ХТ.

Множественная миелома — это заболевание крови, возникающее в костном мозге и тесно связанное с лимфомой и лейкомией. Эффективного лечения миеломы на сегодня не существует, терапия направлена на замедление прогрессирования заболевания. Поэтому поиск новых препаратов для лечения множественной миеломы является актуальным.

Задачи исследования. Изучить цитотоксическую активность динитрозильного комплекса железа (ДНКЖ7, донора NO) на клетках множественной миеломы. Изучить влияние ДНКЖ на метаболизм опухолевых клеток множественной миеломы.

Материалы и методы. Для тестирования использовали динитрозильный комплекс железа (ДНКЖ7-[Fe(SC(NHCH₃)₂)₂(NO)₂]BF₄). Исследования выполнены на клеточной линии множественной миеломы-8226 (ММ). Влияние ДНКЖ на жизнеспособность ММ оценивали флуоресцентным методом, с помощью Alamar&Blue реагента. Эффект ДНКЖ на пролиферацию ММ измеряли с помощью проточной цитометрии. Для определения митохондриального мембранного потенциала использовали флуорометрический метод,

с помощью красителя JC-1. Уровень общего глутатиона в клетках определяли флуоресцентным методом, с помощью о-фталевого альдегида. Изменение уровня активных форм кислорода (АФК) в ММ при добавлении ДНКЖ оценивали флуорометрическим методом, используя 2',7'-дигидрохлорофлуоресцеин диацетат.

Результаты. Показано, что инкубация клеток ММ с ДНКЖ7 (10⁻⁵ М) понижала жизнеспособность опухолевых клеток на ~50 % в течение 24 ч. Методом проточной цитометрии установлено, что ДНКЖ7 ингибирует пролиферацию клеток ММ в 2,5 раза. Подсчет живых и мертвых клеток с помощью трипанового синего подтвердил, что соединение ДНКЖ7 проявляет цитотоксические свойства, поскольку количество мертвых клеток значительно возросло (~80 %) после инкубации с ДНКЖ. Показано, что ДНКЖ7 повышает уровень АФК в 4 раза, при этом наблюдается понижение уровня внутриклеточного глутатиона в 4 раза. Установлено, что ДНКЖ7 не влияет на уровень митохондриального мембранного потенциала.

Выводы. Результаты исследования показали, что динитрозильный комплекс железа обладает цитотоксическими свойствами, подавляет рост и пролиферацию опухолевых клеток ММ, и, следовательно, имеет потенциал для лечения множественной миеломы.

Новые полусинтетические тритерпеноиды – потенциальные ингибиторы Р-гликопротеина

Е.Ю. Рыбалкина¹, Н.И. Моисеева¹, А.Ф. Карамышева¹,
Д.В. Ерошенко², В.В. Гришко²

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

²Институт технической химии УрО РАН – филиал ФГБУН
ПФИЦ УрО РАН, Пермь

Введение. Современной проблемой ХТ является развитие множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Основной механизм МЛУ связан с экспрессией Р-гликопротеина (Р-гр) — трансмембранным белком, членом семейства АВС-транспортеров. Этот белок осуществляет транспорт из клеток сотен химических соединений, среди которых много противоопухолевых препаратов. Особое внимание исследователей привлекает разработка веществ, которые могут блокировать транспортирующие функции Р-гр. К числу потенциальных ингибиторов Р-гр могут быть отнесены полусинтетические тритерпеноиды, так как многие из них показали многообещающую противоопухолевую активность. Известно, что тритерпеноиды могут эффективно ингибировать активность Р-гр в клеточных линиях рака человека с МЛУ.

Задачи исследования. Оценка потенциальной способности вновь синтезированных полусинтетических тритерпеноидов ингибировать Р-гликопротеин.

Материалы и методы. Клеточные линии и их резистентные субклоны. Цитотоксичность определялась в МТТ-тесте, экспрессия гена *MDR1* определялась методом ОТ-ПЦР, экспрессию белка Р-гликопротеина и тесты по выбросу родамина определяли с помощью проточной цитофлуометрии.

Результаты. Полусинтетические дериваты тритерпеноидов с модифицированным А-циклом (соединение PN-14-4v) и А-циклом, конденсированным с гетероциклическим фрагментом (соединение NM-3г) были протестированы на цитотоксическую активность на двух линиях опухолевых клеток HBL100 и K562, а также их резистентных субклонах с фенотипом МЛУ (HBL100/Dox и K562/i-S9). Оба соединения показали высокий уровень цитотоксичности как на линии родительских опухолевых клеток, так и на клетках резистентных сублиний, что было подтверждено оценкой IC_{50} . Совместное действие соединений NM-3г и PN-14-4v, взятых в нетоксичных концентрациях с доксорубицином, статистически значимо увеличивало токсичность доксорубицина по отношению к резистентным сублиниям. Для ответа на вопрос являются ли PN-14-4v и NM-3г субстратами Р-гликопротеина мы исследовали влияние этих тритерпеноидов на выброс клетками родамина-123. С помощью теста с накоплением родамина мы показали, что оба соединения ингибировали выброс родамина из клеток белком Р-гр. Следовательно, механизм усиления токсичности доксорубицина в присутствии тритерпеноидов может быть связан с подавлением этими соединениями выброса доксорубицина из клеток белком Р-гр. Докинг соединений NM-3г и PN-14-4v в место связывания классического ингибитора верапамила выявил схожесть между их позициями внутри М-сайта, что позволяет предположить, что данные соединения являются скорее ингибиторами, чем субстратами.

Выводы. Полученные новые дериваты тритерпеноидов преодолевают резистентность клеточных линий, обусловленную Р-гликопротеином, а также ингибируют выброс родамина из резистентных клеток, что может говорить о том, что данные вещества являются ингибиторами Р-гликопротеина.

Ингибирование взаимодействия Hsp70 и каспазы-3 как потенциальный подход к комбинированной противоопухолевой терапии

Д.В. Сверчинский, А.Д. Никотина, Е.Ю. Комарова,
Е.К. Тананькина, Б.А. Маргулис, И.В. Гужова

ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Молекулярный шаперон Hsp70, поддерживающий белки в нативной конформации, лежит в основе

мощной цитопротекторной системы, защищающей клетку от стрессовых факторов воздействия. В нормальных клетках уровень Hsp70 невелик, однако в опухолевых клетках показана повышенная экспрессия этого белка, что может приводить к значительному снижению эффективности противоопухолевой терапии. Одним из молекулярных механизмов, защищающих опухолевую клетку от гибели, является взаимодействие Hsp70 с белками, участвующими в апоптотическом сигналинге, и ингибирование их функций. Важным элементом такого защитного механизма является взаимодействие Hsp70 и каспазы-3. Мы предположили, что разобщение Hsp70 и каспазы-3 может увеличивать чувствительность опухолевых клеток к апоптоз-индуцирующей терапии.

Используя программное обеспечение PASS для скрининга ингибиторов активности Hsp70, мы выбрали производное бензодиоксола (BT-44) как соединение, предположительно способное разобщать Hsp70 и каспазу-3. В ходе исследования мы показали способность BT-44 связываться с Hsp70, ингибируя его субстратсвязывающую и шаперонную активность, а также способность данного соединения проникать внутрь опухолевых клеток без потери своих ингибирующих свойств. Кроме того, в экспериментах *in vitro* на опухолевых клетках с повышенным уровнем Hsp70 мы продемонстрировали дозозависимый, сенсibiliзирующий опухолевые клетки эффект BT-44 по отношению к апоптоз-индуцирующему химиотерапевтическому агенту этопозиду, сопровождающийся увеличением уровня активной каспазы-3 в этих клетках. Наконец, с помощью конкурентного анализа мы продемонстрировали, что BT-44 вызывает диссоциацию комплекса Hsp70 и каспазы-3 в клетках, тем самым увеличивая противоопухолевую активность этопозиды и демонстрируя потенциальную роль разобщителей Hsp70 и каспазы-3 в противоопухолевой терапии.

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

Цитотоксичность конъюгатов даунорубицина с сесквитерпеновыми лактонами эвдесманового и гваянового типа

А.В. Семаков, Л.В. Аникина, С.А. Пухов, С.В. Афанасьева,
С.Г. Клочков

ФГБУН «Институт физиологически активных веществ РАН», Черногловка, Московская обл.

Антрациклиновые антибиотики широко применяются в качестве эффективных противоопухолевых лекарственных препаратов на протяжении уже нескольких десятков лет. Механизм их действия приводит

к высокой противоопухолевой активности и низкой избирательности действия антрациклиновых антибиотиков (Guano F. et al., 1999). Для них характерна необратимая кумулятивная дозозависимая кардиотоксичность (Hortobygi G.N., 1997). Не менее важный фактор, ограничивающий их применение, развитие множественной лекарственной устойчивости, обусловленной экспрессией в опухолевых клетках мембранных транспортеров MDR семейства.

В рамках поиска производных антрациклинов со сниженной кардиотоксичностью нами была синтезирована серия конъюгатов даунорубицина с сесквитерпеновыми лактонами. Эти соединения были получены через реакцию присоединения аза-Михаэля по аминогруппе в сахарном остатке молекулы антрациклина. Лактоны, используемые для данной реакции, были выделены из природных источников (алантолактон и изоалантолактон из *Inula helenium*, гроссгемин из *Centaurea macrocephala*, эстафиатин из *Achillea nobilis*, дегидрокостуслактон из *Saussurea lappa*), а также получены полусинтетически из природных лактонов. Конъюгаты были протестированы на панели из четырех опухолевых и одной псевдонормальной клеточных линиях на предмет цитотоксической активности. Во всех случаях такая модификация по аминогруппе не приводит к существенному падению цитотоксичности по сравнению с исходным даунорубицином, а в некоторых случаях возрастает до 10 раз. Более важно то, что для соединений с повышенной цитотоксичностью по отношению к опухолевым линиям цитотоксичность на псевдонормальной линии НЕК293 остается на том же уровне. Также проведено исследование наиболее перспективного препарата из этой серии в отношении резистентной к даунорубицину линии клеток K562/DNR. Данное соединение показывает меньшее снижение цитотоксичности на всем протяжении опыта, оставаясь достоверно более активным соединением, чем исходный даунорубицин.

Работа выполнена в рамках Госзадания 0090-2017-0018.

Керасомы для доставки противоопухолевых препаратов

Д.Б. Трушина¹, А.Ю. Сапач², А.М. Гилева²,
Е.А. Марквичева²

¹ФНИЦ «Кристаллография и фотоника РАН», Москва;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Керасомы – новый класс наноносителей, представляющий собой липосомы, покрытые прочной кремний-органической оболочкой, что существенно увеличивает время их циркуляции в кровотоке и позволяет отказаться от использования «защитных» («stealth») полимеров, например полиэтиленгликоля.

Для формирования керасом были синтезированы керасомобразующие липиды (КОЛ) – амфифилы – на основе аминокислот, высших жирных спиртов и силосановых производных. Были получены «чистые» керасомы, состоящие только из КОЛ, а также «смешанные» керасомы, состоящие из смеси КОЛ с разрыхляющим липидом дипальмитоилфосфатидилхолином (DPPC) в соотношении 1:1 (w/w). Для формирования керасом использовали нейтральные (1) и катионные (2) КОЛ. Таким образом, было получено 4 типа керасом, загруженных модельным противоопухолевым препаратом доксорубицином (DOX): нейтральные «чистые» (1), катионные «чистые» (2), нейтральные «смешанные» (1) +DPPC и катионные «смешанные» (2) +DPPC керасомы.

Исследование физико-химических свойств показало, что использование катионных КОЛ позволило увеличить величину ζ -потенциала, которая составляла +11 для (1), +4 для (1) +DPPC, +40 для (2) и +23 мВ для (2) +DPPC керасом соответственно. Следует отметить, что введение DPPC не только снижает ζ -потенциал, но также приводит к увеличению среднего диаметра керасом, который составил 150 для (1), 231 для (1) +DPPC, 186 для (2) и 247 нм для (2) +DPPC керасом соответственно. Исследование стабильности показало, что стабильность «чистых» керасом составляла более 120 дней, а «смешанных» – 30 дней. Максимальную эффективность высвобождения DOX (77 %) продемонстрировали обычные липосомы, состоящие полностью из DPPC. В случае «смешанных» керасом высвобождение было 64 и 60 %, а в случае «чистых» – 27 и 25 % для нейтральных и катионных керасом соответственно.

Таким образом, получено 4 типа керасом и изучены их физико-химические свойства. Показано, что стабильность керасом выше, чем у обычных липосом. Керасомы являются перспективными носителями для доставки противоопухолевых препаратов. В дальнейшей работе планируется изучение цитотоксичности и эффективности накопления керасом в 2D и 3D моделях *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-34-00919).

Противоопухолевая активность Кураксина CBL0137 на моделях лейкозов

Т.И. Фетисов¹, Е.Е. Антошина¹, Л.С. Труханова¹,
Т.Г. Горькова¹, М.Н. Зацепина², А.А. Кузнецова³,
Е.А. Лесовая^{1,4}, А.А. Борунова¹, Т.Н. Заботина¹,
М.Г. Якубовская¹, К.И. Кирсанов^{1,5}

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

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва;

³ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

⁴ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань;

⁵ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Опухоли кроветворной системы – широкая группа злокачественных новообразований миелоидной и лимфоидной тканей, в патогенезе которых лежат генетические нарушения, приводящие к изменению активности различных сигнальных путей. Для данной группы новообразований наиболее общим результатом генетических нарушений является аберрантная активность сигнального пути WNT. В результате чего в опухолях кроветворной системы запускаются механизмы пролиферации, ингибирования апоптоза, множественной лекарственной устойчивости, а также клетки приобретают фенотип стволовых клеток. Таким образом, WNT-сигналинг является перспективной мишенью в терапии опухолей кроветворной системы. Кураксин CBL0137 – низкомолекулярное производное карбазола, демонстрирующее противоопухолевую активность на различных моделях новообразований. Ранее нами показано, что Кураксин ингибирует сигнальный путь WNT в клетках рака толстой кишки, более того, аналогичный эффект наблюдался на клеточных линиях РПЖ, рака легкого и РМЖ. Чтобы оценить противоопухолевый эффект и влияние Кураксина на сигнальный путь WNT в клетках опухолей кроветворной системы, мы использовали клеточные линии человека (KG1, THP1, K562, CCRF CEM, CCRF SB, RPMI 8226, H929) и мышиную клеточную линию WENI-3. Методом МТТ было показано, что CBL0137 обладает дозозависимым и времязависимым цитотоксическим эффектом, который наблюдался во всех клеточных линиях. Методом проточной цитофлуориметрии продемонстрировано, что CBL0137 во всех клеточных линиях индуцирует апоптоз. Анализ экспрессии WNT-зависимых генов и генов, вовлеченных в регуляцию сигнального пути WNT, методом ПЦР в реальном времени выявил снижение экспрессии WNT-зависимых генов и генов положительных регуляторов WNT-сигналинга, в то время как экспрессия генов антагонистов сигнального пути WNT

повышалась. При моделировании острого миелоидного лейкоза на мышах было продемонстрировано, что введение CBL0137 приводит к снижению частоты и степени инфильтрации лимфатических узлов, печени и селезенки опухолевыми клетками WENI-3.

Таким образом, нами была продемонстрирована противоопухолевая активность Кураксина *in vitro* и *in vivo* в отношении опухолей кроветворной системы, которая может быть опосредована способностью Кураксина ингибировать активность сигнального пути WNT в данных клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 18-75-00115).

Модификация липосом наночастицами магнетита для контролируемого высвобождения доксорубицина

А.В. Хованкина¹, А.М. Гилева¹, К.Ю. Власова²,
Н.Л. Клячко², Е.А. Марквичева¹

¹ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва;

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

Минимизировать или полностью предотвратить негативное воздействие лекарственного средства на здоровые ткани организма можно, обеспечив его высвобождение исключительно в опухолевых клетках. Добиться этого можно различными модификациями систем доставки, основанными на их чувствительности к различным физиологическим параметрам. Преимущество таких систем состоит в том, что даже при равномерном распределении наноносителей по всему организму их биодegradация и высвобождение действующего вещества будут происходить только в целевой области.

В данной работе предложена тераностическая система, представляющая собой липосомы с инкапсулированными в бислое наночастицами магнетита (Fe₃O₄). Под действием низкочастотного негреющего магнитного поля (≤10 кГц) эти частицы приходят в движение, вызывают разрушение бислоя и высвобождение инкапсулированного препарата. Магнитные липосомы были сформированы на основе яичного лецитина и загружены модельным противоопухолевым препаратом доксорубицином (DOX).

Диаметр магнитных липосом составил 145 нм, ζ-потенциал был равен –22 мВ. Изучение эффективности высвобождения препарата (на примере флуоресцеина) из магнитных липосом проводилось в динамической диализной модели в присутствии и отсутствие магнитного поля. Обнаружено, что в отсутствие магнитного поля высвобождения инкапсулированного агента практически не происходит, тогда как при при-

менении магнитного поля наблюдается резкий скачок флуоресценции, вероятно соответствующий быстрому разрушению липосом и высвобождению вещества. Исследование цитотоксичности показало, что пустые липосомы не вызывают гибели клеток, тогда как липосомы, загруженные DOX, проявляют цитотоксичность только при высоких концентрациях препарата (30,5 и 17 мкМ DOX для 24 и 72 ч инкубации).

Таким образом, предложена тераностическая система, которая может применяться как для диагностических целей, так и для доставки противоопухолевых препаратов с их контролируемым высвобождением под действием магнитного поля. В дальнейшем планируется исследование эффективности накопления магнитных липосом и высвобождения препарата в 2D и 3D моделях *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-34-00919, 17-54-33027).

Эффект сенсibilизации опухолевых клеток к действию таргетных препаратов в условиях энергетического дефицита

Ю.Ю. Щеголев, Д.В. Сорокин, В.А. Шатская, М.А. Красильников

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

Несмотря на активные исследования механизма резистентности опухолей к химиопрепаратам, в том числе таргетным препаратам, изучение возможных путей преодоления резистентности остается важнейшей нерешенной проблемой молекулярной онкологии. Одним из новых и перспективных подходов к преодолению резистентности может явиться применение соединений, вызывающих частичный энергетический дефицит опухолевой клетки, в первую очередь ингибиторов гликолиза, блокирующих характерный для опухолевых клеток аэробный гликолиз (т.н. эффект Варбурга).

Мы начали наши исследования с изучения влияния пониженного уровня глюкозы на чувствительность к рапамицину и метформину клеток РМЖ. В качестве модели использовались клетки РМЖ линии MCF-7 и резистентные сублинии, полученные в ходе длительного культивирования клеток MCF-7 с рапамицином (ингибитором mTOR) и метформинном (ингибитором AMPK). Оказалось, что 4-кратное снижение концентрации глюкозы в среде (с 4,5 до 1 г/л) при минимальном изменении скорости роста клеток приводит к заметному усилению эффективности цитостатического действия рапамицина и метформина, как на родительские, так и на резистентные клетки. Анализ транскрипционных факторов, находящихся в том числе под контролем PI3K/Akt сигналинга, AP-1 и NF-κB,

показал заметное снижение активности при уменьшении содержания глюкозы.

В ходе дальнейших экспериментов исследовалось влияние ингибитора гликолиза 3-бромпирувата на чувствительность клеток MCF-7 и их дериватов к рапамицину и метформину. Мы показали, что 3-бромпируват при добавлении в сублетальной дозе (не вызывающей изменений роста/выживаемости клеток) приводит к существенному увеличению чувствительности родительских и резистентных клеток к рапамицину и метформину, сопровождающейся, также как и в случае с пониженной концентрацией глюкозы, подавлением активности транскрипционных факторов AP-1 и NF-κB. Взятые вместе полученные результаты свидетельствуют о возможности частичной реверсии резистентного фенотипа и сенсibilизации опухолей к действию таргетных препаратов в условиях энергетического дефицита.

Работа финансировалась РФФИ, проекты № 16-04-00347 (получение резистентных культур) и № 18-29-09016 (исследование транскрипционных факторов).

Фармакокинетика 211-At при безйодовой диете

О.А. Юминов¹, Д.А. Бондаренко², В.А. Дроздов¹, Д.О. Еременко^{1,3}, А.Н. Мурашев², С.Ю. Платонов^{1,3}, О.В. Фотина^{1,3}

¹НИИ ядерной физики им. Д.В. Скобельцына ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²филиал ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Пушкино, Московская обл.;

³физический факультет ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Фармакокинетика 211-At исследовалась на двух группах животных. Одна группа получала нормальное питание, а другая находилась на 3-дневной безйодовой диете. Тестируемый радиофармпрепарат вводили животным (самцы крыс SD (Sprague Dawley)) внутривенно в хвостовую вену однократно, в объеме 10 мл/кг, в дозе 100 мкКи/животное. В ходе исследования животные подвергались некропии в определенные временные точки (30 мин, 1, 3, 6, 12, 16 и 24 ч) с забором органов и тканей для дальнейшего подсчета накопленной в органах активности с помощью колодезного сцинтилляционного гамма-спектрометра. Для каждой временной точки использовалось 6 животных.

Активность в органах определялась как в процентах от введенной активности:

$$n_{\text{орг}} = \frac{N_{\text{орг}}(t)}{N_{\text{введ}}} 100 \%,$$

так и в процентах от введенной активности, деленной на массу органа:

$$nm_{орз} = \frac{N_{орз}(t)}{N_{введ} m_{[орз]}} 100 \%,$$

где $N_{орг}(t)$ — активность в органе в момент времени t , $N_{введ}$ — введенная активность, $m_{[орз]}$ — масса органа в граммах.

Обнаружено, что ^{211}At тропен к щитовидной железе в обоих случаях. Однако безйодовая диета повышает концентрацию радионуклида ^{211}At в щитовидной железе в несколько раз, что может свидетельствовать о важности соблюдения безйодовой диеты при лечении ^{211}At .

Исследование развития вирус-индуцированной гибели опухолевых клеток при инфицировании дикими штаммами вируса болезни Ньюкасла

К.С. Юрченко, А.В. Глушенко, А.М. Шестопапов

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск

Активация апоптотической программы гибели опухолевых клеток, инфицированных литическими штаммами вируса болезни Ньюкасла (сем. *Paratuboviridae*), считается основным механизмом реализации цитотоксического противоопухолевого потенциала данного вида онколитического вируса. Однако все чаще появляются работы, которые описывают не только вариации активации и течения апоптотической ВБН-индуцированной смерти раковых клеток, но и другие механизмы гибели в дополнение

к апоптозу, как, например, некроптоз. Таким образом, необходимым этапом для перспективных исследований и разработок прототипного противоопухолевого виро-терапевтического образца на основе онколитического вируса болезни Ньюкасла является понимание основ механизма его действия при активации гибели опухолевых клеток.

В настоящем исследовании мы демонстрируем на примере изучения инфицированных штаммами ВБН клеточных линий карцином человека (HCT116, HeLa, A549, MCF7), что помимо сформированного в научной литературе «классического» механизма существует более сложная регуляция процессов клеточной гибели, выбор пути которой реализуется конкурирующими между собой на разных этапах вирусной инфекции апоптотическими процессами, а также, вероятно, и некроптическими. Кроме того, иммуно-цитохимические исследования на маркеры апоптоза и эксперименты с ингибированием инициаторной и эффекторной каспаз и RIP1-зависимого регулируемого некроза позволяют предположить, что выбор пути клеточной смерти зависит от патотипа и онколитичности самого штамма ВБН, будь то штаммы с выраженным высоким цитопатическим потенциалом или штаммы с низким цитопатическим действием на опухолевых клетках и разным «генетическим патотипом» на основе последовательности сайта расщепления F белка, определяющего вирулентность.

Таким образом, по результатам работы предложена обобщенная схема механизма активации ВБН-опосредованной гибели клеток карциномы *in vitro* как наиболее распространенного типа опухолей человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-34-00139).

Тезисы

Производные хиназолина индуцируют ферроптоз в клетках метастатической меланомы

А.А. Вартамян, В.Н. Осипов, Д.А. Хоченков, Д.В. Гусев,
М.А. Барышникова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. Ферроптоз — железо-зависимая форма программируемой гибели клетки — впервые была описана в 2012 г. Эта форма гибели клетки связана с накоплением в клетках АФК, которые генерируются в результате окисления свободного Fe^{2+} в Fe^{3+} — реакции Фентона. Предварительные результаты доклинических исследований указывают на то, что сочетание индукторов ферроптоза с цитотоксическими препаратами повышает гибель резистентных к терапии опухолевых клеток.

Задачи исследования. Поиск соединений, индуцирующих ферроптоз в клетках метастатической меланомы.

Материалы и методы. Клетки меланомы Mel Z были получены из метастазов большой диссеминированной меланомой, 55 лет. Исследовали 9 аналогов эрастина — классического индуктора ферроптоза. Эти соединения, производные хиназолина, были синтезированы в НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В работе использованы 2D-культивирование опухолевых клеток, МТТ-тест и окрашивание ядер опухолевых клеток. Контроль активации ферроптоза осуществляли определением уровня перекисного окисления липидов с использованием флуоресцентной метки — BODIPY C-11. Уровень аутофагии определяли окрашиванием клеток монодансил-кадаверинном.

Результаты. Производные хиназолина были охарактеризованы данными спектров 1H -ЯМР и масс-спектров высокого разрешения. Исследование цитотоксической активности на клетках метастатической меланомы Mel Z показало, что наибольшей цитотоксической активностью обладали соединения (8) и (9), $IC_{50} = 10,2$ и $8,4$ мкМ соответственно. Окрашивание ядер клеток DAPI после инкубирования с соединениями (8) или (9) не выявило фрагментацию ядра. Ингибиторы апоптоза (zVAD-fmk (50 мкМ)) и аутофагии (хлорокин (20 мкМ)) не оказывали влияния на гибель клеток. С другой стороны, хелатор железа деферроксамин (100 мкМ) полностью блокировал гибель клеток. Уровень перекисного окисления липидов в опухолевых клетках, являющегося медиатором ферроптоза,

возрастал с повышением дозы производных хиназолина. Следует отметить, что соединения (8) и (9) индуцировали гибель клеток на 15 ± 1 и 25 ± 1 % больше эрастина. Активация ферроптоза не меняла базовый уровень аутофагии в клетках метастатической меланомы.

Выводы. В результате скрининга выявлены два производных хиназолина, превышающие активность эрастина в индукции ферроптоза. Индукторы ферроптоза — это не просто соединения, вызывающие массивное окисление биомолекул клетки, как это делает, например, H_2O_2 . Эрастин и другие известные индукторы ферроптоза не содержат остатки химических групп с редокс-активностью. Более того, ингибиторы ферроптоза блокируют летальность эрастина, но не АФК в целом. Нет ответа и на вопрос, почему АФК, генерируемые в реакции Фентона, активируют не апоптоз, а ферроптоз.

Таргетная доставка ^{111}In в ядра опухолевых клеток-мишеней с помощью модульных нанотранспортеров, нацеленных на рецепторы эпидермального фактора роста

Т.С. Карягина¹, А.В. Уласов¹, Т.А. Слестникова¹,
Т.Н. Лупанова¹, Ю.В. Храмцов¹, В.А. Писарева²,
А.А. Розенкранц^{1,2}, А.С. Соболев^{1,2}

¹ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

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

Доставка терапевтических средств в ядра клеток-мишеней может служить основой создания новых эффективных лекарств. Для этого разрабатываются рекомбинантные белки — модульные нанотранспортеры (МНТ), обладающие функциями узнавания клеток, интернализации в них, выхода из эндосом и транспорта в ядро.

Созданы новые МНТ с N-концевыми лигандами к эпидермальному фактору роста (EGFR): EGF и антитело-подобный белок, anti-EGFR аффибоди. Константы диссоциации (K_d) комплексов МНТ-рецептор, измеренные радиолигандным анализом, составили $37,5 \pm 5,9$ нМ и $34,7 \pm 4,1$ нМ для EGF-МНТ и аффибоди-МНТ, соответственно, что близко к K_d EGF человека. Интернализация EGF-МНТ и аффибоди-МНТ, меченных Alexa647, в клетках A431 была исследована методом проточной цитофлуориметрии. Избыток EGF в среде блокировал интернализацию обоих вариантов

МНТ, однако эффект был более выражен для аффибоди-МНТ. Эндосомолитическая активность EGF-МНТ и аффибоди-МНТ оценена на модельных липосомах, в результате чего была доказана эффективность работы эндосомолитического модуля МНТ.

В качестве агента для проверки эффективности МНТ был использован ^{111}In , испускающий гамма-излучение и электроны Оже. Присоединение ^{111}In к МНТ осуществляли с помощью бифункционального хелатора. Удельная радиоактивность меченных МНТ составила 2257 МБк/мг. Цитотоксический эффект ^{111}In -EGF-МНТ и ^{111}In -аффибоди-МНТ оценивался с помощью метода колониеобразования. Активность, соответствующая 37 % выживаемости клеток A_{37} для свободного ^{111}In , составила 11,4 МБк/мл, тогда как для ^{111}In -EGF-МНТ и ^{111}In -аффибоди-МНТ эта величина уменьшилась до 0,5 и 1,2 МБк/мл. Накопленная в ядрах спустя 2 ч инкубации активность для ^{111}In -EGF-МНТ и ^{111}In -аффибоди-МНТ составляла 57 ± 13 и 39 ± 18 % от общей внутриклеточной активности. Количество молекул на клетку и на ядро на 2 ч составило для ^{111}In -EGF-МНТ 1×10^6 и 7×10^5 , тогда как для ^{111}In -аффибоди-МНТ – 2×10^5 и 8×10^4 .

Проведенные эксперименты показали эффективность работы новых МНТ с лигандами на N-конце, что делает возможным использование C-конца для доставочных функций.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-14-01304).

Синтез гликолипидов для создания липосомальных композиций направленного действия

О.О. Колоскова, А.С. Носова, М.Р. Хаитов

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва

Модифицированные липосомы гораздо эффективнее связываются с рецепторами, если лиганды вынесены от поверхности бислоя при помощи спейсера. Для этого в состав липосом можно вводить гликоконъюгаты, содержащие между углеводным и гидрофобным доменами полярный спейсер на основе олигоэтиленгликолей. Липосомы, модифицированные этими соединениями, будут действовать согласно принципам активного транспорта, путем специфического связывания лиганда и рецептора на поверхности гепатоцитов.

Алкильное производное диэтиленгликоля получали через образование сложноэфирной связи между пальмитиновой кислотой и диэтиленгликолем в присутствии DCC и DMAP в безводной среде и при нагревании. Пальмитат триэтиленгликоля получали по аналогичной методике. Свободную карбоксильную группу на конце алкильных составляющих создавали

путем взаимодействия пальмитатов олигоэтиленгликолей и янтарного ангидрида в присутствии DMAP. Обработкой D-лактозы уксусным ангидридом получали кристаллы ацетилированной лактозы, которая при взаимодействии с 2-бромэтанолом в присутствии эфира трихлористого бора образовывала бромэтильное производное. Удаление защитных ацетильных групп проводили в щелочной среде. Конечные соединения получали конъюгацией алкильных производных этиленгликолей и лактозида бромэтанола в присутствии DCC и HOBT.

Структуры всех соединений подтверждены методами ИК- и ^1H -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Таким образом, в результате проделанной работы осуществлен синтез алкильных производных D-лактозы на основе ди-/триэтиленгликоля. Полученные структуры предложены в качестве набора гликозидных лигандов для модификации липосомальных частиц и повышения эффективности доставки терапевтических препаратов в клетки печени.

Работа выполнена при поддержке стипендии Президента РФ для молодых ученых СП-998.2016.4.

Поиск и создание пептидных конструкций – ингибиторов комплекса циклин D-циклинзависимые киназы 4/6

Т.М. Кулинич, А.В. Иванов, Е.Л. Джикия, А.М. Шишкин, В.К. Боженко

ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России, Москва

Наиболее проблемными внутриклеточными мишенями, для которых показана активная роль в канцерогенезе, являются белки, проявляющие свою активность по механизму комплексообразования с другими белками-мишенями. Образующиеся комплексы имеют высокие константы связывания и не имеют активных центров, потенциально пригодных для низкомолекулярных ингибиторов. Одним из ключевых противоопухолевых белковых мишеней являются комплексы циклин D-циклинзависимых киназ 4/6 (CDK 4/6), контролирующие прохождение G1 фазы клеточного цикла и гиперэкспрессированные при опухолях различных локализаций.

С применением технологий молекулярного моделирования и анализа трехмерных структур белковых комплексов нами проведен поиск перспективных пептидных последовательностей-ингибиторов внутриклеточных белковых мишеней: циклина D и CDK 4/6. Рассчитаны энергии взаимодействия и синтезированы 4 наиболее перспективные последовательности. Для преодоления проблем, связанных с доступом

к белковым мишеням, предложено использование технологии интернализуемых пептидов (СРР). В исследованиях *in vitro* на перевивных опухолевых линиях человека, А549 (аденокарцинома легкого) и НСТ116 (аденокарцинома толстой кишки), с использованием методов проточной цитофлуориметрии (FC-500, Beckman Coulter) и системы многопараметрического анализа клеточных культур RTCA iCELLigence, проведена оценка противоопухолевых свойств полученных последовательностей. Показано, что пептидные последовательности обладают способностью внутриклеточного проникновения и активно ингибируют рост опухолевых клеток. Определены две последовательности, проявляющие наиболее выраженные противоопухолевые свойства.

Полученные результаты позволят предложить для доклинических и клинических исследований ряд новых противоопухолевых пептидов, полученных с помощью молекулярного моделирования и имеющих таргетные свойства к ключевым белкам-онкогенам. Создание таких препаратов позволит расширить терапевтический спектр для лечения резистентных к конвенциональным химиопрепаратам опухолей.

Ингибиторы хемосинтетических реакций в лечении ранних стадий рака шейки матки. Экспериментальное исследование *in vitro*

В.А. Мельников¹, И.В. Тюмин¹, О.В. Тюмина^{1,2},
Д.Ю. Клочников², В.В. Соколова¹

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара;

²ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр «Династия», Самара

Введение. В предыдущих исследованиях *in vitro* доказано наличие хемосинтетических реакций у раковых клеток линии HeLa. Разработана оригинальная концепция онкогенеза «энергетическая метаплазия злокачественных клеток», суть которой состоит в изменении способа получения энергии клеткой: с гетеротрофного на автотрофный (хемосинтез).

Задачи исследования. Доказать *in vitro* возможность лечения РШМ на доклинической стадии эффективными ингибиторами хемосинтеза.

Материалы и методы. Изучение ингибиторов хемосинтеза по пути влияния на процессы фосфорилирования в раковой клетке АДФ до АТФ (эта фаза присутствует как при фотосинтезе, так и хемосинтезе) было проведено *in vitro* в 44 опытах. В эксперименте использованы культура клеток HeLa в 37 опытах, в 21 — клеточный материал шейки матки, полученный от пациенток с CIN III, и в качестве контроля культура

мезенхимальных стромальных стволовых клеток (МСК). Полученный клеточный материал с шейки матки от 21 пациентки сначала подвергался в течение 8 дней предварительному культивированию для стратификации злокачественных клеток. Введение в культуральную среду ингибиторов хемосинтеза проведено в 44 опытах. Использован новый оригинальный комбинированный препарат из двух ингибиторов хемосинтеза (оформляется заявка на изобретение). Культивирование проводили с использованием рекомендуемых сред. В процессе культивирования проводились подсчет количества клеток в поле зрения, оценка общей морфологии культуры и жизнеспособности клеток. Подсчет количества клеток и оценка жизнеспособности проводились на автоматическом клеточном анализаторе Countess II FL (Life Technologies, США) по завершении культивирования.

Результаты. Исследование клеточного материала с шейки матки от 21 пациентки выявило злокачественные клетки при предварительном культивировании лишь у 7 пациенток. Этапные исследования *in vitro* с применением оригинального блокатора хемосинтеза выявили однотипные реакции клеток линии HeLa и злокачественных клеток шейки матки: резкое угнетение роста клеток вплоть до полной их гибели. Культура МСК достоверно не реагирует на блокаторы хемосинтеза в культуральной среде.

Выводы. Сопоставление культуры клеток линии HeLa и злокачественных клеток с шейки матки указывает на единый путь канцерогенеза — изменение способа получения энергии клеткой, что подтверждает концепцию «энергетической метаплазии раковой клетки». При CIN III только в 30 % случаев выявляются злокачественные клетки, которые способны к культивированию, что указывает на доклиническую стадию РШМ. Новый оригинальный ингибитор хемосинтеза показал *in vitro* высокую эффективность, что требует дальнейшего изучения.

Исследование комбинированного действия метморфина и МЕК-ингибитора биниметиниба на жизнеспособность клеточных линий меланомы *in vitro*

А.А. Прокофьева, О.О. Рябая

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Несмотря на успехи таргетной терапии меланомы кожи (МК), у пациентов возникает вторичная резистентность к BRAF- и МЕК-ингибиторам, связанная с реактивацией MAPK или альтернативных сигнальных каскадов. Метформин — антидиабетический препарат с умеренной противоопухолевой

активностью, является индуктором AMPK α и способен повышать чувствительность к BRAF- и MEK-ингибиторам при МК.

Задачи исследования. Изучить эффективность комбинированного действия биниметиниба (БИН) и метформина (МЕТ) на BRAF- и NRAS-мутированных клеточных линиях меланомы.

Материалы и методы. Использованы BRAF-мутированные клеточные линии A375, Mel Z, Mel IL, вемурафениб-резистентная сублиния Mel IL/R и NRAS-мутированные линии Mel MTP and Mel Me. Цитотоксичность оценивалась МТТ-тестом. Способность клеток к миграции оценивали в камере Бойдена. Изменение экспрессии белков AMPK α , АКТ, mTOR, MEK, cPARP, cyclin D, CDK4, CDK6, p21 и их фосфорилированных форм под действием препаратов оценивали иммуноблоттингом. Апоптоз, клеточный цикл исследовали цитометрически. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием GraphPad Prism 5.0.

Результаты. В работе использовали 1mM МЕТ и 2 μ M БИН. Комбинация препаратов уменьшала пролиферативную активность клеток и количество жизнеспособных колоний в среднем на 25–30 % по сравнению с МЕТ и БИН в монорежимах, а также снижала способность клеток к инвазии и миграции. Под действием БИН+МЕТ происходила активация апоптоза в клеточных линиях МК с мутацией в гене BRAF, но не в гене NRAS, что подтверждалось уровнем cPARP. Анализ клеточного цикла показал, что БИН и МЕТ отдельно индуцировали арест клеточного цикла в G0/G1-фазе, комбинация БИН+МЕТ не приводила к дальнейшему росту G0/G1 фазы, но значительно снижала экспрессию CDK4/6 и cyclin D, уровень p21 не изменялся. Цитотоксический эффект комбинации БИН+МЕТ ассоциирован с увеличением p-AMPK α и снижением фосфорилирования ERK. При этом уровень p-AKT и p-mTOR различался между клеточными линиями, но не зависел от мутаций.

Выводы. Комбинированная терапия БИН и МЕТ может быть рассмотрена как перспективная тактика лечения BRAF- и NRAS-мутированной МК и требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-35-00 107).

Противоопухолевая активность антинеопластов на основе природного сесквитерпенового лактона

С.А. Пухов, С.В. Афанасьева, С.Г. Клочков

ФГБУН «Институт физиологически активных веществ
РАН», Черногловка, Московская обл.

Разнообразие спектра биологического действия большинства сесквитерпеновых лактонов опреде-

ляется во многом наличием в их структуре активированного α -метил- γ -лактонного функционального фрагмента. Однако переход на стадию клинических исследований отдельных представителей этого класса затрудняется их высокой гидрофобностью и неселективным связыванием (как акцепторов Михаэля) в нежелательных мишенях. Поэтому разрабатываются «пролекарственные» подходы для преодоления этих проблем. В частности, присоединяют различные амины к экзометилену, чтобы изолировать акцептор от нежелательных нуклеофильных воздействий, повысить растворимость соединения в воде и улучшить фармакокинетические характеристики в целом.

Из эпоксиантолактона (минорный вторичный метаболит *Inula helenium* L.) был синтезирован 4-гидрокси-4а,5-диметил-3-метиленоктагидро-3H-нафто [2,3-b]фуран-2-он и на его основе получен ряд аминоксодержащих производных, которые можно рассматривать как пролекарства с заблокированным экзометиленом лактонной группы.

В качестве объектов для оценки цитотоксического действия исследуемых соединений был использован ряд опухолевых клеточных линий: адгезионные культуры A549, RD, MCF7, MS и HCT116, а также суспензионные K562 и Jurkat. Некоторые модифицированные соединения показали более высокий индекс IC₅₀, чем исходный сесквитерпеновый лактон, проявляя при этом избирательность действия.

Токсичность исходного лактона и ряда производных для линии клеток аденокарциномы толстой кишки человека HCT116wtp53 (экспрессирующая белок p53) превышает токсичность для линии с нокаутом этого белка почти в 2 раза, что косвенно говорит о вкладе сигнального пути p53 в цитотоксичность лактона. В то же время в присутствии N-ацетилцистеина ряд соединений показал снижение эффективности действия, что может свидетельствовать о влиянии АФК на процесс инициации гибели опухолевых клеток.

По результатам полученных данных были отобраны соединения-хиты для изучения действия на основные клеточные мишени и разработки на их основе высокоэффективных антинеопластов.

*Работа выполнена в рамках Госзадания
0090-2017-0018.*

Возможности применения ингибитора NOS в качестве средства профилактики лучевых повреждений кожи

А.С. Самсонова, М.В. Филимонова, Т.С. Корнеева,
Л.И. Шевченко, А.С. Филимонов, В.М. Макачук
МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России, Обнинск

Введение. Постоянное совершенствование методов и различных схем лучевой терапии не только повышает эффективность лечения злокачественных новообразований, но и несет в себе определенные риски возникновения у больных лучевых повреждений, лечение и профилактика которых представляют собой крайне сложную проблему. Новым фундаментальным подходом к решению проблемы постлучевых осложнений является их профилактика с помощью средств, способных к селективной защите нормальных тканей во время лучевой терапии опухолей.

Материалы и методы. Исследования выполнены на самках аутбредных мышей, подвергшихся локальному облучению γ -лучами Co^{60} в широком диапазоне доз. В качестве экспериментальной опухолевой модели в работе была использована карцинома Эрлиха (КЭ) в солидной форме. Животным опытных групп за 30 мин до радиационного воздействия вводили соединение, ингибирующее эндотелиальную синтазу оксида азота (NOS), в/бр в дозе $1/4 LD_{16}$. Тяжесть и течение лучевых повреждений кожи оценивали по классификации RTOG/EORTC, 1995.

Результаты. В экспериментальных исследованиях получены модели формирования ранних лучевых повреждений кожи у мышей при локальном облучении в дозах 20, 25 и 30 Гр, не приводящих к гибели организма, но демонстрирующих спектр выраженности лучевой реакции. Показано, что на этих моделях введение ингибитора NOS существенно снижает тяжесть ранних лучевых повреждений. На модели солидной КЭ при локальном радиационном воздействии была показана способность исследуемого ингибитора NOS в оптимальной радиозащитной дозе ($1/4 LD_{16}$) статистически значимо снижать альтерацию нормальных тканей, не снижая противоопухолевую эффективность радиотерапии.

Выводы. Результаты проведенного этапа работы свидетельствуют о перспективности выбранного подхода к профилактике постлучевых осложнений в онкологии и целесообразности продолжения исследований.

Терафтал (натриевая соль 4,5-октакарбокситалочанина кобальта) снижает токсичность доксорубина для клеток меланомы мышей *in vitro*, но не влияет на терапевтический эффект препарата *in vivo*

Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева,
В.В. Татарский, Н.А. Андропова, В.И. Романенко,
Д.А. Хоченков

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Антрациклиновый антибиотик доксорубин (DOX) широко используется в клинической онкологии. По нашим данным, токсичность DOX для опухолевых клеток млекопитающих, растущих *in vitro*, снижается в присутствии терафтала (ТФ). Способность ТФ вмешиваться в механизм действия DOX *in vitro* может отражаться на эффективности комбинированной фототерапии и ХТ при использовании в качестве фотосенсибилизаторов – фталочанининов, аналогов ТФ. В данном исследовании мы выяснили, снижается ли противоопухолевый эффект DOX при комбинировании с ТФ.

В работе были использованы сингенные экспериментальные модели – клетки меланомы мышей линии B16/F10 и перевиваемая опухоль меланомы мышей Me1B16. Способность ТФ защищать опухолевые клетки от гибели, индуцированной DOX, оценивали с помощью МТТ-метода, проточной цитометрии, световой микроскопии, цитохимического метода определения экспрессии β -галактозидазы (β -гал) с использованием в качестве субстрата X-Gal, радиометрического метода. Противоопухолевый эффект препаратов в режимах (DOX \pm ТФ) оценивался по торможению роста опухоли у животных.

По нашим данным, токсичность DOX относительно клеток меланомы мышей линии B16/F10 в присутствии ТФ (10–20 мкМ) снижается в среднем в 4–6 раз. В защите ТФ от токсичности DOX опухолевых клеток линии B16/F10 участвует механизм, который связан со снижением способности клеток «накапливать» препарат в присутствии модулятора. По нашим данным, ведущим механизмом гибели клеток меланомы B16/F10 при воздействии DOX является апоптоз по митохондриальному пути, о чем свидетельствует высокий уровень клеток в SubG1 фазе (88 %). В присутствии ТФ количество «апоптотических» клеток в ответ на DOX остается на низком уровне (2,4 %). В этих же условиях фракция клеток в блоке G2/M и с высоким уровнем экспрессии β -гал увеличивается с 13 % (без ТФ) до 73 % (с ТФ), что свидетельствует

о приобретении ими фенотипа преждевременного старения. Таким образом, ТФ защищает опухолевые клетки линии B16/F10 от гибели, индуцированной DOX по пути апоптоза, включая программу преждевременного старения. По нашим данным, противоопухолевая активность DOX при лечении мышей с перевиваемой опухолью меланомы Me1B16 в комбинации с ТФ не отличается от эффективности цитостатика в режиме монотерапии.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ТФ снижает токсичность DOX для клеток меланомы мышей B16/F10 в условиях *in vitro* и не влияет на эффективность лечения препаратом перевиваемой опухоли мышей Me1B16.

Роль системы гемоксигеназа-1-ферритин в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуцированного бинарной каталитической системой (терафтал + аскорбиновая кислота)

Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, Д.А. Хоченков
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. Система гемоксигеназа-1 (ГО-1) – ферритин (Ф) является ключевой в физиологическом катаболизме гема и регуляции гомеостаза железа в клетке. В клинической онкологии в ходе лучевой, химио- и фотодинамической терапии в опухолевой клетке образуются активные формы кислорода (АФК). Гиперпродукция АФК приводит к развитию окислительного стресса в клетке, в ходе которого повреждаются гемопротейны и появляется «свободный» гем. Для защиты от избытка «гемового» железа в клетке индуцируется система ГО-1/Ф. Известно, что механизм цитотоксического действия противоопухолевого средства, бинарной каталитической системы терафтал + аскорбиновая кислота (БК (ТФ + АК)), связан с генерацией в клетке ROS. Предстояло выяснить роль системы ГО-1/Ф в защите опухолевых клеток от токсичности БК (ТФ + АК).

Материалы и методы. В работе использованы опухолевые клетки человека: эритролейкоза линии K562 и монобластного лейкоза линии U937. Базальный и препарат-индуцированный уровни экспрессии мРНК ГО-1 и Ф изучали методом ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени, экспрессию белков ГО-1 и Ф оценивали методом Вестерн-блотта, цитотоксичность препаратов – МТТ методом.

Результаты. По нашим данным, в клетках U937 выявляются базальные уровни экспрессии мРНК ГО-1 и Ф и белков, что свидетельствует о конститутив-

но-активной системе ГО-1/Ф в клетках. В этих же условиях в клетках линии K562 система ГО-1/Ф ингибирована на уровне мРНК ГО-1. В экспериментах *in vitro* установлено, что клетки с конститутивно-активной системой ГО-1/Ф (U937) оказались в 2 раза устойчивее к агентам, генерирующим АФК: БК (ТФ + АК) и H₂O₂ по сравнению с клетками, в которых отсутствует ГО-1 (K562). В присутствии известного индуктора, гемина, в клетках U937 наблюдается дальнейшее увеличение экспрессии мРНК ГО-1 и Ф и белков, что свидетельствует о функциональной активности данной системы. В условиях индукции гемом системы ГО-1/Ф выживаемость клеток U937 увеличивается в 2 раза при воздействии БК (ТФ + АК) и H₂O₂. Индукция системы ГО-1/Ф в клетках U937 в присутствии железосодержащего аналога ТФ («негемовой» природы) не влияет на цитотоксичность БК (ТФ + АК) и H₂O₂.

Выводы. Базальный уровень экспрессии ГО-1 в лейкозных клетках коррелирует с их чувствительностью к БК (ТФ + АК). Только препараты «гемовой» системы включают дополнительные механизмы защиты опухолевых клеток от токсичности БК (ТФ + АК).

Противоопухолевая эффективность рекомбинантного фактора некроза опухоли альфа человека в системе доставки

Г.М. Сысоева¹, Е.И. Рябчикова², Л.Р. Лебедев¹,
Е.Д. Даниленко¹

¹Институт медицинской биотехнологии – филиал ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск;

²ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, Новосибирск

Введение. Проблемой разработки лекарственных препаратов на основе фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α) для системного применения является недостаточная селективность его накопления в опухолевых клетках и, как следствие, высокий уровень эффективных доз и широкий спектр побочных эффектов. Методическим приемом, который был использован нами для улучшения терапевтических свойств ФНО-α, являлась разработка молекулярной конструкции, так называемой «вирусоподобной частицы» (ВПЧ), для депонирования белка и его транспортировки к клеткам-мишеням.

Задачи исследования. Изучение противоопухолевой активности ВПЧ-ФНО-α на экспериментальной модели меланомы B16F10.

Материалы и методы. Исследование проведено на мышцах линии C57Bl/6 с подкожно перевитой опухолью меланомы B16F10 (106 клеток/мышь). Препарат

ВПЧ-ФНО- α со специфической цитолитической активностью $1,55 \times 10^7$ МЕ/мг вводили внутривенно трехкратно или пятикратно с интервалом в 1 день, начиная с 11 суток после перевивки. Критерием эффективности служило торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение средней продолжительности жизни животных.

Результаты. Показано, что препарат ВПЧ-ФНО- α ингибировал рост первичной опухоли при обоих режимах введения. Показатель ТРО через сутки после окончания трехкратного введения препарата в дозах 5×10^4 МЕ/мышь или 1×10^5 МЕ/мышь составлял 57 и 64 % соответственно. Курсовое пятикратное введение в дозе 10^5 МЕ ингибировало рост опухоли в разных экспериментах на 46–52 % и увеличивало продолжительность жизни животных в среднем на 6,5 дня. Деструкция опухолевых клеток под действием препарата ВПЧ-ФНО- α сопровождалась образованием тромбов, разрушением кровеносных сосудов опухоли и накоплением в опухолевой ткани CD3- и CD11b-положительных клеток, что свидетельствует об индукции под действием препарата противоопухолевой иммунной реакции.

Выводы. Полученные данные подтверждают тот факт, что препарат рекомбинантного ФНО- α человека в средстве доставки обладает противоопухолевым действием, которое реализуется через механизмы, характерные для природного ФНО- α .

Восстановление чувствительности к доксорубину лейкозных клеток ТНР-1, инфицированных цитомегаловирусом, под действием ингибитора полиаминов MDL72.527

Я.Ю. Чернорыж¹, Н.Ф. Закирова², О.А. Смирнова²,
С.С. Емельянова³, К.И. Юрлов¹, Н.Е. Федорова¹,
Г.Р. Виноградская³, В.Н. Вербенко³, А.В. Иванов²

¹ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,
Москва;

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

³ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский Институт»,
Гатчина, Ленинградская обл.

Резистентность к противоопухолевым препаратам снижает эффективность ХТ, однако молекулярные пути формирования резистентности изучены недостаточно. Ранее мы показали, что в клетках моноцитарной лейкемии ТНР-1 при заражении цитомегаловирусом человека (ЦМВ) блокируется апоптоз и утрачивается чувствительность к доксорубину (ДОКС). Маркеры ЦМВ обнаружены во многих опухолях разного происхождения, однако оставалось

неясным, может ли влиять ЦМВ на резистентность к ДОКС латентно инфицированных опухолевых клеток. Для ответа на этот вопрос было изучено действие ДОКС на клетки ТНР-1 через 7 сут после заражения ЦМВ, когда отсутствовала активность вирусного генома. Анализ жизнеспособности незараженных клеток ТНР-1 показал, что гибель под действием ДОКС достигала 64 %, тогда как гибель зараженных клеток составляла 28 %. Таким образом, установлена резистентность к ДОКС латентно инфицированных клеток ТНР-1.

Так как биогенные полиамины влияют на пролиферацию, дифференцировку и гибель клеток, оценивали возможное их воздействие на чувствительность клеток ТНР-1 к ДОКС. Использовали ингибитор катаболизма полиаминов MDL72.527. Показано, что MDL72.527 восстанавливает чувствительность инфицированных клеток к ДОКС. Для изучения механизмов действия MDL72.527 анализировали уровни экспрессии трех ключевых ферментов метаболизма полиаминов: ODC, SSAT и SMO. Показано, что уровень мРНК ODC снижается в 1,6 раза в ЦМВ-инфицированных клетках, обработанных ДОКС (резистентных), по сравнению с неинфицированными клетками, обработанными ДОКС. Под действием MDL72.527 уровень мРНК ODC увеличивается в 1,5–1,8 раза в обработанных ДОКС клетках. При этом снижение уровня белка в клетках наблюдалось в ответ на обработку MDL72.527 или ДОКС вне зависимости от присутствия вируса. Отсутствие корреляции между уровнями мРНК и белка может объясняться регуляцией на уровне деградации фермента. Уровень транскрипции гена, кодирующего SSAT, под действием ДОКС значительно увеличивается: в 3,5 раза в неинфицированных клетках ТНР-1 и в 13,2 раза – в ЦМВ-инфицированных клетках. MDL72.527 ослабляет транскрипцию гена в присутствии DOX в обоих случаях. Изменения уровня мРНК не сопровождалось заметными изменениями активности SSAT. Исключением было двукратное снижение активности в случае комбинации DOX и MDL72.527. На экспрессию гена SMO заметного влияния ЦМВ и DOX не оказывали. Для выяснения роли полиаминов в регуляции чувствительности лейкозных клеток ТНР-1 к ДОКС требуются дальнейшие исследования, однако очевидно, что процессы метаболизма полиаминов – перспективная мишень для преодоления резистентности опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
РФФИ (грант № 17-04-00812).*

Цитотоксическая активность новых фторсодержащих модифицированных дигидробензизоксазолонов

М.А. Ястребова^{1,2}, Ю.А. Пивень³, А.М. Щербаков¹,
Т.С. Хлебникова³, Ф.А. Лахвич³

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

²ФГБУН «Институт биологии гена РАН», Москва;

³ГНУ «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Бензизоксазолы и их аналоги являются важными фармакофорами, которые входят в состав ряда биологически активных веществ, обладающих противоопухолевым, противовоспалительным, противовирусным и другими видами действия. Селективное введение атомов фтора и фторалкильных групп в биоактивные молекулы является эффективной стратегией дизайна лекарственных препаратов. Новые производные фторсодержащих 6,7-дигидробенз[*d*]- и [с]изоксазолонов (1–5) синтезированы путем их оксимирования

и последующего О-ацилирования полученных оксимов хлорангидридами фторбензойных кислот. С помощью МТТ-теста на клетках РМЖ и РПЖ исследована цитотоксическая активность синтезированных соединений. Соединения 1, 4 и 5 не оказывали значительных цитотоксических эффектов на клетки РМЖ линии MCF-7 и клетки РПЖ линии DU145. Наибольшую активность проявили соединения 2 и 3, при инкубации с этими соединениями выживаемость опухолевых клеток падала на 50–60 % по сравнению с контролем. Методом иммуоблоттинга исследована экспрессия ряда белков в клетках MCF-7. Обнаружено, что соединение 3 вызывает снижение экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона – ключевых регуляторов пролиферации гормонозависимого рака.

Полученные фторсодержащие модифицированные дигидробензизоксазолы представляют интерес для дальнейшей разработки новых лекарственных кандидатов.

Синтетическая часть работы выполнена при финансовой поддержке БРФФИ – X18УКА-011, биологические эксперименты поддержаны РФФИ (грант № 18-29-09 017).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ (ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА Г.И. АБЕЛЕВА)

Доклады

Эстрогеновые рецепторы β в ткани рака яичников как предикторы эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов

А.А. Башарина, Т.А. Богущ, А.С. Тюляндина,
А.Н. Гришанина, Е.А. Богущ, Н.О. Вихлянцева,
С.А. Тюляндин

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. Известен вклад мишеней эстрогенов — эстрогеновых рецепторов α и β (ER α и ER β) — в реализацию воздействия стимулирующих и ингибирующих регуляторов опухолевого роста, следовательно, уровень экспрессии этих молекулярных маркеров в опухоли может влиять на эффективность цитостатиков, ассоциированных с клеточной пролиферацией.

Задачи исследования. Оценка прогностической значимости ER α и ER β и предсказание эффективности 1-й линии адьювантной ХТ рака яичников препаратами платины и таксанов.

Материалы и методы. В исследование включена 31 больная серозным раком яичников с унифицированными клиническими показателями: III стадия заболевания, высокая степень злокачественности опухоли, неоптимальная хирургическая циторедукция, 1-я линия адьювантной ХТ, 6 курсов препаратов платины и таксанов. Методом проточной цитофлуориметрии исследована экспрессия ER α и ER β в хирургических образцах рака яичников. Использованы первичные антитела к ER α (ab16660), к ER β (ab288) и вторичные антитела, конъюгированные с DyLight650 (ab98510 и ab98729). Рассчитан уровень экспрессии маркера — доля (%) специфически флуоресцирующих клеток

относительно контроля (после инкубации только с вторичными антителами). Корреляция этого показателя с продолжительностью безрецидивного периода болезни оценена при построении кривых Каплана—Майера (*log-rank*), соотношение рисков развития рецидива — методом регрессии Кокса.

Результаты. ER α и ER β выявлены во всех исследованных образцах опухолей, при этом средний показатель для ER β более чем в 1,5 раза превышает значение для ER α — $41,7 \pm 12,4$ % против $25,9 \pm 11,1$ % ($p = 0,001$). Только в 1 из 31 случая уровень экспрессии ER α был незначительно выше, чем ER β (48 % против 38 %). Согласно принятым в клинических исследованиях правилам деление исследованных опухолей на группы с высоким и низким уровнем экспрессии проведено относительно медианы. Соответственно, для ER α — это \leq и >25 %, для ER β — \leq и >40 %.

При построении кривых Каплана—Майера показано, что показатель уровня экспрессии ER β обладает статистически достоверной предиктивной информативностью. У пациенток с низким уровнем экспрессии ER β медиана продолжительности безрецидивного периода составила 8 мес, тогда как с высоким — более чем в 2 раза больше (18 мес; $p = 0,02$). Риск возникновения рецидива в группе с низким уровнем экспрессии ER β в опухоли был в 2,5 раза выше, чем при высокой экспрессии маркера (95 % ДИ 1,3–6,6; $p = 0,04$). В то же время прогностической значимости уровня экспрессии в опухоли ER α не выявлено ($p = 0,67$).

Выводы. Высокий уровень экспрессии ER β (>40 %) является благоприятным предиктивным маркером эффективности 1-й линии адьювантной ХТ с препаратами платины и таксанов у больных III стадии серозного рака яичников высокой степени злокачественности при неоптимальной хирургической циторедукции.

Прогностический и диагностический потенциал панели новых маркеров гепатоцеллюлярной карциномы

А.А. Будко^{1,2}, М.С. Чесноков¹, Л.М. Дьяков¹, П.А. Хесина^{1,3},
Д.А. Шавочкина¹, И.Ф. Кустова¹, Н.Е. Кудашкин¹,
Е.А. Мороз¹, Ю.И. Патютко¹, Н.Л. Лазаревич^{1,3}

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

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

³биологический факультет ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) является наиболее злокачественной первичной опухолью печени. Текущий диагностический подход включает магнитно-резонансную томографию, биопсию и анализ уровня альфа-фетопротеина. Однако ни один из этих методов не обладает ни достаточной диагностической специфичностью и чувствительностью, ни прогностической значимостью. Существуют проблемы дифференциальной диагностики между подвидами гепатоцеллюлярной аденомы (ГЦА) и ГЦК, постановки диагноза фиброламельлярной ГЦК, а магнитно-резонансная томография не диагностирует около 20 % случаев ГЦК (атипично васкуляризованная ГЦК). Таким образом, поиск новых маркеров и их сочетаний, улучшающих диагностику и при этом имеющих прогностический потенциал, по-прежнему актуален.

В исследовании использовано 65 пар хирургических биоптатов (опухоль и ткань печени) пациентов с ГЦА ($n = 7$), фокальной нодулярной гиперплазией (ФНГ) ($n = 8$) и ГЦК ($n = 50$). На основании данных полнотранскриптомного секвенирования 50 пар образцов была выбрана панель генов, гиперэкспрессированных в ГЦК: *RAB3B*, *IQGAP3*, *GPC3*, *PRRX1*, *HKDC1*, *TOP2A*, *GNAZ*, *PDGFA* и *CENPF*. Их экспрессия была верифицирована методами количественной ПЦР в режиме реального времени и ИГХ. Данные статистически обработаны и иерархически кластеризованы в целях выделения общих групп. Для построения кривых выживаемости использовали как данные текущего исследования, так и данные TCGA.

Значительное ($p < 0,05$) повышение экспрессии в образцах ГЦК по сравнению с неопухолевыми тканями печени, ФНГ и ГЦА зафиксировано для *PRRX1* ($p = 6,2 \times 10^{-7}$), *IQGAP3* ($p = 8,8 \times 10^{-8}$), *CENPF* ($p = 5,1 \times 10^{-4}$) и *RAB3B* ($p = 0,003$). Для генов *HKDC1*, *GPC3*, *PDGFA*, *TOP2A* и *GNAZ* различия между доброкачественными новообразованиями (ФНГ, ГЦА) и ГЦК статистически не выявлены. Ретроспективно показано, что метод диагностики ГЦК, основанный на комбинации *CENPF*, *IQGAP3*, *PRRX1*, обладает специфичностью 91,2 % и чувствительностью 92,0 % с площадью под ROC-кривой 96,8 %. Также продемонстрировано,

что образцы фиброламельлярной ГЦК характеризуются значительно более высоким уровнем экспрессии *PRRX1*, чем трабекулярные варианты ($p = 8,91 \times 10^{-4}$). Корреляционный анализ по Спирмену выявил слабую корреляцию экспрессии *CENPF*, *IQGAP3*, *PRRX1*, *RAB3B* с рядом клинических параметров. На основании данных TCGA и текущего исследования показано, что уровень гиперэкспрессии *CENPF*, *IQGAP3*, *PRRX1*, *RAB3B* может использоваться как предиктор общей и безрецидивной выживаемости ($p < 0,001$).

Гиперэкспрессия *IQGAP3*, *PRRX1*, *CENPF*, *RAB3B* специфична для ГЦК, но не для неопухолевого ткани печени, ФНГ или ГЦА. Комбинация *CENPF*, *IQGAP3*, *PRRX1* обладает высокой диагностической и прогностической мощностью для ГЦК и позволяет не только дифференцировать ГЦК от доброкачественных новообразований печени, но и предсказывать общую выживаемость пациентов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-315-00376).

Биохимические признаки дефекта ферментов адреналового стероидогенеза у больных с новообразованиями коры надпочечников на основе метода газовой хромато-масс-спектрометрии

Великанова Л.И., Ворохобина Н.В., Шафигуллина З.Р.,
Малеваная Е.В., Стрельникова Е.Г.

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

Задачи исследования. Установить биохимические признаки дефектов 21-гидроксилазы (21-Г) и 11 β -гидроксилазы (11 β -Г) у больных с новообразованиями коры надпочечников на основе исследования стероидных профилей мочи методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХМС).

Материалы и методы. Обследовали 136 пациентов (33 мужчины и 103 женщины) с адренокортикальной аденомой (АКА) со средним возрастом 52 года (45–61 год) и 39 больных (9 мужчин и 30 женщин) адренокортикальным раком (АКР) со средним возрастом 49 лет (38–59 лет) с суммой баллов по шкале L. M. Weiss более 4. Методом ГХМС исследовали стероидные профили мочи на газовом хромато-масс-спектрометре SHIMADZU GCMS – QP2010 ULTRA (идентифицировано 68 стероидов). Неклассические формы врожденной дисфункции коры надпочечников установлены на основании пробы с синтетическим аналогом

кортикотропина (синактен-депо), по данным ИФА, высокоэффективной жидкостной хроматографии и результатам генетического исследования. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Statistica для Windows (версия 7).

Результаты. Неклассические формы врожденной дисфункции коры надпочечников с дефектом 21-Г установлены у 9 (6,6 %) пациентов с АКА. Методом ГХМС получены пороговые значения для соотношений (ТНФ+allo-ТНФ+ТНЕ)/P3 < 2,5; (ТНФ+allo-ТНФ+ТНЕ)/11-охо-P3 < 20 и (ТНФ+allo-ТНФ+ТНЕ)/17-P < 12. Неклассическая форма врожденной дисфункции коры надпочечников с дефектом 11β-Г установлена у 4,4 % больных с АКА. У 11 (28,2 %) больных АКР получены признаки недостаточности 21-Г: увеличение экскреции с мочой P3 – 4363 мкг/24 ч (2200–5861 мкг/24 ч); $p = 0,0004$; 11-охо-P3 – 440 мкг/24 ч (121–676 мкг/24 ч); $p = 0,0002$; 17-P – 1100 мкг/24 ч (640–2425 мкг/24 ч), 21-дезоксиг-ТНФ – 1069 мкг/24 ч (881–1258 мкг/24 ч); снижение соотношений (ТНФ+allo-ТНФ+ТНЕ)/11-охо-P3 – 19 (11–22); $p = 0,003$; (ТНФ+allo-ТНФ+ТНЕ)/P3 – 2,5 (1,4–3,8); $p = 0,04$; (ТНФ+allo-ТНФ+ТНЕ)/17-P – 8,5 (3,1–15,4); $p = 0,005$. У 29 (74,3 %) больных АКР повышение экскреции с мочой тетрагидро-11-дезоксикортизола (ТНС) до 1355 мкг/24 ч (750–3279) мкг/24 ч; $p < 0,0001$ и гексагидро-11-дезоксикортизола до 709 мкг/24 ч (187–2079 мкг/24 ч); $p < 0,01$; снижение соотношения (ТНФ+allo-ТНФ+ТНЕ)/ТНС до 3,8 (1,9–13,3); $p < 0,0001$ могут указывать на уменьшение активности 11β-Г. У больных АКА с неклассической формой врожденной дисфункции коры надпочечников и АКР были определены неклассические 5-ene-прегнены (16-ОН-прегненолон, 21-ОН-прегненолон, 11-ОН-прегнентриол, 3β-прегнентриол), не обнаруженные у больных АКА без злокачественного потенциала и признаков недостаточности 21-Г и 11β-Г.

Заключение. Методом ГХМС получены характерные стероидные профили мочи недостаточности 21-Г и 11β-Г у 11 % больных АКА и 79,5 % больных АКР, что указывает на большую роль этих ферментов в патофизиологии АКР.

Примечание. ТНФ – тетрагидрокортизол, ТНЕ – тетрагидрокортизон, P3 – прегнантриол, 17-P – 17-гидроксипрегненолон.

Диагностическая значимость маркеров p53, p16, WT1 в аспирационном материале из полости матки у больных серозным раком яичников

Н.Н. Гокадзе, М.В. Савостикова, Ю.Г. Паяниди, С.В. Винокурова, К.И. Жордания

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова»
Минздрава России, Москва

Пятилетняя выживаемость больных раком яичников (РЯ) не превышает 35 %. По современным представлениям до 75 % наблюдений самой агрессивной формы РЯ, а именно high-grade серозной низкодифференцированной карциномы, происходит из серозной интраэпителиальной карциномы фимбриального отдела маточной трубы. Мутация гена-супрессора опухолевого роста TP53 и, как следствие этого, положительная экспрессия белка p53, наряду с положительной реакцией маркеров WT1 и p16, характерных для high-grade серозной карциномы, являются критериями морфологической диагностики данного типа опухолей. Для повышения эффективности диагностики РЯ на основании иммуноцитохимического (ИЦХ) исследования аспирационного материала из полости матки в последнем была оценена диагностическая значимость уровней экспрессии маркеров p53, p16, WT1. У 31 больного серозным РЯ, 15 больных с доброкачественными опухолями яичников, 14 больных с метастатическим поражением яичников и 19 женщин без онкогинекологической патологии выполнено цитологическое и ИЦХ-исследование вышеуказанных маркеров в аспирационном материале из полости матки, полученном в амбулаторных условиях с помощью зонда типа Пайпель. Для цитологического исследования полученного материала и проведения ИЦХ приготовлены цитоспиновые многослойные препараты системы Cytospin. ИЦХ-исследование с моноклональными антителами к p53, p16, WT1 выполнено на иммуногистоцестейнере Ventana (BenchMarkULTRA).

В ходе данного исследования установлено, что при серозном РЯ при цитологическом анализе в 74,2 % (в 23 из 31) случаев в аспирате из полости матки либо смыве определяются клетки карциномы, при ИЦХ-исследовании – в 87,0 % (в 27 из 31), при совместном использовании цитологического и ИЦХ методов – в 90,3 % (в 28 из 31). Во всех остальных наблюдениях (доброкачественные опухоли, метастазы в яичники и контрольная группа) аналогичных результатов не наблюдалось. В ходе данного исследования разработан современный подход к диагностике серозного РЯ и формированию групп риска на основании оценки вышеперечисленных предикторов.

Экспрессионные характеристики таргетных генов при раке желудка и их связь с метастазированием

Ф.М. Кипкеева¹, Т.А. Музаффарова¹, М.П. Никулин²,
П.В. Апанович¹, С.Н. Неред², М.Н. Нариманов²,
О.А. Малихова², И.С. Стилиди², А.В. Карпухин¹

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

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

Рак желудка (РЖ) является одной из ведущих причин смерти от онкологических заболеваний. Высокая смертность больных РЖ в основном обусловлена переходом болезни в метастатическую стадию. В связи с этим существует необходимость разработки эффективной терапевтической стратегии, опирающейся на прецизионную медицину. В настоящей работе на образцах диссеминированного РЖ (ДРЖ) и РЖ на более ранних стадиях были проанализированы профили экспрессии генов-мишеней имеющих и разрабатываемых таргетных препаратов.

Методом количественной ПЦР в реальном времени в парных образцах опухоль – норма (55 пар образцов) изучали профили экспрессии матричных РНК генов *VEGF*, *VEGFR1*, *VEGFR2*, *NRP1*, *bFGF*, *FGFR2*, *TGF-β*, *HER2/neu*.

Экспрессия всех исследованных генов с разной частотой была повышена как при РЖ, так и при ДРЖ. Экспрессионные профили на этих стадиях различались. Повышенная экспрессия генов *VEGFR1*, *VEGFR2* и *NRP1* при ДРЖ наблюдалась примерно в 2 раза чаще, чем при РЖ без отдаленных метастазов, что может свидетельствовать о перспективности таргетных препаратов против этих генов. Частота повышенной экспрессии гена *FGFR2* при ДРЖ составила всего 5 %. Напротив, при более ранних стадиях РЖ половина больных имели повышенную экспрессию этого гена. Следовательно, разрабатываемый таргетный препарат против *FGFR2*, скорее всего, при ДРЖ будет иметь весьма ограниченную частоту эффективного действия.

Ассоциация уровней экспрессии с метастазированием найдена для генов *FGFR2*, *VEGFR1* и *NRP1*, что указывает на их значение для перехода в эту стадию и может иметь практическое значение для разработки соответствующих маркеров. Высокая частота экспрессии гена *FGFR2* и обнаруженное ее значение определяют возможность применения таргетного средства для предотвращения перехода опухоли в метастатическую стадию.

Как при ДРЖ, так и на более ранних стадиях, обнаружена корреляция уровней экспрессии генов *TGF-β*, *NRP1* и *VEGFR2*, которую следует учитывать при таргетной терапии. Также впервые на образцах опухолевой ткани больных ДРЖ/РЖ была обнаружена обратная зависимость экспрессии генов *VEGF-A* и *bFGF*

($R = -0,73$; $p = 0,0046$). Такая зависимость может отражать компенсаторный механизм, позволяющий сохранить опухолевый ангиогенез, и, как следствие, – потенциальную причину устойчивости к анти-*VEGF*-терапии.

Таким образом, знание особенностей функционирования генов-мишеней на разных стадиях РЖ, в том числе при переходе к диссеминированному состоянию, может привести к повышению эффективности лечения, в том числе путем снижения риска образования метастазов.

Построение индивидуального филогенетического дерева эволюции опухоли пациента как новая основа для назначения предоперационной химиотерапии в целях элиминации метастатических клонов

Н.В. Литвяков^{1,2}, Е.М. Слонимская¹, М.К. Ибрагимова^{1,2},
П.В. Казанцева¹, М.М. Цыганов^{1,2}, И.В. Дерюшева¹,
А.В. Дорошенко¹, Ю.А. Небова¹, Е.Ю. Гарбуков¹

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

В наших предыдущих исследованиях было показано, что наличие в опухоли молочной железы клонов с амплификациями 2 хромосомных регионов и более (3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 18chr, 19p), в которых локализованы гены стволовости, сопряжено с очень высоким риском метастазирования. Если в остаточной резидуальной опухоли после проведения неоадьювантной ХТ (НХТ) отмечаются амплификации генов стволовости, в 50 % случаев происходит гематогенное метастазирование. Если в процессе НХТ клоны с амплификациями генов стволовости элиминировались, у пациентов отмечается 100 % безметастатическая выживаемость. В связи с этим мы назвали опухолевые клоны с амплификациями генов стволовости метастатическими клонами. НХТ позволяет в 48 % случаев элиминировать метастатические клоны до проведения операции. Возникает вопрос, почему у части больных метастатические клоны под действием НХТ не элиминируются, что приводит к высокому риску метастазирования. Был разработан математический аппарат, который на основе показателей CNState микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, США) позволяет восстановить филогенетическое дерево эволюции опухоли каждого пациента по биопсии опухоли до лечения. Весь этот период времени от начала канцерогенеза до биопсии условно разделяется на 100 единиц. Вся опухолевая масса в любой момент времени принимается за 100 %.

С помощью CNState определяется представленность каждого клона и определяется время его происхождения от драйверного ствола.

Были проанализированы филогенетические деревья больных, у которых метастатические клоны элиминировались в процессе НХТ, и больных, у которых НХТ не дала такого эффекта. Кроме этого, мы посмотрели, на какие клоны в составе древа была направлена НХТ. В подавляющем большинстве случаев, когда метастатические клоны не элиминировались, они развивались в опухоли в 1-й половине канцерогенеза и были драйверными. Если метастатические клоны развивались во 2-й половине канцерогенеза, они элиминировались в процессе НХТ с высокой частотой. Если мишени действия ХТ, такие как амплификация гена *TOP2a* для антрациклинов, делеция *TUBB3* для таксотера, делеция *BRCA1* для терапии цисплатином и др., находились в клонах, филогенетически более древних по сравнению с метастатическими клонами (в идеале в драйверном клоне), то метастатические клоны элиминировались в процессе НХТ. В тех же случаях, если НХТ была подобрана без учета мишеней или мишени действия схемы НХТ принадлежали клонам, которые происходили позже, чем метастатические клоны, метастатические клоны в процессе ХТ не элиминировались.

Таким образом, для элиминации метастатических клонов необходимо построить филогенетическое древо эволюции опухоли пациента и подобрать терапию на мишени клонов, более древних, чем метастатические клоны.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-15-01 203).

Два новых алгоритма стадирования рака предстательной железы на основе лабораторных и клинических данных до начала лечения

Н.С. Сергеева¹, Т.Е. Скачкова¹, Б.Я. Алексеев¹,
С.А. Пирогов², Е.Ф. Юрков², В.Г. Гитис²

¹МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН», Москва

РПЖ занимает одно из лидирующих мест в структуре онкологической заболеваемости мужчин во всем мире. По общемировым данным, при использовании известных до начала лечения параметров (в сопоставлении с данными окончательного диагноза) ошибки в стадировании в целом составляют от четверти до половины случаев. В западной литературе описан ряд алгоритмов, с использованием которых удастся решать некоторые, но далеко не все из этих проблем.

На 1-м этапе настоящей работы была создана база данных, включающая медицинскую информацию о 337 больных РПЖ, и проанализированы все виды ошибок дооперационного стадирования. На 2-м этапе путем метода линейной логистической регрессии разработаны 2 новых мультипараметрических алгоритма.

Первый алгоритм – ЛИКС-В (Лабораторный Индекс Клинического Стадирования, включающий поправку на Возраст пациента) – был составлен на основе только лабораторных данных (концентрации общего ПСА (общПСА), свободного ПСА (свПСА) (нг/мл) и [-2] проПСА (пг/мл) в сыворотке крови по калибровке Hybritech) до начала лечения.

$$\text{ЛИКС-В} = \left(\frac{[-2] \text{ проПСА}}{\text{свПСА}} \right)^{3/2} \times (\text{общПСА})^{-2} \times (\text{общПСА})^{4/3} / 100 + 1,5 \times \text{возраст},$$

где возраст – число полных лет.

Второй алгоритм – ВИЗГ (Возраст + Индекс Здоровья предстательной железы + сумма баллов по шкале Глисона (индекс Глисона) + стадия TNM) – основан на тех же лабораторных данных и дополнительно включает ряд клинических результатов обследования пациента.

$$\text{ВИЗГ} = 0,025 \times \text{возраст} + 0,01 \times \frac{[-2] \text{ проПСА}}{\text{свПСА}} \times \sqrt{\text{общПСА}} + \text{гр. ин. Глисона} + 0,6 \times \text{гр. Т},$$

где гр. ин. Глисона (группа индекса Глисона) имеет ранговое значение «1», если индекс Глисона по результатам биопсии <7, «2» – 7 (3 + 4), «3» – 7 (4 + 3) и «4» – >7; гр. Т (группа Т) имеет ранговое значение «1» при T1N0 или T2N0, «2» при T3N0. При стадировании использована TNM-классификация злокачественных опухолей 7-го издания.

В исследовании проанализирована клиническая значимость этих алгоритмов на обучающей выборке данных и разработан ряд решающих правил, позволяющих избежать более половины ошибок стадирования РПЖ до начала лечения пациента. Определены «серые зоны» алгоритмов: ЛИКС-В – 90–150 ед., ВИЗГ – 3,6–4,7 ед.

Для удобства применения в клинической практике была создана компьютерная программа «Калькулятор расчета мультипараметрических показателей для дооперационного стадирования рака предстательной железы», которая позволяет врачу, введя данные пациента, получить заключение о статусе опухолевого процесса и обоснование этого заключения на основе диагностических правил.

Разработанные алгоритмы и компьютерная программа позволяют избежать значительной части ошибок при вынесении заключения об индолентности или агрессивности РПЖ до начала лечения, и, как следствие, выбрать адекватный объем лечебных мероприятий.

Частота экспрессии мутантной киназы Anaplastic Lymphoma Kinase и онкобелка TAG-72, их связь с морфологическими параметрами первичной меланомы кожи

К.С. Титов¹, Д.А. Рябчиков², А.М. Казаков², И.А. Дудина³,
И.К. Воротников²

¹ГБУЗ «МКНЦ им. А.С. Логинова ДЗМ», Москва;

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

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава
России, Москва

Введение. Современный этап развития диагностики и лечения первичной меланомы кожи диктует необходимость поиска новых мишеней для таргетной терапии и новых маркеров для улучшения диагностики. Одной из таких мишеней является ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) – мутация, исследуемая в других опухолях (НМРЛ, анапластическая лимфома) и выявляемая при первичной меланоме кожи, по данным литературы, в 8–10 % случаев. Возможный новый диагностический маркер – TAG-72 (Tumor associated protein 72), изучающийся при анарктальной меланоме и претендующий на диагностическое значение при первичной меланоме кожи.

Задачи исследования. Определить частоту экспрессии тирозинкиназы мутированного гена *ALK* и онкобелка TAG-72 у пациентов с первичной меланомой кожи, определить их связь с рядом морфологических параметров, оценить диагностическую ценность определения *ALK* и TAG-72.

Материалы и методы. Операционный материал от 40 больных с первичной меланомой кожи исследован гистологическим и ИГХ-методами. Для рутинного гистологического исследования материал фиксировали 10 % нейтральным формалином в течение 24 ч, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 4–5 мкм, окрашивали гематоксилином и эозином.

Исследование ИHC с моноклональными антителами D57.3 (для *ALK*) проводили на иммуностендере – Ventana с антителами B72.3 для TAG-72 – на Thermo Fischer. Системы детекции: Envision – для TAG-72, Ventana – для *ALK*. Оценку статистической значимости результатов выполняли путем вычисления коэффициента корреляции методом рангов.

Результаты. *ALK*-мутантный белок был обнаружен в 7 (12 %), TAG-72 – в 4 (10 %) случаях. Оценка корреляционной силы между экспрессией *ALK* и TAG-72 показала прямую среднюю силу связи (коэффициент корреляции 0,31). Была выявлена прямая связь средней силы между наличием у пациента онкомаркера TAG-72, мутации *ALK* и изъязвлением – коэффициент корреляции составил 0,53 и 0,68 соответственно.

Наблюдалась статистически значимая связь наличия *ALK* с лимфоидной инфильтрацией, которая в большинстве случаев была выраженной ($p < 0,05$).

Выводы. Данная мутантная киназа и онкомаркер имеют определенную частоту встречаемости в популяции российских пациентов с первичной меланомой кожи. В будущем это может дать возможность применения ингибиторов *ALK* (энсартиниб, церитиниб) у пациентов с данной мутацией. TAG-72 возможен в качестве диагностического маркера. Корреляция *ALK*, TAG-72 с морфологическими параметрами говорит о потенциальной ценности данного явления для усовершенствования диагностики первичной меланомы кожи.

Гликозилированные молекулы в диагностике и лечении глиобластомы

А.Ю. Цидулко¹, Г.М. Казанская², А.М. Волков²,
А.В. Суховских^{1,3}, Р.С. Киселев^{2,4}, В.В. Кобозев²,
Т.М. Панкова¹, А.С. Гайтан^{4,5}, А.Л. Кривошапкин^{4,5},
С.В. Айдагулова⁴, Э.В. Григорьева^{1,3}

¹ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН»,
Новосибирск;

²ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава
России, Новосибирск;

³ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», Новосибирск;

⁴ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский
университет» Минздрава России, Новосибирск;

⁵Европейский медицинский центр, Москва

Глиобластома до сих пор является одной из самых агрессивных опухолей, методы лечения которой недостаточно эффективны, и поиск новых биомаркеров и молекулярных мишеней для ее диагностики и терапии остается крайне актуальной задачей. В этом контексте особое значение имеют работы по изучению вовлеченности гликозилированных макромолекул (таких как протеогликаны) в патогенез глиобластомы. Являясь одним из основных компонентов внеклеточного матрикса ткани головного мозга, протеогликаны вносят значительный вклад в поддержание межклеточных взаимодействий и патологическую трансформацию внеклеточного матрикса в опухолевое микроокружение.

В данной работе проведены сравнительный анализ уровней экспрессии основных протеогликанов в нормальной и опухолевой ткани головного мозга человека (ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени, ИГХ- и иммунофлуоресцентный анализ белковых и углеводных эпитопов, оценка выживаемости методом Каплана–Майера) и исследование эффектов общепринятой схемы ХТ в экспериментальных моделях *ex vivo* (органотипические срезы головного мозга) и *in vivo* (крысы Вистар).

Показано, что не только активация экспрессии коровых белков некоторых протеогликанов (CSPG4/NG2, перлекан) в опухолевой ткани, но и повышенное содержание углеводных цепей гепарансульфата тесно ассоциированы с неблагоприятным прогнозом течения заболевания и могут служить отрицательными прогностическими факторами при развитии глиобластомы. Темозоломид, являющийся основным химиопрепаратом для адьювантной ХТ глиобластомы, и дексаметазон (в качестве противоточного препарата сопровождающей терапии) оказывают значительное воздействие как на транскрипционную активность генов, кодирующих коровые белки протеогликанов, так и на содержание их углеводных цепей (гепарансульфат, хондроитинсульфат) в нормальной ткани головного мозга экспериментальных

животных. Значительные изменения содержания и локализации протеогликанов в ткани головного мозга под действием этих препаратов, по-видимому, способствуют его трансформации в проопухолевое микроокружение и ускоренной инвазии клеток глиобластомы.

В целом полученные данные выявляют важную роль протеогликанов внеклеточного матрикса ткани головного мозга в качестве потенциальных внеклеточных прогностических биомаркеров и возможных мишеней для совершенствования антиопухолевой терапии глиобластомы и предотвращения рецидива заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 16-15-10243). А. Ю. Цидулко поддержана стипендией Президента Российской Федерации (SP-5435.2018.4).

Постеры

Влияние клинико-патологоанатомических характеристик опухоли на чувствительность неинвазивной ПЦР-диагностики колоректального рака

Г.М. Бутрович, Е.Д. Мирлина, О.А. Вострюхина

ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Ленинградская обл.

Введение. Ранее авторами была представлена ПЦР-диагностика колоректального рака (КРР) на основе выявления в фекалиях протяженных фрагментов ДНК, по присутствию которых судят о наличии КРР у пациента. Чувствительность и специфичность метода составили соответственно 76 и 100 % ($p < 0,0001$). Не было выявлено значимых различий в чувствительности данного теста для пациентов с разными стадиями заболевания, что позволяет использовать его для ранней диагностики КРР.

Задачи исследования. В представленном исследовании авторы провели анализ чувствительности данного метода для разных отделов толстой кишки, а также в зависимости от клинико-патологоанатомических характеристик опухоли (эндофитного либо экзофитного роста опухоли, наличия в ней некроза, степени дифференцировки опухоли).

Материалы и методы. Образцы фекалий, предоставленные хирургическим отделением ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, были получены у 103 человек, из них 79 пациентов с КРР и 24 здоровых добровольца (контрольная группа). Для пациентов с КРР диагноз был подтвержден гистологически; также были получены демографические и клинико-патологоанатомические данные пациентов и опухолей. Целостность ДНК, выделенной из фекалий, оценивали методом ПЦР-анализа на наличие 2 протяженных фрагментов: фрагмент гена *TP53* длиной 800 н. п. и фрагмент гена *MLH1* длиной 2340 н. п.

Для статистического анализа данных использовали программу Graphpad Instat. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Показано, что чувствительность метода для прямой кишки по сравнению с другими отделами толстой кишки достоверно выше – 85,0 % против 62,5 % ($p = 0,0314$). Принимая во внимания принцип действия рассматриваемого метода, результат ожидаемый, так как раковые клетки, происходящие

из наиболее удаленных от анального отверстия отделов толстой кишки, находятся в просвете кишечника существенно большее время, чем клетки из прямой кишки, и в большей степени подвергаются разрушительному действию ферментов, в результате чего их ДНК больше деградирует.

Чувствительность метода диагностики КРР при обнаруженном в опухоли некрозе составила 89 %, в отсутствие некроза – 69 %; эти различия статистически не являются достоверными ($p = 0,0562$), но можно говорить о заметной тенденции в повышении чувствительности при наличии некроза. Не выявлено статистически значимых различий между чувствительностью метода в отношении опухолей с эндофитным или экзофитным ростом ($p = 0,4087$), а также в отношении опухолей с разной степенью дифференцировки.

Выводы. Полученные данные будут способствовать корректному использованию метода неинвазивной ПЦР-диагностики КРР в клинической практике.

RAD50 и SLC34A2 – потенциальные предиктивные маркеры ответа опухолей яичника на терапию препаратами платины

К.В. Гавриш¹, К.А. Кузин², Т.И. Фетисов²,
К.И. Кирсанов^{2,3}, Р.Г. Киямова¹

¹ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Республика Татарстан;

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

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

Из всех гинекологических злокачественных новообразований рак яичника (РЯ) является ведущей причиной смерти в мире. Пациенты с РЯ довольно часто хорошо отвечают на схемы 1-й линии ХТ, однако более чем у 20 % больных уже в течение первых 6 мес после лечения возникают рецидивы. Химиорезистентность после 2-й линии терапии наблюдается уже более чем в 90 % случаев. В связи с этим важно понимать молекулярные механизмы возникновения химиорезистентности при РЯ, в том числе путем выявления генов, которые могут участвовать в этом процессе. Данная работа направлена на выявление новых молекулярных маркеров для предсказания ответа на ХТ РЯ препаратами на основе платины.

В ходе предварительных исследований нами выявлены несколько потенциальных маркеров, включая

гены *RAD50* и *POLR2L*, вовлеченные в процесс репарации ДНК, а также фосфатный транспортер *SLC34A2*. Ранее было показано, что они являются потенциальными маркерами прогноза безрецидивной и общей выживаемости больных РЯ, поэтому представляют особый интерес для дальнейшего исследования.

При выполнении данной работы были использованы образцы опухолевой ткани, полученные от 17 пациентов с РЯ. Для каждого образца проводили оценку цитотоксического действия химиопрепаратов (цисплатин, карбоплатин, паклитаксел) с использованием первичных культур, а также исследовали уровень экспрессии генов *RAD50*, *POLR2L* и *SLC34A2*. Цитотоксический эффект лекарственных препаратов изучали с помощью МТТ-теста после 7 сут инкубации первичных культур с каждым из препаратов, уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР в режиме реального времени. Все манипуляции проводили в соответствии со стандартными протоколами. Для определения относительной экспрессии в образцах в качестве референсного использовали ген *ACTB*. Расчеты проводили по формуле Ливака $\text{Ratio} = 2^{(C_{\text{ACTB}} - C_{\text{target gene}})}$ без учета экзогенного контроля.

В результате работы нами на первичных культурах клеток получены значения IC_{50} для цисплатина, карбоплатина и паклитаксела и определен уровень экспрессии изучаемых генов в 17 образцах опухолевой ткани. Полученные значения IC_{50} и относительные уровни экспрессии были проанализированы на наличие корреляции с помощью метода Пирсона. Установлено, что экспрессия гена *RAD50* коррелирует с IC_{50} карбоплатина (корреляция 0,55; $p = 0,034$), а экспрессия *SLC34A2* обратно коррелирует с IC_{50} цисплатина (корреляция 0,56; $p = 0,038$).

Несмотря на ограниченную выборку, полученные результаты дают основания полагать, что гены *RAD50* и *SLC34A2* являются потенциальными предиктивными маркерами чувствительности опухолей РЯ к химиотерапевтическим препаратам на основе платины и требуют дальнейшего изучения.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых НОЦ.

Проформы и ингибиторы цистеиновых протеаз при опухолях репродуктивной системы

Е.А. Гашенко¹, В.А. Лебедева², Г.С. Русских³, И.В. Брак¹, Т.А. Короленко¹

¹ФГБНУ «НИИ физиологии и фундаментальной медицины РАН», Новосибирск;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биохимии РАН» Новосибирск

Задачи исследования. Изучение роли прокатепсина В и эндогенных ингибиторов цистеиновых протеаз – цистатинов В и С – как возможных биомаркеров рака репродуктивной системы.

Материалы и методы. Проведено сравнительное исследование концентрации прокатепсина В, цистатина В и цистатина С в сыворотке крови и асците у женщин с опухолями яичников (злокачественные ($n = 30$, из них 14 до лечения); предраковые ($n = 9$)); в сыворотке при раке эндометрия ($n = 29$, из них 16 до лечения); РМЖ ($n = 29$, среди них 18 перед лечением). Использовали методы ИФА для оценки концентрации цистатина С (коммерческие наборы BioVendor, Чехия) и R&D (США); цистатина В (USCN Life Sci., Wuhan, Китай); прокатепсина В – R&D ELISA kit (США).

Результаты. Показано, что в сыворотке крови контрольной группы уровень прокатепсина В коррелирует с концентрацией цистатина С ($R = 0,47$; $p = 0,04$). По сравнению с контрольной группой у больных с новообразованиями в сыворотке крови обнаружено высокое содержание прокатепсина В при раке яичников ($p < 0,000$), раке эндометрия ($p < 0,000$), РМЖ ($p < 0,000$); цистатина В при раке яичников ($p < 0,05$), раке эндометрия ($p < 0,001$), РМЖ ($p < 0,05$); обнаружено повышение СА-125 при предраковых опухолях яичников ($p < 0,005$), раке яичников ($p < 0,000$), до лечения. При пограничных опухолях яичников содержание в сыворотке крови прокатепсина В, цистатина В и С достоверно не отличалось от контроля. При раке яичников концентрация прокатепсина В в сыворотке крови коррелирует с цистатином В ($R = 0,89$; $p = 0,04$). В асцитической жидкости концентрация прокатепсина В коррелирует с цистатином В сыворотки крови ($R = 0,81$; $p = 0,02$); цистатин С и прокатепсин В в сыворотке крови коррелируют с прогрессированием заболевания.

Можно заключить, что прокатепсин В в сыворотке крови и асците при опухолях яичников является наиболее вероятным опухолевым биомаркером, что требует более детального изучения и расчета его прогностического значения при различных вариантах эпителиальных опухолей яичников.

Влияние дексаметазона и селективного агониста глюкокортикоидного рецептора Compound A на межклеточные взаимодействия и миграционную активность клеток рака молочной железы

Е.М. Жидкова¹, В.П. Максимова¹, К.А. Чернышов²,
Л.Р. Тилова¹, М.Г. Якубовская¹, Е.А. Лесовая^{1,3}

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

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва;

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

Введение. Глюкокортикоиды, применяемые в терапии РМЖ в качестве адъювантов, обладают рядом побочных эффектов, связанных с механизмом трансактивации глюкокортикоидного рецептора (ГР). В частности, глюкокортикоиды могут разобщать межклеточные контакты, внося вклад в развитие процессов инвазии и метастазирования опухолей. Ранее нами показано, что соединение класса селективных агонистов ГР (SEGRA) Compound A (CpdA) проявляет ГР-зависимый противоопухолевый эффект на моделях РМЖ *in vitro*.

Задачи исследования. Изучить влияние CpdA на межклеточные взаимодействия и миграционную активность клеток РМЖ различных молекулярных подтипов.

Материалы и методы. В исследовании использовались клеточные линии аденокарциномы молочной железы MCF-7 (Luminal A), MDA-MB-231 (Basal) и MDA-MB-453 (HER2⁺). Действие CpdA на миграционную способность клеток анализировали с помощью камеры Бойдена, а также методом «зарастания царапины» (Wound healing assay). Степень разобщения межклеточных контактов оценивали с использованием теста нагрузки царапиной (Scrape loading test). Уровень экспрессии коннексинов 26, 32 и 43 оценивали вестерн-блоттингом. Уровень экспрессии генов *COL1A1*, *ICAM1*, *MMP9*, *ANXA1*, *SphK1*, *RhoB*, *CSF1*, *COX2*, *iNOS*, *KLF4*, *cJUN*, *FIBL1*, *MKPI*, *IL6* и *IL8* определяли методом количественной ПЦР.

Результаты. Показано, что CpdA, в отличие от дексаметазона (Dex), не влияет на разобщение межклеточных контактов всех клеточных линий. Обнаружено, что CpdA и Dex не влияют на миграционную способность клеток РМЖ. В то же время CpdA в равной степени с Dex подавляет экспрессию ряда ГР-зависимых генов, связанных с нарушением адгезии и межклеточных взаимодействий клеток РМЖ, причем сила

и направленность эффектов глюкокортикоидов и CpdA зависит от гормонального статуса клеток.

Выводы. Отсутствие усиления миграционного потенциала клеток РМЖ после обработки CpdA свидетельствует о перспективности исследований применения SEGRA в терапии РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-75-20 124) и РФФИ (грант № 16-04-01 410).

Разработка метода анализа внеклеточной опухолевой ДНК в плазме крови больных раком толстой кишки

А.Е. Кулешова, У.А. Боярских

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

Рак толстой кишки (РТК) является 3-м по распространенности среди онкологических заболеваний. Ежегодно в мире регистрируют более 1 млн новых случаев РТК. Успех в лечении данного заболевания зависит от своевременного и правильного подбора терапии, который осуществляется с помощью методов молекулярной диагностики. Анализ внеклеточной опухолевой ДНК в плазме крови – перспективный метод молекулярной диагностики РТК ввиду своей неинвазивности и возможности регулярного взятия образцов. Однако присутствие в плазме крови ДНК из других источников, а также крайне малая доля опухолевой ДНК являются главными проблемами данного типа диагностики. Существующие на сегодняшний момент методы анализа не имеют общей согласованности и в полной мере не выполняют поставленных задач. В рамках настоящего исследования разрабатывается оптимальный метод анализа внеклеточной опухолевой ДНК из плазмы крови больных РТК.

Для дальнейшего анализа была сформирована выборка из 43 пар образцов плазма – опухоль (12 от мужчин, 31 от женщин; средний возраст 67,4 года) и 66 образцов плазмы крови без парного образца опухоли. Для выделения ДНК из плазмы крови в лаборатории был разработан собственный метод. В целях оценки эффективности его сравнили со стандартным протоколом Qiagen (QIAmp Mini Kit) путем измерения концентрации ДНК в образцах, выделенных каждым из методов. Разработанный метод не показал существенных различий со стандартным протоколом: среднее значение концентрации ДНК в образцах для разработанного метода составило 0,2767 нг/мкл (стандартное отклонение 0,1562), для референсного протокола – 0,2769 нг/мкл (стандартное отклонение 0,1685).

Для оценки уровня внеклеточной опухолевой ДНК в полученных образцах и определения молекулярного

субтипа опухоли на основе публичной базы данных COSMIC были отобраны наиболее часто встречающиеся мутации при РТК. Всего выбрано 349 соматических мутаций, наиболее частые из них встречались в генах *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *APC*, *BRAF*.

В дальнейшем планируются разработка метода приготовления библиотек для секвенирования на платформе MiSeq (Illumina), секвенирование образцов, а также оценка специфичности, чувствительности и конкордантности разработанного метода.

Влияние бортезомиба на отбор CD138-негативной популяции клеток множественной миеломы

Н.И. Моисеева, Л.А. Лалетина, Е.Ю. Рыбалкина,
А.Ф. Карамышева

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. Множественная миелома (ММ) — злокачественное новообразование, происходящее из терминально дифференцированных В-лимфоцитов. Несмотря на успешное использование в 1-й линии терапии ингибитора протеасом бортезомиба (btz), ММ остается некурабельным заболеванием. Основными причинами рецидивирования являются возникновение лекарственной устойчивости, в частности за счет активации Р-гликопротеина, и наличие пула стволовых клеток опухоли. Считается, что клетки ММ имеют иммунофенотип CD38⁺/CD138⁺, однако привлекает внимание CD138-негативная субпопуляция, которая может играть роль стволовых клеток опухоли для ММ. Альтернативный вариант появления CD138-негативных клеток ММ — протеолитическое отщепление эктодомена CD138, который в свободном состоянии остается биологически активным. Вопрос о возникновении и роли CD138-негативной субпопуляции для поддержания и прогрессии ММ сейчас начинает активно изучаться.

Задачи исследования. Изучить влияние btz на отбор CD138-негативной клеточной субпопуляции ММ.

Материалы и методы. Исследования проводили на культурах клеток RPMI8226 и NCI-H929. Чувствительность клеток к btz оценивали МТТ-тестом. Экспрессию Pgr и СВ138 определяли методом проточной цитофлуориметрии. Для разделения живых и погибших клеток использовали пропидий йодид (PI).

Результаты. Активация экспрессии Pgr не происходила ни при длительном, ни при краткосрочном воздействии btz. Краткосрочные опыты по инкубации клеток линии NCI-H929 с btz (15 нМ) в течение 6, 16 и 24 ч показали, что CD138 на поверхности клеток перестает детектироваться, а именно в контроле CD138-негативных клеток — 1 %, через 6 ч инкубации

с btz — 18,2 %; через 16 и 24 ч CD138 на поверхности клеток отсутствовал полностью. После длительного ведения клеток с btz (4–5 пассажей, 6–8 нМ) количество CD138-негативных клеток в сублиниях RPMI8226btz и NCI-H929btz увеличивалось с 5 до 20 % и с 2 до 9 % по сравнению с исходными линиями. При этом в NCI-H929btz, к которой около 2 нед btz не добавлялся, уровень CD138 стремился к исходному уровню — маркер обнаруживался на 94 % клеток.

Выводы. Наши данные свидетельствуют о том, что на начальном этапе отбора устойчивых к btz популяций клеток ММ Р-гликопротеин не участвует. Наша первичная гипотеза предполагала, что длительное ведение клеток с btz может привести к отбору CD138-негативной популяции. Однако опыты по краткосрочному воздействию btz свидетельствуют скорее об отщеплении эктодомена CD138, нежели об отборе субпопуляции, хотя экспрессия CD138 на клетках, проведенных через btz, не возвращалась полностью к исходному уровню. Участвует ли этот механизм в отборе устойчивых к btz клеток — предмет наших дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-315-00075/18 Мол_а).

Влияние радиотерапии на экспрессию протеогликанов в нормальной ткани головного мозга

М.О. Политко¹, К.Э. Купер², А.И. Прокаева^{1,3},
А.Ю. Цидулко¹, Э.В. Григорьева^{1,3}

¹ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН»,
Новосибирск;

²ФГБУН «Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера
СО РАН» Новосибирск;

³ФГАУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск

Введение. Глиобластома является агрессивной злокачественной опухолью с неблагоприятным прогнозом течения заболевания. В данный момент для лечения глиобластомы применяется адьювантная радиохимиотерапия, при которой пациент получает облучение суммарной дозой 60 Гр (30 × 2 Гр). Известно, что пролиферация опухолевых клеток глиобластомы и их инвазия во многом зависят от состояния здоровых тканей, окружающих опухоль. Радиотерапия влияет как на опухолевые клетки, так и на нормальную ткань головного мозга, одним из основных компонентов которой является внеклеточный матрикс (ВКМ). Влияние облучения на ВКМ нормальной ткани головного мозга практически не изучено.

Задачи исследования. Изучение воздействия радиотерапии на экспрессию протеогликанов, которые являются основой ВКМ нормальной ткани головного мозга.

Материалы и методы. Исследование проведено на модели экспериментальных животных *in vivo*

(7-месячные самки мышей линии C57BL/6). Однократное облучение мозга животных проводили на ускорительном комплексе ВЭПП-4М Института ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН в дозе 7 Гр. При этом животные находились под наркозом, в качестве снотворного использовалась комбинация препаратов Золетил и Домитор. Контролем явились не усыпленные и усыпленные мыши без воздействия излучения. С помощью метода ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени изучено изменение уровня экспрессии протеогликанов в коре и подкорке головного мозга, наблюдаемое через 17 и 40 ч после облучения животных.

Результаты. Показано, что основные протеогликаны, экспрессирующие в коре и подкорке головного мозга, — декорин, бигликан и нейрокан. Уровень экспрессии остальных протеогликанов в тканях головного мозга (таких как синдекан 1, глипикан, перлекан 1, версикан, бревикан, CSPG4/NG2 и CD44) незначителен и не изменяется под действием излучения. Однократное облучение в дозе 7 Гр приводило к изменениям транскрипционной активности протеогликанов декорина, бигликана и нейрокана, причем эффект отличался в коре и подкорке головного мозга (снижение и увеличение экспрессии соответственно). Наиболее выраженный эффект наблюдался к 17 ч после облучения: снижение экспрессии в коре для декорина и бигликана в 2 раза, для нейрокана в 16 раз; увеличение в подкорке для декорина в 3,5 раза и для бигликана в 2 раза. К 40 ч после облучения наблюдалась тенденция к восстановлению уровня экспрессии протеогликанов в тканях головного мозга. Применение анестезии из комбинации Золетила и Домитора оказывало определенное влияние на изменение экспрессии протеогликанов.

Выводы. Показано, что даже однократное воздействие излучения вызывает изменение уровня экспрессии протеогликанов в нормальной ткани головного мозга экспериментальных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 18-29-01036/18). А.Ю. Цидулко поддержана стипендией Президента Российской Федерации (SP-5435.2018.4).

Ответ опухолевых стволовых клеток на радиационное воздействие как возможный прогностический маркер эффективности лечения больных раком шейки матки

Е.И. Селиванова, Л.И. Крикунова, Л.С. Мкртчян, Г.З. Кулиева, А.Д. Каприн, С.А. Иванов, И.А. Замулаева
МРНЦ им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск

Радиорезистентность опухолевых стволовых клеток (ОСК) рассматривается как одна из возможных причин

рецидивирования опухоли после лучевой терапии. Однако о количественных изменениях популяции ОСК в ответ на радиационное воздействие в клинических условиях известно мало, и в настоящее время отсутствуют данные о взаимосвязи этих изменений с эффективностью лечения различных злокачественных новообразований, в том числе плоскоклеточного РШМ.

Задачи исследования. Оценка изменения доли ОСК в соскобах шейки матки больных плоскоклеточным РШМ в ходе лучевой терапии для дальнейшего анализа прогностического значения этого показателя.

Материалы и методы. Группу исследования составили 25 пациенток с гистологически подтвержденным диагнозом плоскоклеточного РШМ на стадиях IB–IVA по классификации FIGO. Соскобы шейки матки получали до лечения и через 24 ч после γ -облучения в суммарной очаговой дозе 10 Гр. Долю ОСК определяли с помощью проточной цитометрии с использованием ДНК-связывающего красителя Хехст 33 342 и антител к CD44, CD24 и CD45.

Результаты. Высокая индивидуальная вариабельность доли CD44⁺CD24^{-/low}CD45⁻ ОСК была обнаружена в образцах плоскоклеточного РШМ до лечения. Доля ОСК до облучения в дозе 10 Гр и после него значимо не различалась, составляя в среднем (\pm SE) $7,2 \pm 1,2$ и $8,4 \pm 2,3$ % соответственно. Примерно у половины пациентов (12/25) зарегистрировано уменьшение изучаемого показателя после облучения, у 10 — его увеличение, у остальных 3 — отсутствие изменений. Значительная корреляция была найдена у доли ОСК до лечения с ее изменением после облучения ($R = -0,6$; $p = 0,0001$). Полученные результаты свидетельствуют о наличии существенных индивидуальных различий в ответе ОСК на радиационное воздействие, а также обосновывают принципиальную возможность дальнейшего исследования прогностической значимости количественных изменений ОСК плоскоклеточного РШМ после первых сеансов лучевой терапии в отношении ближайших и отдаленных результатов лечения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 18-75-10025) в части изучения ОСК. Диагностика и лечение больных плоскоклеточного РШМ осуществлялись за счет средств ФОМС и государственного задания Минздрава России.

Клетки меланомы MEL-7 чувствительны к рекомбинантному альфа-фетопротейну

Г.М. Соболева^{1,2}, Л.Н. Семенкова¹, И.В. Дудич¹, Е.И. Дудич¹
¹ОАО «Институт инженерной иммунологии», Москва;
²ООО «НПЦ Микромир», Москва

Изучение молекулярных механизмов повышения эффективности лечения меланомы продолжает

оставаться актуальной темой в фундаментальной онкологии. В экспериментах с использованием культуры клеток меланомы *in vitro* рассматривается взаимодействие злокачественных клеток с потенциально противоопухолевыми препаратами, в частности с альфа-фетопротеем — онкофетальным белком, являющимся маркером опухолей печени и репродуктивной системы и вызывающим апоптоз опухолевых клеток, экспрессирующих рецепторы к нему (Deutsch G. J., 1991; Mizejewski H. F., 2002).

В настоящей работе показано, что рекомбинантный альфа-фетопротейн подавляет пролиферацию клеток меланомы MEL-7 *in vitro*, а его конъюгат с флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) взаимодействует с поверхностными структурами опухолевых клеток.

Материалы и методы. Получение рекомбинантного альфа-фетопротейна и его конъюгата с FITC, а также характеристика линии меланомы MEL-7 были описаны нами ранее (Dudich E., 2012). Клетки MEL-7 выращивали *in vitro* стандартно, с использованием полной среды DMEM. В опытах по изучению пролиферации засеивали по 3×10^3 клеток на 1 лунку 96-луночного планшета, время инкубации с альфа-фетопротеем составляло 24 ч. В экспериментах по изучению взаимодействия конъюгата альфа-фетопротейна/FITC с клетками использовали микроскоп AxiomagerD1 (Zeiss, США) с характеристиками фильтра: excitation 485 nm, emission 511 nm.

Результаты. Показано, что количество клеток MEL-7 в лунках в конце инкубации обратно пропорционально концентрации альфа-фетопротейна ($IC_{50} = 78 \pm 0,2$ мкг/мл). Характер распределения флуоресцентного сигнала от конъюгата альфа-фетопротейна/FITC указывает на большую вероятность его взаимодействия с поверхностными, а не внутриклеточными структурами. Требуется дополнительные исследования, чтобы установить, является ли цитотоксический эффект рекомбинантного альфа-фетопротейна и его взаимодействие с поверхностью клеток индивидуальной особенностью клеток MEL-7 или обнаруженные нами феномены характерны и для других линий меланомы.

Связь экспрессии и CNA гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с эффектом неoadъювантной химиотерапии и исходом

М.М. Цыганов, И.В. Дерюшева, М.К. Ибрагимова,
А.М. Певзнер, Е.М. Слонимская, Н.В. Литвяков

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. Данные литературы свидетельствуют о том, что не только герминальные, но и соматические мутации в гене *BRCA1* сопряжены с прогнозом заболевания и эффективностью ХТ. С учетом данных

о связи наследственной мутации *BRCA1* с высокой эффективностью препаратов платины можно предположить, что уровень экспрессии гена *BRCA1* и его хромосомные aberrации в опухоли также будут ассоциированы с высокой чувствительностью новообразования к препаратам платины.

Задачи исследования. Оценить связь экспрессии и хромосомных aberrаций гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с основными клинико-морфологическими параметрами и исходом заболевания.

Материалы и методы. Обследованы 109 больных РМЖ (IIA–IIIB). Больные получали 4–6 курсов неoadъювантной ХТ (НХТ) по схемам FAC, CAX с включением препаратов платины (CP) или монотерапию таксотером. Оценку экспрессии гена *BRCA1* проводили в парных образцах до лечения и после НХТ (количественная ПЦР). Для анализа aberrаций числа копий (CNA) выполняли микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности фирмы Affymetrix (США) CytoScan™ HD Array. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0.

Результаты. В результате проведенного исследования установлена связь начального уровня экспрессии с молекулярным подтипом РМЖ. Уровень экспрессии при люминальном типе В РМЖ статистически значимо выше по сравнению с группой больных с HER2⁺ ($p = 0,01$) и ТНР ($p = 0,05$), что может быть одной из причин высокой чувствительности ТНР к ХТ. Установлено, что частота делеций гена *BRCA1* в опухолях молочной железы составляет 43,4 %. Показана статистически достоверная связь CNA с эффективностью НХТ в общей группе больных и для схемы CAX ($p = 0,01$). Интересный результат показан для пациентов, пролеченных по схемам с включением препаратов платины. У 10 пациентов с люминальным типом В РМЖ в 80 % случаев наблюдается полная или частичная регрессия. Наличие делеции гена *BRCA1* связано с показателями безметастатической выживаемости. У больных (схема CAX) с нормальным состоянием данного гена показатели выживаемости ниже ($p = 0,02$), чем при наличии делеции.

Выводы. На основании полученных данных можно полагать, что соматические нарушения гена *BRCA1* могут также являться предиктором эффективности НХТ и фактором прогноза заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-15-01 203).

Способ прогнозирования вероятности развития гематогенных метастазов в отдаленном периоде у больных люминальным раком молочной железы с использованием определения показателей внутриклеточных протеолитических систем

Е.Е. Шашова^{1,2}, Е.С. Колегова¹, Г.В. Какурина¹,
Д.А. Коршунов¹, О.А. Карелина², Н.А. Тарабановская¹,
Е.М. Слонимская^{1,2}, И.В. Кондакова¹, Л.В. Пикалова³

¹НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск;
²ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск;

³ОГАУЗ «Томский областной онкологический диспансер»,
Томск

Задачи исследования. Разработка дополнительного метода прогнозирования вероятности развития гематогенных метастазов в отдаленном периоде у больных люминальным РМЖ с распространением процесса на регионарные лимфатические узлы.

Материалы и методы. Всего были включены 135 больных люминальным РМЖ. Материалом для исследования явилась опухолевая и неизменная ткань молочной железы, в которой определяли химотрипсиноподобную и каспазаподобную активность протеасом, активность кальпаинов, а также коэффициенты химотрипсиноподобной и каспазаподобной активности протеасом, коэффициент активности кальпаинов.

Результаты. При определении показателей протеасомной и кальпаиновой систем в тканях молочной железы совместно с традиционно оцениваемыми клинико-морфологическими и молекулярными

параметрами была построена статистически значимая математическая модель ($\chi^2 19,433$; $p = 0,013$; чувствительность модели 75 %, специфичность 95 %). Уравнение логистической регрессии, на основе которого построена данная прогностическая модель, имело следующий вид:

$$Y = -12,242 + 4,657X_1 + 5,729X_2 - 0,264X_3 - 13,862X_4 + 4,210X_5 + 0,103X_6 + 1,764 X_7 + 0,535 X_8,$$

где Y – значение уравнения регрессии; $-12,242$ – значение коэффициента регрессии свободного члена. Перед переменными X_1 – X_8 стоят значения коэффициентов регрессии соответствующих признаков. Переменные, включенные в модель: X_1 – состояние менструальной функции (есть/нет); X_2 – степень вовлеченности в процесс метастазирования регионарных лимфатических узлов; X_3 – значение маркера пролиферативной активности в опухоли Ki-67 (%); X_4 – экспрессия рецептора Her2-neu (есть/нет); X_5 – тип проводимого адъювантного лечения (гормональная терапия/комбинированная химио- и гормонотерапия); X_6 – значение химотрипсиноподобной активности протеасом в опухоли (у. е. $\times 10^3$ МЕ/мг белка); X_7 – значение коэффициента каспазаподобной активности протеасом; X_8 – значение коэффициента активности кальпаинов.

При этом вероятность развития гематогенных метастазов в отдаленном периоде определяется по формуле:

$$P = 1/(1 + e^{-Y}),$$

где P – значение вероятности развития признака; e – математическая константа, равная 2,72.

Таким образом, определение показателей протеасомной и кальпаиновой систем в ткани РМЖ совместно с традиционно оцениваемыми клинико-морфологическими параметрами увеличивает точность прогноза вероятности прогрессирования люминального РМЖ.

Тезисы

Лиганды рецептора NK-клеток NKG2D в сыворотке крови больных меланомой

Е.В. Абакушина¹, Д.Н. Абакушин², Ю.В. Гельм¹,
И.А. Пасова¹, Д.В. Кудрявцев¹

¹МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России, Обнинск;
²ООО «Клиника № 1», Обнинск

Задачи исследования. Определение уровня стрессиндуцированных молекул MICA, ULBP-1 и -2 в сыворотке крови больных меланомой кожи (МК) и здоровых добровольцев.

Материалы и методы. В исследование включены 32 больных МК (20 женщин и 12 мужчин) в возрасте 26–75 лет (средний возраст 52 ± 13 лет) со стадиями заболевания: II (a–c) – 7 пациентов, III (a–c) – 23, IV (a) – 2. Контрольную группу составляли 30 здоровых добровольцев. Уровень молекул MICA, ULBP-1 и -2 в сыворотке крови определяли с помощью ИФА и наборов реагентов: MICA human ELISA Kit и DuoSet ELISA human ULBP-1 и -2. Оптическую плотность образцов измеряли при длине волны 450 нм на фотометре ChroMate 4300. Результаты обрабатывали в программах Microsoft Excel 2003 и Statsoft Statistica 6.0. Данные представляли как среднее по группе. Использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Среднее содержание молекул MICA у больных МК составило $2793,04 \pm 2672,18$ пг/мл, в контрольной группе они обнаруживались в минимальных количествах (< 1000 пг/мл). Показано, что как при прогрессировании заболевания, так и со стабилизацией процесса различия были не значимы и составили $3267,2 \pm 1137,8$ и $3547,3 \pm 1246,7$ пг/мл соответственно. Уровень молекул ULBP-1 у больных МК был выше в 2,3 раза, чем в контрольной группе ($p < 0,001$). Большинство пациентов имели концентрацию ULBP-1, превышающую среднее значение в контрольной группе (в 93,8 % случаев). При уменьшении уровня ULBP-1 у больных МК наблюдалась стабилизация процесса или регрессия метастатических образований, при увеличении – зафиксировано прогрессирование заболевания. Во многих случаях изменение концентрации лигандов NKG2D выявлялись раньше, чем было обнаружено прогрессирование заболевания или выявлены метастазы инструментальными методами диагностики. Молекулы ULBP-2 данной аллельной формы в сыворотке крови больных МК и в контрольной группе были равны фоновым значениям.

У 1 пациента лиганды обнаруживались в следовых количествах (291 пг/мл).

У больных МК с высоким содержанием MICA отмечался средний и высокий показатель ULBP-1 (> 4000 пг/мл), однако, когда уровень содержания MICA в сыворотках крови был минимальным (в 38,5 % случаев), уровень ULBP-1 достигал высоких значений, в среднем – $6100,0 \pm 2143,7$ пг/мл (при максимальном значении 9558,3 пг/мл). Установить четкую корреляционную зависимость между уровнем молекул MICA и ULBP-1 на данном этапе не представилось возможным, для этого необходимо проведение дальнейших исследований.

Выводы. Показано существование прямой зависимости между клиническим статусом и изменением концентрации лиганда NKG2D, что диктует необходимость в персонифицированном подходе к оценке данных молекул в сыворотке крови. Обнаружение в больших концентрациях молекул MICA и ULBP-1 в сыворотке крови пациентов может служить одним из диагностических маркеров наличия МК, и, возможно, является показателем прогрессирования заболевания.

Непосредственные результаты конкурентной химиолучевой терапии больных раком шейки матки в Азербайджане в зависимости от мутации гена фосфатидилинозитол-3-киназы

К.С. Акперов, И.Г. Исаев, Л.А. Меликова,
Н.С. Алиева, Н.Р. Алиева

Национальный центр онкологии, Баку, Республика Азербайджан

Введение. В последнее десятилетие активно разрабатываются методы изучения молекулярно-генетических параметров опухолей, и одним из наиболее часто встречающихся генетических изменений при РШМ является мутация гена фосфатидилинозитол-3-киназы (PIK3CA).

Задачи исследования. Изучение ответа опухоли на конкурентную химиолучевую терапию в зависимости от мутации гена PIK3CA среди больных РШМ в Азербайджане.

Материалы и методы. Мы исследовали результаты лечения 136 пациенток с верифицированным диагнозом РШМ IIA–IIIB стадий, поступивших в Национальный центр онкологии Республики Азербайджан в период с 2015 по 2017 г. Распределение больных

по стадиям было следующим: ПА – 21 (15,4 %), ПВ – 65 (47,8 %), ПИА – 5 (3,7 %) и ПИВ – 45 (33,1 %) пациенток. При морфологическом исследовании выявлено 119 (87,5 %) случаев плоскоклеточного рака и 17 (12,5 %) случаев аденокарциномы. Лечение состояло из дистанционной лучевой терапии, еженедельных введений цисплатина и брахитерапии с высокой мощностью дозы. Генетические мутации гена *PIK3CA* определяли с помощью ПЦР в реальном времени, проводимой в соответствии с протоколом производителя (CFX96 Real-Time system, BioRad, США).

Результаты. Мутации *PIK3CA* выявлены всего у 49 (36,0 %) пациенток: у 5 (10,2 %) с аденокарциномой, у 44 (89,8 %) с плоскоклеточным РШМ. У 112 (82,3 %) из 136 пациенток была достигнута полная регрессия, у 23 (18,7 %) – частичная и только у 1 пациентки наблюдалось прогрессирование заболевания. Частота полной регрессии опухоли была значительно ниже у пациенток с мутацией гена *PIK3CA* (77,6 % против 92,0 %; $p = 0,035$).

Выводы. В результате данного исследования была выявлена связь мутации гена *PIK3CA* со степенью регрессии РШМ после химиолучевой терапии. Более трети пациенток с РШМ в Азербайджане являются носителями мутированного гена *PIK3CA* и могут потенциально извлечь пользу из активно разрабатываемых терапевтических препаратов, нацеленных непосредственно на блокирование *PIK3CA*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда развития науки при Президенте Республики Азербайджан (грант № EIF-KETPL-2-2015-1(25)–56/37/3).

Взаимосвязь экспрессии гистидинбогатого гликопротеина с молекулярными подтипами рака молочной железы

А.И. Аутеншлюс^{1,2}, А.В. Голованова¹, А.А. Студеникина¹,
И.И. Брусенцов³, А.В. Проскура², С.В. Сидоров⁴,
В.А. Вавилин²

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск;

²ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН», Новосибирск;

³ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск;

⁴ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск

В настоящее время выделяют 5 молекулярных подтипов РМЖ, знание которых необходимо для прогнозирования и определения тактики дальнейшего лечения. Вероятность успешного лечения РМЖ повышается при диагностике заболевания на ранних стадиях канцерогенеза, что обуславливает актуальность

исследований, направленных на поиск новых маркеров РМЖ. Одним из потенциальных маркеров РМЖ является гистидинбогатый гликопротеин (*HRG*).

Задачи исследования. Оценить взаимосвязь между экспрессией *HRG* и молекулярными подтипами РМЖ.

Материалы и методы. Исследован биопсийный материал молочной железы 23 пациентов с диагнозом инвазивной карциномы неспецифического типа (по гистологическому типу аденокарцинома молочной железы). Средний возраст больных составил $56,9 \pm 1,8$ года (42–74 года). Распределение по молекулярным подтипам образцов опухолей было следующим: люминальный А – 11 больных; люминальный В ($HER2^-$) – 6; люминальный В ($HER2^+$) – 1; $HER2^+$ – 3; базально-подобный – 2.

Из биопсийного материала молочной железы выделяли РНК. Для получения комплементарной ДНК проводили обратную транскрипцию с использованием специфичных праймеров. Пара праймеров была подобрана таким образом, чтобы праймер *HRG_R* располагался в экзонах 4 и 5, чтобы в процессе реакции исключалась возможность амплификации нецелевой ДНК. Праймеры были проверены на культуре человеческих гепатоцитов. Экспрессию *HRG* оценивали с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени. Для контроля качества выделения РНК использовали систему выявления матричной РНК (мРНК) *TBP* (TATA-box binding protein).

Результаты. По результатам количественной ПЦР в режиме реального времени мРНК *HRG* была обнаружена в 70 % всех образцов и не наблюдалась лишь в 7 случаях. Ни в одном из всех 3 образцов, по молекулярным подтипам классифицируемых как $HER2^+$, не обнаружена мРНК *HRG*. Также мРНК *HRG* отсутствовала в 3 образцах с люминальным подтипом А и в 1 образце с люминальным подтипом В ($HER2^-$).

В нашей работе были получены различия в содержании мРНК *HRG* в разных подтипах РМЖ, следовательно, определение экспрессии *HRG* позволяет дифференцировать РМЖ на молекулярные подтипы.

Клинические особенности течения колоректального рака с мутацией в гене *KRAS*

И.А. Богомолова, И.И. Антонеева, Д.Р. Долгова
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»,
Ульяновск

Введение. Колоректальный рак (КРР) как по агрессивности течения опухолевого процесса, так и по чувствительности к противоопухолевому лечению является гетерогенным заболеванием. Один из возможных факторов химиорезистентности при лечении КРР – наличие соматической мутации в районе кодонов 12, 13 гена *KRAS*, выявляемой с частотой 30–50 %.

Фенотипическое проявление мутации *KRAS* – постоянная активация сигнального пути EGFR-KRAS-BRAF-МЕК-МАРК, регулирующего клеточную пролиферацию, ангиогенез, апоптоз. Считается, что больные КРР нуждаются в определении статуса мутаций гена *KRAS*, играющего важную роль в плане дальнейшей стратегии химиотерапевтического лечения (Водолажский Д. И., 2014).

Задачи исследования. Оценка влияния мутации в гене *KRAS* на эффективность адьювантной ХТ (АХТ) больных КРР с II–III стадиями заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены 24 больных КРР, получавших комбинированное лечение в Ульяновском областном клиническом онкологическом диспансере в 2014–2017 гг. Генетический анализ на наличие мутации в гене *KRAS* проведен на материале, полученном интраоперационно, с использованием набора Инсайдер (Номотек) методом ПЦР в режиме реального времени. Пациентам проводили АХТ по схеме FOLFOX в течение 6 мес. Прогрессирование заболевания выявляли по результатам планового обследования (рентгенография органов грудной клетки, УЗИ органов брюшной полости, забрюшинного пространства, анализ крови на онкомаркеры раковый эмбриональный антиген (РЭА) и СА-19/9).

Результаты. При проведении молекулярно-генетического анализа мутация гена *KRAS* в кодонах 12 и 13 выявлена в 37,3 % случаев КРР. При наличии мутации *KRAS* у пациентов чаще выявлялся высокодифференцированный тип опухоли, чем при диком типе (67 и 20 % соответственно; $p = 0,022$). Различия в группах с мутацией и диким типом *KRAS* по возрасту и полу не прослеживались. Динамика онкомаркеров РЭА и СА-19/9 в процессе АХТ не коррелировала с наличием мутации *KRAS* у больных КРР. Частота рецидивов в группе с мутированным типом *KRAS* составила 55 %, в группе с диким типом – 35 %. При мутантном типе опухоли безрецидивный период составлял 9,25 мес, у носителей дикого типа – 20,67 мес, что позволяет предполагать агрессивное течение КРР с мутантным геном *KRAS*, чем с диким типом (Беляева А.В., 2012; Гатаулин И.Г., 2015).

Выводы. Мутация в гене *KRAS* повышает частоту развития рецидивов и уменьшает безрецидивный период. Определение статуса мутации *KRAS* в опухоли может быть использовано при прогнозировании ответа на АХТ по схеме FOLFOX.

Экспрессия и коэкспрессия эстрогеновых рецепторов альфа и бета в ткани немелкоклеточного рака легкого

Т.А. Богуш, О.М. Рябинина, Е.А. Богуш, А.Н. Гришанина, Н.С. Сапрыкина, С.Д. Коломийцев, Б.Е. Полоцкий, М.М. Давыдов

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Рецепторы эстрогенов – важнейшая клеточная мишень, воздействуя на которую, можно не только контролировать процессы канцерогенеза, но и подавлять рост опухолевых клеток. Блестящим подтверждением этого является результат многолетнего применения тамоксифена у больных РМЖ с экспрессией эстрогеновых рецепторов опухоли. В клетках человека присутствуют 2 изоформы эстрогеновых рецепторов: альфа (ЭРа) и бета (ЭРβ), которые ассоциированы с ответом на антиэстрогеновую терапию.

Задачи исследования. Определить уровень экспрессии ЭРа и ЭРβ в ткани НМРЛ, оценить взаимосвязь этих опухолевых маркеров, в том числе при разных гистологических типах НМРЛ.

Материалы и методы. Использован хирургический биопсийный материал 113 пациентов (92 мужчин, 21 женщины). Оценка экспрессии ЭРа и ЭРβ в опухолевой ткани проводили методом ИФА, ассоциированным с проточной цитометрией. В работе использованы первичные и вторичные антитела Abcam: для ЭРа – клон SP1 и ab98 510, для ЭРβ – клон 14C8 и ab98 729. Уровень экспрессии эстрогеновых рецепторов в опухоли (отношение количества специфически флуоресцирующих клеток к общему количеству клеток в %) рассчитывали с помощью теста Колмогорова–Смирнова, включенного в программу FlowJo 10.0.8. Статистическую обработку проводили с применением пакета программ Statistica 6.0. Для оценки силы корреляционной связи показателей экспрессии ЭРа и ЭРβ использовали критерий Пирсона.

Результаты. Экспрессия ЭРа и ЭРβ выявлена во всех исследуемых образцах НМРЛ со средним значением уровня экспрессии маркеров и стандартным отклонением $25,5 \pm 9,7$ и $44,0 \pm 15,6$ % соответственно. В целом по группе уровень экспрессии ЭРβ был выше показателя для ЭРа в 88 % случаев ($p < 0,0001$). Аналогичный результат получен при сравнении уровней экспрессии ЭРа и ЭРβ в ткани НМРЛ разного гистогенеза. В ткани аденокарциномы уровни экспрессии ЭРа и ЭРβ составили $28,0 \pm 11,7$ и $43,6 \pm 14,9$ %; в ткани плоскоклеточного рака – $23,7 \pm 6,7$ и $45,0 \pm 15,3$ % соответственно ($p < 0,0001$). При корреляционном анализе показателей экспрессии ЭРβ и ЭРа в целом по группе пациентов с НМРЛ, а также отдельно у больных плоскоклеточным раком

и аденокарциномой легкого выявлена прямая корреляционная связь слабой силы между уровнями экспрессии ЭР α и ЭР β (коэффициент Пирсона +0,3; +0,28 и +0,38 соответственно).

Выводы. В ткани НМРЛ разного гистогенеза (плоскоклеточный рак, аденокарцинома) уровень экспрессии ЭР β превышает таковой показатель для ЭР α почти в 2 раза, что указывает на ведущую патогенетическую роль ЭР β при этом заболевании. Тот факт, что экспрессия ЭР α и ЭР β выявлена во всех исследованных опухолях, позволяет предположить, что, как и в случае РМЖ, претендентами для проведения адъювантной антиэстрогеновой терапии является подавляющее большинство больных НМРЛ.

Взаимосвязь экспрессии Top2a и HER2 в клетках карциномы молочной железы

Е. В. Быстрова^{1,2}, А. А. Бриллиант¹, С. В. Сазонов^{1,2},
С. М. Демидов^{1,2}

¹ГАОУ СО «Институт медицинских клеточных технологий»,
Екатеринбург;

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург

Введение. Чувствительность опухоли к терапии на основе антрациклинов, по-видимому, обусловлена не только рецепторами Top2a, но и HER2. Так, в ряде исследований положительный ответ на монотерапию антрациклинами наблюдался у пациентов при одновременной гиперэкспрессии HER2 и Top2a и отсутствовал в HER2-отрицательных случаях РМЖ с гиперэкспрессией Top2a.

Задачи исследования. Выявить наличие взаимосвязи экспрессии фермента Top2a при различном уровне экспрессии HER2.

Материалы и методы. Предметом исследования являлся операционный материал 786 пациенток с диагнозом инвазивного РМЖ, не получавших неоадъювантную химио- и лучевую терапию. Материал отобранных образцов исследовали гистологическим, ИГХ-, молекулярно-генетическим и статистическим методами. Методом ИГХ-окрашивания определяли уровень экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона, HER2, Ki-67 и топоизомеразы II α . Статус гена HER2 изучали методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Статистические исследования выполняли с использованием набора программ описательной статистики и матриц корреляций в программном пакете Statistica 10.0. Категориальные данные были проанализированы с применением непараметрических методов.

Результаты. Статус HER2 исследовали только при уровне экспрессии HER2, равном 2 ($n = 149$), амплификация гена HER2 получена в 31 (21 %) случае.

При каждом уровне экспрессии HER2 (0,1,2,3) мы рассчитывали среднее значение фермента Top2a. Причем при экспрессии HER2, равной 2, уровень Top2a отдельно рассчитывали для случаев с амплификацией (HER2 = 2/FISH+) и без амплификации (HER2 = 2/FISH-).

При оценке средних величин экспрессии Top2a мы не получили статистическую значимость в группах с HER2 = 0,1, 2/FISH+, 2/FISH-. Статистически значимым оказался уровень топоизомеразы в группе с HER2 = 3 ($n = 149$).

Выводы. В клетках карциномы молочной железы, характеризующихся высоким уровнем экспрессии рецептора HER2 = 3, средний уровень экспрессии Top2a ($22,8 \pm 16,9$) достоверно выше ($p < 0,02$), по сравнению со средними величинами ($16,5 \pm 16,88$) при других значениях HER2 (0,1, 2/FISH+, 2/FISH-).

Работа выполнена в рамках государственного задания УГМУ (№ 056-00 151-18-00).

Белки системы инсулиноподобных факторов роста в опухоли и асците при раке яичников: связь с эффективностью неоадъювантной химиотерапии

А. Б. Виллерт, Н. В. Юнусова, Л. А. Коломиец

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

На клеточных линиях показано, что химиорезистентность при раке яичника может быть ассоциирована с экспрессией белков системы IGF (insulin-like growth factors) или компонентами IGF-опосредованного сигнального пути. Имеются некоторые данные о связи отдельных параметров с резистентностью на примере клеточных линий и клинических примерах рака яичника. Однозначных ассоциаций относительно связи белков системы IGF с эффективностью ХТ нет.

Материалы и методы. В исследование включены 40 больных диссеминированным раком яичника, проходивших лечение в отделении гинекологии НИИ онкологии Томского НИМЦ. Всем больным выполняли диагностическую лапароскопию в целях верификации и хирургического стадирования, во время которой проводили забор опухолевой ткани и асцитической жидкости. Во всех случаях диагностирован high-grade серозный рак. Неоадъювантная ХТ (НХТ) включала 3–4 курса (паклитаксел 175 мг/м² внутривенно в 1 день, карбоплатин АУС 6 внутривенно в 1 день/цисплатин 75 мг/м² внутривенно в 1 день 21-дневного курса). Эффективность НХТ оценивали по критериям RECIST (2009). Больных распределяли на 2 группы: 1-я – отсутствие эффекта от НХТ (прогрессирование/стабилизация; 2-я – наличие эффекта от НХТ (частичная/полная регрессия). В образцах опухолей

и бесклеточной части асцитической жидкости определяли тотальный (внутриклеточный и внеклеточный) пул свободных IGFs, а также IGFBP-3, IGFBP-4 и PAPP-A с применением наборов ELISA (R&D Systems, DSL, Abscam), экспрессию рецептора IGFR — с использованием проточной цитометрии. Для оценки прогноза эффективности НХТ был проведен дискриминантный анализ. Для построения модели применяли клинические данные, уровни опухолевых маркеров, показатели системы IGF в опухоли и асците.

Результаты. Показано, что наибольшей прогностической значимостью с эффективностью НХТ обладают уровни IGFBP-3 в опухоли (4,41 (3,70–28,23) нг/мг белка в 1-й группе против 0,21 (0–2,46) нг/мг белка во 2-й; $p = 0,040$), PAPP-A в опухоли (0,105 (0,06–0,20) нг/мг белка в 1-й группе против 0,48 (0,32–0,62) нг/мг белка во 2-й; $p = 0,042$) и PAPP-A в асцитической жидкости (0,43 (0,22–0,47) нг/мг белка в 1-й группе против нулевого уровня во 2-й; $p = 0,031$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что параметры системы IGF могут являться значимыми факторами — предикторами эффективности НХТ.

Динамика молекулярно-генетических изменений при остром миелобластном лейкозе, резистентном к программной химиотерапии

А.В. Виноградов¹, А.В. Резайкин², В.М. Пирожкова¹,
С.В. Сазонов², А.Г. Сергеев²

¹ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург;

²ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови больного 38 лет, проходившего программное химиотерапевтическое лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре, а впоследствии — сдерживающее химиотерапевтическое и симптоматическое лечение под контролем онколога на базе медицинской организации по месту жительства по поводу острого миелобластного лейкоза (ОМЛ). Диагностику ОМЛ осуществляли на основании клинической картины, цитологического анализа крови и костного мозга, цитохимического и иммунофенотипического исследования бластных клеток. Также были выполнены ИГХ-исследование, кариотипирование и детекция мутаций в генах *DNMT3A*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TP53*, *WT1* методом прямого автоматического секвенирования.

При ИГХ-исследовании трепанобиоптата подвздошной кости определялся диффузный инфильтрат из мононуклеаров среднего и малого размеров

с чертами бластов, со светлым ядром неправильной формы с одним или несколькими ядрышками, коэкспрессирующих в ядре и цитоплазме MPO и CD34, слабо и неравномерно CD117, в части клеток — CD68. Иммунофенотипически бластные клетки характеризовались экспрессией CD45, CD13, CD33, CD34, CD38, CD117, MPO-сут. При цитогенетическом исследовании (G-banding) определялся аберрантный кариотип 47, XY, +13. Методом прямого секвенирования определялись несинонимичные трансверсии с. 182 A>C в протоонкогене *NRAS* и с. 215 C>G в антионкогене *TP53*.

Опухоль была резистентна к программной полихимиотерапии, при этом кариотип ОМЛ изменялся в ходе лечения за счет появления дополнительных аберрантных субклонов, несущих новые структурные и количественные хромосомные аномалии (на 40-м месяце наблюдения он был представлен 47, XY, add (14) (q32), – 10, +13, +20 [5]/47, XY, +13 [3]/47, XY, add (14) (q32), +13 [2]/46, XY, add (14) (q32), – 10, +13 [2]). Количество функционально значимых мутаций в гене *NRAS* также увеличилось: наряду с определявшейся в дебюте заболевания трансверсией с. 182 A>C была выявлена дополнительная замена с. 35 G>C. Иммунофенотипические характеристики бластных клеток при этом не изменялись. Общая продолжительность наблюдения за больным составила 42 мес.

Таким образом, в описанном случае точечные мутации в гене *NRAS*, анеуплоидии и комплексные аберрации хромосом являлись факторами риска развития резистентности ОМЛ к программной полихимиотерапии. Однако общая продолжительность наблюдения за пациентом вне ремиссии на фоне сдерживающей и симптоматической терапии составила около 3,5 года.

Частота соматических мутаций в гене *KRAS* у пациентов Юга России с диагнозом колоректального рака

Д.Ю. Гвалдин, Е.П. Омельчук

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

Введение. Колоректальный рак (КРР) является широко распространенной в мире патологией, ежегодная заболеваемость достигает 1 млн случаев, а ежегодная смертность превышает 500 тыс. Известно, что целевая терапия EGFR с применением моноклональных препаратов повышает выживаемость пациентов с данной патологией. Однако эффективность этой терапии зависит от наличия мутаций в генах-участниках сигнального каскада EGFR, в частности *KRAS*.

Задачи исследования. Исследование частоты соматических мутаций в гене *KRAS* в опухолевых образцах пациентов Юга России с диагностированным КРР, а также анализ влияния точечных мутаций G12A,

G12C, G12D, G12R, G12S, G12V и G13D на метастазирование опухолей.

Материалы и методы. Обследованы 744 пациента Юга России (355 (48 %) мужчин и 389 (52 %) женщин) на наличие мутаций в кодонах 12 и 13 *KRAS*, прошедших плановое лечение в РНИОИ в период с 2016 по 2018 г. с диагнозом колоректальной аденокарциномы T2–4N0–2M0–1. Медиана возраста пациентов составляла 61 год (54–67 лет).

С помощью набора реагентов Real-Time-PCR-*KRAS*-7M (Биолинк, Россия) проводили детекцию соматических мутаций (Single Nucleotide Polymorphism) в кодонах 12 и 13 гена *KRAS* с использованием 2 нг/мкл ДНК из парафиновых блоков с образцами опухолевых тканей.

Для оценки потенциального влияния мутационного статуса гена *KRAS* на риск развития метастазов у пациентов с исследуемой патологией был использован метод бинарной логистической множественной регрессии (вариант – пошаговая регрессия с принудительным включением потенциальных предикторов). Оценку достоверности различий проводили с применением χ^2 -критерия для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$. Все статистические анализы выполняли в пакете IBM SPSS Statistics 17.0.

Результаты. Мутации *KRAS* были обнаружены у 32 % больных объединенной выборки, при этом наиболее распространенной (36 %) мутацией была замена G12D в гене *KRAS*. Менее распространенными детектируемыми мутациями *KRAS* были G13D (18 %), G12V (16 %), G12A (10 %), G12C (8 %), G12S (10 %), G12R (2 %). Среди носителей аллеля дикого типа метастазирующая форма КРР была у 86 % пациентов, среди носителей мутантного аллеля – у 88 %. Установлено, что наличие замены G12V почти в 6 раз повышало вероятность развитие метастазов у больных КРР (отношение шансов 5,89; 95 % ДИ 0,8–43,45; $p = 0,049$).

Выводы. Дальнейшее исследование соматических мутаций гена *KRAS* позволит определить их вклад в метастазирование КРР и выбрать наиболее эффективные терапевтические стратегии при наличии тех или иных исследуемых мутаций.

Фактор роста эндотелия сосудов и его рецепторы 1-го и 2-го типов в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком: клинико-морфологические корреляции

И. О. Горячева¹, Е. С. Герштейн¹, А. В. Колпаков²,
С. Д. Бежанова¹, Д. Ю. Пушкарь²

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

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

Введение. Успехи в лечении рака почки, в первую очередь его наиболее распространенного светлоклеточного варианта, достигнутые в последние годы, связаны с использованием антиангиогенных препаратов, ингибирующих активность тирозинкиназных рецепторов факторов роста, вовлеченных в процесс ангиогенеза, в частности васкулоэндотелиального фактора роста (VEGF). Теоретической предпосылкой для применения этих препаратов у больных светлоклеточным раком почки стал тот факт, что ключевую роль в этиологии данного заболевания играет инактивирующая мутация в гене опухоль-супрессорного белка *VHL*, тесно связанного с гипоксическим фактором HIF-1 α и индукцией ангиогенеза. Однако, несмотря на значительные успехи антиангиогенной терапии рака почки, многие вопросы, связанные с диагностикой, прогнозом и предсказанием ее эффективности, до сих пор не решены.

Задачи исследования. Сравнительная оценка содержания VEGF, его рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 в сыворотке крови практически здоровых лиц, больных раком и пациентов с доброкачественными опухолями почки, анализ их взаимосвязи с основными клинико-морфологическими особенностями новообразований.

Материалы и методы. Обследованы 99 больных раком (58 мужчин и 41 женщина; возраст 29–81 год; медиана возраста 59 лет) и 10 больных с доброкачественными опухолями почки (3 мужчин и 7 женщин; возраст 42–84 года, медиана возраста 60 лет). В контрольную группу вошли 80 человек без онкопатологии. Концентрацию исследуемых белков определяли с помощью наборов реактивов для прямого ИФА Quantikine[®] (R&D Systems, США).

Результаты. Содержание VEGF, VEGFR1 и VEGFR2 в сыворотке крови больных раком почки достоверно выше, чем в контроле. Уровень VEGF, но не его рецепторов, достоверно превышал показатели контроля также у больных с доброкачественными новообразованиями почки. При пороговом уровне VEGF, равном 365 пг/мл, диагностическая чувствительность выявления первичного рака почки составила 67 %, специфичность – 70 %. Однако данный пороговый уровень превышен также у 70 % больных с доброкачественными опухолями почки, т. е. специфичность по отношению

к этому «патологическому» контролю составила всего 30 %. Только уровень VEGFR1 положительно коррелировал со стадией заболевания и индексами Т и N. Взаимосвязи уровня исследованных маркеров с гистологическим строением и степенью дифференцировки ПКР не выявлено.

Выводы. VEGF и его рецепторы VEGFR1, VEGFR2 имеют ограниченное диагностическое значение при раке почки, но могут быть использованы для мониторинга и/или предсказания эффективности антиангиогенной терапии.

Характеристика BRCA-ассоциированного рака яичников в Приморском крае

В.Н. Журман, Д.А. Коротин, Л.И. Гурина, М.В. Волков
ГБУЗ «Приморский краевой онкологический диспансер»,
Владивосток

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями среди женского населения Приморского края в 2016 г. рак яичников (РЯ) занял 3-е место – 4,06 % и 8-е место среди злокачественных новообразований женского населения. Каждый год в Приморском крае отмечается 200 новых случаев заболеваемости РЯ. Отмечают 2 пика заболеваемости: 1-й пик – в возрастной группе 40–44 лет, 2-й – 55–59 лет. Средний возраст умерших от РЯ составил 57 лет. За период с 2012 по 2017 г. отмечается увеличение 5-летней выживаемости больных РЯ на 14,2 %, показатели одногодичной летальности снизились на 13,3 %. В структуре смертности от онкогинекологических заболеваний РЯ занимает 3-е место – 4,23 %.

За период с 2016 по 2017 г. в Приморском краевом онкологическом диспансере выполнено 197 молекулярно-генетических исследований гистологического и биологического материала на определение наличия *BRCA1/2*-мутации у пациенток с РЯ I–IV стадий ($n = 190$) и раком маточной трубы I–IV стадий ($n = 7$). Средний возраст пациенток составил 47,3 года. У 15 (7,6 %) пациенток РЯ сочетался с РМЖ ($n = 6$, из них 3 *BRCA+*), раком мочевого пузыря ($n = 1 - BRCA+$), раком толстой кишки ($n = 3$, из них 1 – *BRCA+*), раком эндометрия ($n = 4$), злокачественными новообразованиями кожи ($n = 1$). Всего выявлено 27 (13,7 %) *BRCA1/2*-положительных пациенток, из них 3 со злокачественными новообразованиями маточной трубы. Средний возраст положительных пациентов – 47,1 года. Распределение по стадиям заболевания: 29,9 % пациенток с I–II стадиями, 70,1 % – с III–IV стадиями. У 24 (12,1 %) пациенток выявлена мутация *BRCA1*. Наиболее часто встречающейся мутацией явилась 5382insC – у 15 пациенток, 4153delA – у 4 и 2080delA – у 3. *BRCA2*-мутация встречалась с частотой 1,5 %.

Таким образом, частота встречаемости BRCA-ассоциированного РЯ не отличается от общепопуляци-

онных данных. Обследование пациентов на носительство *BRCA*-мутации позволит индивидуализировать протоколы лечения и увеличить показатели общей выживаемости, а также формирование группы риска по развитию РЯ у родственников позволит снизить показатели заболеваемости и смертности от данной патологии.

Прогностическая роль гена *PBRM1* при светлоклеточном раке почки

Д.Г. Заридзе, С.Д. Бежанова, Д.М. Максимович,
А.Ф. Мукерия, О.В. Шаньгина, В.А. Драудин-Крыленко,
Н.Н. Мазуренко

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. В канцерогенезе рака почки важную роль играют гены, расположенные на хромосоме 3 (3p21-p25). Помимо гена *VHL* высокая частота генетических нарушений при светлоклеточном раке почки (СКРП) характерна для гена *PBRM1*, который кодирует белок BAF180 (*PBRM1*) – компонент SWI/SNF нуклеосом-ремоделирующего комплекса. Белковый продукт гена *PBRM1* дикого типа функционирует в ядре и при ИГХ-анализе, наличие ядерного окрашивания указывает на отсутствие мутаций. Проведено изучение экспрессии гена *PBRM1* в опухолевых клетках светлоклеточного рака почки в целях оценки его прогностической роли.

Материалы и методы. В исследование были включены 119 пациентов клиники НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с впервые установленным и гистологически верифицированным диагнозом светлоклеточного рака почки, отобранных из молекулярно-эпидемиологического исследования рака почки, проводимого в отделе эпидемиологии и профилактики злокачественных образований с 2007 г. От всех больных для дальнейшего молекулярно-генетического анализа получены образцы удаленной во время хирургической операции опухолевой ткани. Все пациенты ежегодно наблюдаются в целях получения последней информации об их жизненном статусе, динамике заболевания, лечении. Экспрессию гена *PBRM1* оценивали на парафиновых срезах ИГХ с поликлональными антителами PB1 к *PBRM1* (GeneTex 32464). Для сравнения выживаемости пациентов с различной экспрессией *PBRM1* использовали *log-rank*-тест.

Результаты. Ядерная экспрессия *PBRM1* выявлена у 48 (40,3 %) больных, 5- и 10-летняя выживаемость составила 77 и 70 % соответственно. В 71 (59,7 %) случае ядерное окрашивание отсутствовало, что свидетельствует о нарушениях гена *PBRM1*, и 5- и 10-летняя выживаемость составила 57 и 37 %. Различия выживаемости у больных с наличием и отсутствием экспрессии статистически значимо ($p = 0,02$). Сравнимые группы гетерогенны по полу, возрасту и стадии заболевания.

Анализ данных 40 больных I–II стадий показал равное число случаев как с ядерной экспрессией PBRM1, так и с ее отсутствием. Статистически значимое различие выживаемости сохраняется ($p = 0,05$). У больных III–IV стадий различие также наблюдается, но статистическая значимость не была достигнута ($p = 0,13$).

В 16 из 48 случаев ядерное окрашивание наблюдалось не во всех клетках (фокально), по-видимому, вследствие внутриопухолевой гетерогенности. Пяти- и 10-летняя выживаемость этих больных составила 63 и 50 % соответственно. У остальных 32 больных с окрашиванием во всех клетках 5- и 10-летняя выживаемость составила 84 %. Различия выживаемости у больных с фокальным и полным окрашиванием статистически значимо ($p = 0,02$).

Выводы. Отсутствие или низкая экспрессия PBRM1 характерны для светлоклеточного рака почки с более агрессивной формой рака и низкой общей выживаемостью пациентов. Полученные данные указывают, что экспрессия PBRM1 имеет прогностическое значение при светлоклеточном раке почки.

Экспрессия PD–L1 при раке предстательной железы

А.А. Киричек, Л.Н. Любченко, В.Б. Матвеев

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Задачи исследования. Оценить частоту распространенности экспрессии PD–L1 у больных РПЖ и ее влияние на прогноз заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены данные 51 пациента с РПЖ. У всех пациентов определена экспрессия PD–L1 в опухолевых клетках при ИГХ-исследовании срезов парафиновых блоков с использованием моноклонального антитела Anti-PD–L1 antibody (28–8) (ab 205921) на иммуноштейнере Ventana BenchMark GX. Проведен статистический анализ: для оценки достоверности различий в группах применяли методы параметрической (критерий Стьюдента) и непараметрической (U-тест Манна–Уитни) статистики. Для выявления статистической зависимости между факторами использовали χ^2 -тест Пирсона, для оценки силы зависимости рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена или коэффициент сопряженности признаков Пирсона (в зависимости от переменных). Показатели выживаемости вычисляли по методу Каплана–Майера, для оценки прогностического влияния факторов выполняли одно- и мультивариантный регрессионный анализ Кокса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$ (95 % уровень значимости).

Результаты. Экспрессия PD–L1 выявлена в 13,33 % случаев локализованного и в 33,33 % случаев метастатического РПЖ. Возраст начала заболевания достовер-

но не различался у пациентов с экспрессией PD–L1 (медиана 58 лет, диапазон 50–65 лет) и без экспрессии PD–L1 (медиана 62 года, диапазон 39–74 года; $p = 0,302$). Уровень ПСА при локализованном РПЖ достоверно не отличался при экспрессии PD–L1 (медиана 10 нг/мл, диапазон 6,00–33,40 нг/мл) и без экспрессии PD–L1 (медиана 10,72 нг/мл, диапазон 3,8–81,49 нг/мл; $p = 0,281$). Выявлены связь экспрессии PD–L1 с наличием криброзных структур в опухоли (коэффициент корреляции 0,323; $p = 0,015$), отсутствие достоверной зависимости с поражением регионарных лимфатических узлов ($p = 0,187$), низкодифференцированностью опухоли ($p = 0,530$), местно-распространенными стадиями T3/T4 ($p = 0,827$). Показатели выживаемости без рецидива и прогрессирования были ниже у пациентов с экспрессией PD–L1, чем у пациентов без экспрессии, однако различия не достигли статистической значимости: медианы выживаемости без биохимического рецидива 9,016 мес против 14,918 мес ($p = 0,440$), медианы выживаемости без местных рецидивов 48,328 мес против медиана не достигнута ($p = 0,151$) и медианы выживаемости без метастатического прогрессирования 52,197 мес против 60,131 мес ($p = 0,394$). Опухольспецифическая выживаемость больных локализованным РПЖ оказалась достоверно и значимо ниже при экспрессии PD–L1, чем при ее отсутствии (медианы не достигнуты, *log-rank*-тест $p = 0,009$; однофакторный анализ Кокса: ОР 11,023; 95 % ДИ 1,146–106,037; $p = 0,038$). При многофакторном анализе Кокса выявлена тенденция статистической значимости прогностического влияния экспрессии PD–L1 в отношении риска опухолюспецифической летальности (ОР 7,858; 95 % ДИ 0,793–77,846; $p = 0,078$).

Выводы. Результаты исследования продемонстрировали распространенность экспрессии PD–L1 у больных локализованным и метастатическим РПЖ. Обнаружена связь экспрессии PD–L1 с особенностями гистологического строения (криброзным раком) и неблагоприятным прогностическим влиянием на опухолюспецифическую выживаемость после радикального лечения.

Уровень экспрессии гена *PCSA3* в моче как эффективный способ прогнозирования раннего рецидивирования локализованного рака предстательной железы

О.И. Кит, Ф.С. Бова, А.Ю. Максимов, Д.В. Бурцев

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

Задачи исследования. Оценка экспрессии гена *PCSA3* в осадке и экзосомах мочи в целях выявления факторов

прогноза развития ранних рецидивов у больных локализованным РПЖ после радикальной простатэктомии (РПЭ).

Материалы и методы. В зависимости от наличия или отсутствия биохимического рецидива (БР) 148 пациентов с локализованным РПЖ были разделены на 2 подгруппы. В осадке и экзосомах постмассажной мочи, собранной у пациентов на этапе подготовки к РПЭ, методом ПЦР в реальном времени определяли экспрессию гена *PCAZ* относительно референсного гена калликреина человека *KLK3*. ROC-анализ использован для поиска уровня порогового цикла *Ct* для выделения больных с высоким риском рецидивирования заболевания.

Результаты. Определен разделительный уровень для значения $\Delta Ct PCA3 - KLK3 \leq -2,9$, который указывает на то, что, если у больных РПЖ $\Delta Ct PCA3 - KLK3$ в экзосомах мочи ниже значения $-2,9$ включительно, с диагностической чувствительностью 90 % и диагностической специфичностью 86 % можно говорить о высоком риске БР в ближайшие 24 мес после РПЭ. Доля ложноотрицательных случаев составляет 10 %, ложноположительных – 14 %. Общая диагностическая эффективность оценки экспрессии гена *PCAZ* в экзосомах мочи для прогноза раннего БР после РПЭ – 87 %. Площадь под ROC-кривой составила $0,896 \pm 0,0007$ ($p < 0,0001$).

Для осадка мочи разделительный уровень порогового цикла *Ct* для выделения больных с высоким риском рецидивирования заболевания составляет $-0,51$. Если у пациентов с аденокарциномой предстательной железы $\Delta Ct PCA3 - KLK3$ в осадке мочи ниже значения $-0,51$ включительно, с диагностической чувствительностью 87 % и диагностической специфичностью 85 % можно говорить о высоком риске БР в ближайшие 24 мес после РПЭ. Доля ложноотрицательных случаев составила 13 %, ложноположительных – 15 %. Общая диагностическая эффективность оценки экспрессии гена *PCAZ* в осадке мочи для прогноза раннего БР после РПЭ – 85 %. Площадь под ROC-кривой составила $0,802 \pm 0,0004$ ($p < 0,0001$).

Выводы. Оценка экспрессии гена *PCAZ* в осадке и экзосомах мочи имеет прогностическую значимость для определения риска раннего рецидивирования заболевания еще на этапах подготовки к операции. $\Delta Ct PCA3 - KLK3$ в экзосомах мочи ниже значения $-2,9$ включительно и в осадке мочи ниже значения $-0,51$ включительно говорит о высоком риске БР в ближайшие 24 мес после РПЭ.

Новые молекулярные механизмы вирус-ассоциированного рака шейки матки

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

Задачи исследования. Целенаправленный поиск биомаркеров дифференциальной диагностики и мишеней для мультитаргетной терапии РШМ.

Материалы и методы. Исследованы уровни экспрессии генов *VEGF-C*, *VEGF-R3*, *PIGF*, *ETS1* в образцах морфологически нормального эпителия с ВПЧ, цервикальной интраэпителиальной неоплазии I–III стадий, преинвазивного и микроинвазивного РШМ. Анализ уровня экспрессии генов проводили методом ПЦР в режиме реального времени и сравнительного RNAseq анализа на платформе Illumina (MiSeq). Оценены уровни экспрессии CD95, активности каспаз, содержание клеток Treg в образцах периферической крови у 285 пациенток с ДНК ВПЧ (100 %). В контрольную группу вошли 30 здоровых женщин. Иммунофенотипирование CD4-Tregs проводили методом проточной цитофлуориметрии. Определение активности каспаз 3, 6, 8 и 9 – спектрофлуориметрическим методом.

Результаты. Показано увеличение экспрессии спектра генов *VEGF-C*, *VEGF-R3*, *PIGF*, ростовых факторов (*VEGF-C*, *PIGF*), уровней их рецепторов (*VEGF-R3*), эндотелий-специфичных внутриклеточных транскрипционных факторов (*ETS1*) в клетках преинвазивного РШМ. Отмечено увеличение количества CD4⁺CD25⁺ T-клеток, CD4⁺CD25⁺/high, CD4 (+) CD25 (+) CD127 (dim/neg) и CD4 (+) CD25 (+) FoxP3 (+) ($p < 0,05$), продукции TGF- β 1 Treg-клетками ($p < 0,05$). Выявлено повышение экспрессии CD3⁺CD95⁺/high T-клеток эффекторов и CD3⁺CD4⁺CD95⁺/high T-хелперов ($p < 0,05$). Обнаружено увеличение активности CD95-регулируемой каспазы 8 и эффекторной каспазы 3 в лимфоцитарной фракции пациенток с цервикальной интраэпителиальной неоплазией и РШМ. Только после хирургического лечения отмечена тенденция к восстановлению показателей клеточного иммунитета в течение 3 мес. При комплексном лечении (хирургическое лечение + аллокин-а) происходит эффективная нормализация T-хелперов, Tregs, уровня экспрессии CD95-маркера, TGF- β 1, FOXP3, уровня активности каспаз 8, 9, 3 и 6 в циркулирующих лимфоцитах ($p < 0,01$).

Выводы. Впервые проведен анализ транскриптома преинвазивного и микроинвазивного РШМ. Показано, что развитие РШМ на самых ранних этапах сопровождается скоординированными изменениями исследуемых показателей на локальном и системном уровнях. Проведение комплексной терапии с применением иммуномодулирующих препаратов позволяет

улучшить результаты лечения и предотвратить развитие рецидивов заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-75-10027).

Поиск новых маркеров для дифференциальной диагностики фолликулярных опухолей щитовидной железы

В.В. Конончук¹, Е.В. Копейкина², Л.Ф. Гуляева^{1,3}, Т.С. Калинина¹

¹ФГБУН «НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАН», Новосибирск;

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск;

³ГБУЗ «Городская клиническая больница № 1», Новосибирск

Рак щитовидной железы (РЩЖ) является наиболее распространенным злокачественным новообразованием органов эндокринной системы человека. Дифференциальная диагностика доброкачественных и злокачественных фолликулярных новообразований на дооперационном этапе представляет собой основную проблему в диагностике РЩЖ. Клинические наблюдения показали, что точность цитологического исследования пунктата при фолликулярных опухолях составляет не более 60 %. По этой причине часто проводится необоснованное хирургическое вмешательство.

Задачи исследования. Разработка новых подходов для дифференциальной диагностики доброкачественных (фолликулярных аденом, ФА) и злокачественных (фолликулярный РЩЖ, ФРЩЖ) фолликулярных опухолей щитовидной железы на основе молекулярно-биологических подходов.

Материалы и методы. В исследовании использован клинический материал, полученный на базе VI онкологического отделения ГКБ № 1. На основании ранее проведенных исследований был взят набор микроРНК, позволяющих дифференцировать доброкачественные и злокачественные фолликулярные опухоли щитовидной железы по изменению уровня экспрессии микроРНК в опухолевой и нормальной ткани: miR-21, -221, -205, -31. По данным литературы и проведенному нами анализу *in silico*, для этих микроРНК были выбраны следующие гены-мишени: *ACAT1*, *AKT2*, *ARMCX1*, *BMF*, *CDKN1B*, *FAS*, *HTRA3*, *KRT19*, *TP53INP1*. Для оценки уровня экспрессии микроРНК и их генов-мишеней использовали метод ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Для количественной оценки и клеточной локализации белковых продуктов данных генов-мишеней применяли ИГХ-метод с флуоресцентным окрашиванием.

Результаты исследования показали, что эффективными биомаркерами для дифференциальной диагностики ФА и ФРЩЖ могут быть следующие гены: *BMF* (в ФРЩЖ уровень экспрессии снижался в 4 раза, в ФА — не менялся), *ACAT1* (в ФА уровень экспрессии снижался в 3 раза, в ФРЩЖ — не менялся) и *HTRA3* (в ФРЩЖ уровень экспрессии снижался в 14 раз, в ФА — в 9 раз). Было также показано, что гены *FAS*, *KRT19* и *HTRA3* могут выступать в качестве биомаркеров, позволяющих различить папиллярный РЩЖ и фолликулярные формы, что немаловажно для повышения точности диагностики.

Работа поддержана интеграционным проектом № 0310-2018-0007.

Матриксные металлопротеиназы 2, 7, 8, 9 и их тканевой ингибитор 1-го типа в сыворотке крови больных почечно-клеточным раком

Е.А. Короткова¹, А.В. Колпаков², Е.С. Герштейн¹, В.В. Муштенко², Д.Ю. Пушкарь²

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

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

Введение. Долгое практически бессимптомное течение рака почки является причиной поздней диагностики этого заболевания, а успехи в его лечении, достигнутые в последние годы, во многом связаны с использованием антиангиогенных препаратов. Тем не менее многие вопросы, связанные с диагностикой, прогнозом и предсказанием эффективности таргетной терапии, до сих пор не решены, поэтому изучение и поиск новых молекулярных маркеров рака почки, в первую очередь показателей, связанных с ангиогенной и инвазивной активностью, по-прежнему актуальны. К таким маркерам относятся матриксные металлопротеиназы (ММП), разрушающие большинство компонентов внеклеточного матрикса и вовлеченные во все этапы опухолевого процесса.

Задачи исследования. Сравнительная оценка содержания ММП-2, -7, -8, -9 и ТИМП-1 в сыворотке крови практически здоровых лиц, больных раком и пациентов с доброкачественными опухолями почки, анализ их взаимосвязи с основными клинико-морфологическими особенностями ПКР.

Материалы и методы. Обследованы 99 больных раком и 10 пациентов с доброкачественными опухолями почки. В контрольную группу вошли 97 практически здоровых лиц. Концентрацию исследуемых белков в сыворотке крови определяли с помощью наборов реактивов для ИФА (Quantikine®, R&D Systems, США).

Результаты. Содержание ММП-7, -8 и ТИМП-1 в сыворотке крови больных раком почки достоверно выше, чем в контрольной группе и у больных с доброкачественными опухолями. Содержание ММП-2 и -9 достоверно не различалось между обследованными группами. При пороговом уровне ММП-7, равном 3,0 нг/мл, диагностическая чувствительность выявления первичного рака почки составила 84 %, специфичность по отношению к «здоровому» контролю — 87,5 %, к «патологическому» контролю (здоровые доноры + больные с доброкачественными опухолями почки) — 73,0 %. Наилучшее соотношение чувствительности и специфичности для ТИМП-1 составило 67 и 65 % при пороговом уровне 315 нг/мл. Для ММП-8 не удалось найти порогового уровня с приемлемым соотношением чувствительности и специфичности. Уровни всех 3 маркеров положительно коррелировали со стадией заболевания и показателями системы TNM, а уровни ММП-7 и ТИМП-1 возрастали по мере уменьшения степени дифференцировки опухоли.

Выводы. Наиболее перспективным серологическим маркером рака почки следует считать ММП-7: ее содержание в сыворотке крови уже на I стадии превышает пороговый уровень в 87,5 % случаев. ТИМП-1 обладает приемлемой чувствительностью (70 % и более) только начиная со II стадии. Уровень ММП-8 увеличивается только при III–IV стадиях заболевания.

Парадигма молекулярного фенотипа в онкологии

Е.А. Кудинова, М.В. Захаренко, В.К. Боженко,
В.А. Солодкий

ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

Введение. Возникновение концепции молекулярного фенотипа РМЖ дало старт формированию осознания практической ценности интегральным оценкам молекулярно-генетических исследований злокачественных опухолей. В настоящее время определение молекулярного фенотипа является одной из общепринятых характеристик опухоли для персонификации терапии. Разработка эффективных, практически применимых методов дифференциации РМЖ на фенотипы, отражающие различные свойства опухоли, — актуальная практическая задача молекулярной онкологии.

Задачи исследования. На основании анализа уровня экспрессии генов в тканях РМЖ выявить молекулярные фенотипы для решения различных задач диагностики и прогноза.

Материалы и методы. Оценку уровня экспрессии 64 генов проводили в 564 образцах парафинизированной и послеоперационной ткани РМЖ с помощью ПЦР-наборов фирмы «ДНК Технология» (Россия). Выполняли ИГХ-исследование экспрессии

рецепторов стероидных гормонов (ESR1, PGR), Ki-67 и HER2/neu). Для большинства пациентов был оценен период безрецидивной выживаемости.

Результаты. Анализ уровня экспрессии исследованного профиля генов позволил подтвердить устойчивое определение 5 молекулярных фенотипов РМЖ. Показано, что мультигенная панель более достоверно дифференцирует молекулярный фенотип по сравнению со стандартным ИГХ-методом. Особенно это относится к дифференциации люминальных фенотипов. Выделены молекулярные «образы» РМЖ для прогноза локальных рецидивов, а также для прогноза выживаемости в зависимости от планируемой схемы лечения.

Выводы. Понятие «молекулярный фенотип», отражающее определенные, практически значимые свойства опухоли, позволяет транслировать фундаментальные достижения молекулярной биологии в клиническую практику. Внедрение молекулярно-генетических методов будет способствовать улучшению качества диагностики и персонализации в выборе тактики лечения.

Роль гена NRAS и его мутаций в развитии острого миелоидного лейкоза

Д.В. Литвинова¹, А.В. Виноградов²

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург;

²ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург

Введение. Актуальность применения в диагностике острого миелоидного лейкоза современных молекулярно-генетических методов исследования, таких как секвенирование генов, определяется наличием проблем, возникающих при выборе количества курсов высокодозной ХТ, определении кандидатов на трансплантацию клеток костного мозга и условиях прекращения терапии.

Материалы и методы. Обследовано 10 образцов периферической крови пациентов с диагнозом острого миелоидного лейкоза методом прямого автоматического секвенирования с использованием специально разработанных праймеров. Исследовали экзоны 1–4 нуклеотидной последовательности гена, частота клинически значимых мутаций в которых, по данным литературы, была наибольшей.

Результаты. В результате проведения секвенирования выявлена прогностически значимая мутация в экзоне 1 гена NRAS (10,0 %). Она представляла собой несинонимичную однонуклеотидную замену гуанина на аденин в положении 35 нуклеотидной последовательности гена (с. 35 G>A). В кодируемом этим геном белке мутация проявлялась заменой аминокислоты глицин на аспарагиновую кислоту в позиции 12 (кодон 12). Указанные изменения способствовали

существенным изменениям функциональных свойств белка NRAS. Данная мутация ассоциировалась с неблагоприятным прогнозом, так как опухолевые клетки были резистентны к стандартной ХТ, что требовало корректировки лечения и проведения трансплантации стволовых кроветворных клеток.

Выводы. Использование метода секвенирования в диагностике острых миелоидных лейкозов позволит модифицировать тактику лечения больных с учетом дополнительных прогностических опций, обусловленных биологией опухоли.

Влияние фракционированного γ -облучения на опухолевые стволовые клетки линии HeLa

О.Н. Матчук, И.А. Замулаева

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России, Обнинск

Гетерогенность опухолевых клеток по чувствительности к противоопухолевым воздействиям является одним из факторов, определяющих эффективность лечения онкологических заболеваний. В последние годы накапливается все больше данных о существовании опухолевых стволовых клеток (ОСК) и их ключевой роли в формировании такой гетерогенности. В частности, результаты многочисленных исследований доказывают высокую резистентность ОСК к однократному радиационному воздействию, что рассматривается как одна из вероятных причин рецидивирования злокачественных новообразований после лучевой терапии. Однако закономерности и механизмы фракционированного радиационного воздействия на эту популяцию клеток изучены недостаточно, а в отношении РШМ имеются лишь единичные публикации.

Задачи исследования. Выяснение количественных изменений ОСК после γ -облучения культуры РШМ линии HeLa в режиме стандартного фракционирования дозы.

Материалы и методы. Клетки HeLa культивировали в стандартных условиях *in vitro* и по достижении 30–40 % конfluence подвергали воздействию γ -излучения ^{60}Co в разовой дозе 2 Гр ежедневно до суммарной дозы 10 Гр. ОСК идентифицировали с помощью проточной цитометрии по способности исключать Хехст 33 342 и формировать боковую популяцию (side population, SP) через 24 ч после каждого сеанса облучения.

Результаты экспериментов продемонстрировали ожидаемое торможение роста клеточной культуры с повышением дозы радиационного воздействия по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В то же время происходило увеличение относительного и абсолютного количества ОСК после облучения в суммарных дозах до 6 Гр ($p < 0,05$). Увеличение количества ОСК

после фракционированного облучения может быть объяснено не только их более высокой радиорезистентностью – доказанным нами и другими исследователями феноменом, имеющим в своей основе сложный каскад молекулярно-клеточных механизмов защиты, – но также выходом ОСК из состояния пролиферативного покоя в процессе пострadiационной репопуляции опухолевых клеток и дедифференцировкой сохранившихся после облучения нестволовых клеток и их переходом в пул ОСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 18-75-10025).

Частота выявления мутаций в генах KRAS, NRAS и BRAF при колоректальном раке

А.В. Мурзаева, М.В. Конова, Н.Ю. Двинских,
А.П. Шинкаркина

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России, Обнинск

Введение. Молекулярно-генетический анализ мутационного статуса генов *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* имеет важное прогностическое и предиктивное значение при лечении колоректального рака.

Материалы и методы. Проведено исследование геномной ДНК пациентов с метастатическим колоректальным раком, получавших оперативное лечение или обратившихся за консультацией в МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал НМИЦР.

Выделение фиксированной в формалине и заключенной в парафин ДНК проводили с помощью набора QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Германия). Для выявления мутаций экзона 2 гена *KRAS*, экзона 3 гена *NRAS* и экзона 15 гена *BRAF* применяли мутационно-специфическую ПЦП с использованием наборов Insider (Евроген, Россия) и реагентов *KRAS*-7M и *BRAF*-V600E (Биолинк, Россия) с последующей валидацией мутаций с помощью прямого секвенирования. Для анализа мутаций экзонов 3 и 4 *KRAS* и экзонов 2 и 4 *NRAS* использовали секвенирование по Сэнгеру на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, США).

Результаты. За период с 2015 г. по сентябрь 2018 г. были обследованы 220 пациентов (116 (52,7 %) женщин и 104 (47,3 %) мужчины). Средний возраст составил 58,6 года (22–83 года). Частота выявления мутаций в гене *KRAS* – 49,0 % ($n = 108$), *NRAS* – 6,0 % ($n = 13$) и *BRAF* – 1,8 % ($n = 4$). В гене *KRAS* мутации преимущественно выявлены в экзоне 2: G12D – 37,0 %, G12V – 25,0 %, G12C – 6,5 %, G12S – 8,3 %, G13D – 13,0 % и по 1 случаю с G12R, G12A и G13C. В экзоне 3 определены Q61H (2,8 %) и в экзоне 4 – A146T (4,6 %). Также следует отметить, что у 2 больных обнаружены 2 мутации в экзоне 2 гена *KRAS* (G12V

и G13D). В гене *NRAS* в 3 (23 %) случаях найдены мутации в кодоне 12 (G12D), в остальных случаях – в кодоне 61 (Q61K, Q61R, Q61L). В гене *BRAF* выявлен только 1 вариант – V600E.

Выводы. Частота выявления мутаций в исследованной группе составила 45,8 %: мутации *KRAS* – 86,4 %, *NRAS* – 4,3 % и *BRAF* – 3,4 %. Во многих исследованиях приводятся результаты анализа кодонов 12 и 13 гена *KRAS* и кодона 61 гена *NRAS*. Достаточно высокий процент встречаемости мутаций в экзонах 3 и 4 гена *KRAS* (7,4 %) и в экзонах 2 и 4 гена *NRAS* (23,0 %) свидетельствует о необходимости полного скрининга всех экзонов данных генов.

Активация глюкокортикоидзависимого апоптоза деметилирующими агентами для лечения мелкоклеточного рака легкого

Д.А. Охотина¹, К.А. Кузин², О.А. Власова², О.И. Борисова²,
Е.В. Реутова², А.Е. Кузьминов², И.В. Мариниченко²,
М.С. Ардзинба², К.К. Лактионов², К.И. Кирсанов^{2,3},
М.Г. Якубовская², Е.А. Лесовая^{2,4}

¹ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва;

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

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва;

⁴ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, Рязань

Мелкоклеточный рак легкого (SCLC) представляет собой одну из наиболее агрессивных форм рака легкого. Несмотря на достижения в ХТ за последние 10 лет, уровень 5-летней выживаемости при SCLC составляет менее 5 %, что обуславливает необходимость поиска новых подходов к лечению данного заболевания. Клетки SCLC резистентны к действию глюкокортикоидов (GC) из-за снижения экспрессии глюкокортикоидного рецептора (GR). Ранее было показано, что в клетках SCLC повышение экспрессии GR с помощью ретровирусных конструкций приводило к восстановлению чувствительности к GC-индуцируемому апоптозу *in vitro* и *in vivo*. При SCLC одной из наиболее частых причин снижения экспрессии GR является гиперметилирование его промотора. В связи с этим исследование механизмов цитотоксического эффекта GC в комбинации с деметилирующими агентами на модели SCLC представляется перспективной задачей.

В работе использовали клетки линии H1299 (культура НМРЛ из метастатически измененного лимфатического узла), в которой также наблюдают снижение экспрессии GR за счет гиперметилирования. Клетки

обрабатывали 5-азациитидином (5-Aza), трихостатином (TSA) и вориностатом (Vor), спустя 6 ч проводили обработку дексаметазоном (Dex). Цитотоксический эффект оценивали с помощью МТТ-теста через 24 ч, экспрессию GR оценивали с помощью вестерн-блоттинга через 6–24 ч.

Dex усиливал цитотоксический эффект 5-Aza, TSA и Vor, что сопровождалось статистически значимым увеличением экспрессии GR или тенденцией к увеличению в зависимости от времени обработки. Наиболее выраженное увеличение экспрессии GR наблюдалось после обработки клеток 5-Aza. Таким образом, представляется целесообразным изучение влияния эпигенетически активных соединений на экспрессию GR и индукцию GC-зависимого апоптоза в клетках SCLC и на моделях SCLC *ex vivo* и *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 17-75-20124).

Перспективы применения спектроскопии комбинационного рассеяния света в качестве диагностического метода в онкоурологии

В.Н. Павлов, А.Р. Билялов, Р.Ф. Гильманова,
А.С. Ковтуненко

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

Введение. В структуре онкологической заболеваемости у мужчин опухоли мочеполовой системы составляют 17,6 % злокачественных новообразований. В структуре смертности у мужчин новообразования мочевыделительной системы и предстательной железы находятся на 3-м и 4-м местах соответственно.

Материалы и методы. Произведен забор следующих материалов: 13 образцов предстательной железы (гистологически подтверждена доброкачественная гиперплазия предстательной железы), 47 образцов опухолей предстательной железы (гистологически подтвержден РПЖ), 37 образцов опухолей мочевого пузыря (гистологически подтвержден рак мочевого пузыря), 12 образцов рака почек (гистологически подтвержден). Все образцы помещали в физиологический раствор 100 мл NaCl 0,9 % при температуре –10 °С и не позднее чем через 2 ч доставляли в лабораторию оптической спектроскопии. Исследование образцов проводили на аппарате Horiba XploRA plus, Model BX 41 TF (Horiba Ltd., Япония). Для исследования тканей использовали лазер с длиной волны 785 нм, мощностью до 100 мВт. Всего было получено 170 спектрограмм.

Результаты. Нами предложен подходящий метод вычисления базовой линии спектра и определены его

оптимальные параметры. Разработана схема идентификации обработанных спектрограмм на основе метода главных компонент и нейронной сети. Результаты работы оптимизированного алгоритма идентификации были верифицированы на реальных данных и с помощью параклинических методов диагностики. Достоверность идентификации злокачественной опухоли мочевого пузыря составила 97,5–100 %.

Выводы. В перспективе данный метод исследования может быть использован для разработки диагностического алгоритма выявления опухолевого процесса в тканях в доклинической стадии. Обладая значительными преимуществами в виде высокой специфичности, проведением измерений в режиме реального времени, отсутствием противопоказаний, по сравнению с традиционными технологиями диагностики опухолей мочевого пузыря, рамановская спектроскопия имеет серьезные перспективы применения метода в качестве «оптической биопсии».

Молекулярные и клеточные механизмы повреждения почечной паренхимы при тепловой ишемии почки

С.В. Попов, Р.Г. Гусейнов, А.В. Давыдов, А.А. Ложкин,
Р.С. Бархитдинов, А.С. Катунин, Ф.А. Багров,
М.М. Мирзабеков, Д.Д. Хозреванидзе

СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святителя Луки», Городской центр эндоскопической урологии и новых технологий, Санкт-Петербург

Первичным специфическим фактором, повреждающим клеточные сообщества ткани почек при интраоперационной окклюзии *a. renalis*, является кислородное голодание.

Наиболее высокую степень чувствительности к дефициту кислорода проявляют эпителиоциты проксимальных канальцев нефрона.

Масштабы ишемической альтерации зависят от продолжительности обескровливания. Кислородная депривация приводит к обратимым или необратимым (летальным) структурно-функциональным нарушениям почечных клеток, возникающим во время теплового обескровливания, после него, а также на фоне реперфузии. Наиболее важными клеточными компартментами, при повреждении которых особенно высока вероятность гибели клетки, являются мембраны митохондрии и лизосомы. При внезапной ишемически-гипоксической катастрофе резко сокращается объем продукции аденозинтрифосфата в митохондриях, вследствие чего останавливается работа ионных насосов и нарушается электролитный состав внутриклеточной среды.

Одним из неспецифических проявлений повреждения клетки, в том числе и ишемического, выступает

ацидоз, связанный с распадом органических кислот под влиянием лизосомальных гидролитических ферментов. По мнению ряда исследователей, закисление внутриклеточной среды в таких ситуациях может иметь защитное значение, что подтверждено на моделях аноксии кардиомиоцитов, асцитных клеток Эрлиха, изолированных гепатоцитов. Также нельзя не отметить в ткани почек набухание и отек эндотелиоцитов микрососудов и эпителиоцитов канальцев, которые уменьшают диаметр просвета приносящих микрососудов, что приводит к агрегации и агглютинации форменных элементов, дальнейшим нарушениям транскапиллярного обмена, усугублению гипоксии и дистрофии.

Перспективными направлениями разработки новых методов эффективной нефропротекции при вынужденном интраоперационном обескровливании почки являются устранение гипозергоза за счет вмешательства в пуриновый обмен, стабилизация биологических мембран, антиоксидантная и антигипоксическая защита нефроцитов, поддержание в неактивном состоянии или инактивация ферментов, демонтирующих внутриклеточные структуры и др.

Прогностическое значение простатического специфического антигена при определении показаний к первичной биопсии предстательной железы

С.В. Попов, Р.Г. Гусейнов, О.Н. Скрябин, А.В. Давыдов,
А.А. Ложкин, Р.С. Бархитдинов, А.С. Катунин, Ф.А. Багров,
М.М. Мирзабеков, Д.Д. Хозреванидзе

СПб ГБУЗ «Клиническая больница Святителя Луки», Городской центр эндоскопической урологии и новых технологий, Санкт-Петербург

Введение. До настоящего времени биопсийное исследование остается основным методом дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных заболеваний предстательной железы (ПЖ). Показанием к процедуре является повышение в сыворотке крови уровня общего ПСА, однако его низкая канцероспецифичность может стать причиной неоправданной биопсии с возможными последствиями в виде ряда осложнений. Для повышения диагностических возможностей ПСА-тестирования разработаны методы определения дополнительных показателей — свободной фракции ПСА, — 2проПСА, а также расчетных индексов D ПСА, РНИ, f/t ПСА.

Задачи исследования. Изучение степени соответствия между результатами определения показателей ПСА и выявляемостью злокачественных и доброкачественных поражений ПЖ при ее первичной биопсии.

Материалы и методы. В процессе работы был выполнен анализ 65 первичных биопсий, назначенных на основании повышенного сывороточного уровня ПСА по сравнению с результатами расширенного ПСА-тестирования с определением дополнительных параметров ПСА.

Выводы. 1. При первичном биопсийном исследовании, выполненном в связи с повышением в сыворотке крови уровня общего ПСА, злокачественное перерождение ткани ПЖ выявляется примерно в 30 % случаев. 2. Возраст мужчин старше 60 лет следует расценивать как фактор риска малигнизации ткани ПЖ. Вероятность злокачественного перерождения эпителиоцитов ПЖ у мужчин в возрасте 70–79 лет выше, чем у мужчин 60–69 лет. 3. Плотность ПСА при морфологически верифицированном РПЖ статистически значимо превышает таковую у мужчин с доброкачественной гиперплазией ПЖ и пороговое значение показателя в 85 % случаев. 4. Вычисление индекса здоровья ПЖ и отношения между концентрацией в сыворотке крови свободного и общего ПСА позволяет повысить точность прогнозирования злокачественного поражения ПЖ, корректировать показания к биопсийному исследованию, уменьшить частоту неоправданных биопсий. 5. Уровень в сыворотке крови общего ПСА варьирует от 4 до 10 нг/мл более чем в 50 % случаев, что требует дополнительного определения расчетных показателей (D ПСА, РН1, f/tПСА) для уточнения показаний к первичной биопсии ПЖ.

Прогностическая значимость *FLT3*- и *c-KIT*-мутаций при остром миелоидном лейкозе

Е.Л. Пургова¹, А.В. Виноградов²

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург;

²ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург

Введение. Существенную долю в структуре онкологической смертности занимают опухоли лимфатической и кровяной ткани. В последнее десятилетие с помощью новых технологий открыто множество генетических изменений при лейкозе. Наиболее часто мутации затрагивают гены *c-KIT*, *FLT3*. Лейкоз с этими мутациями, по данным большинства исследований, характеризуется неблагоприятным прогнозом.

Материалы и методы. Для исследования набрана пилотная группа пациентов ($n = 12$) с диагнозом острого миелоидного лейкоза. Возраст больных составил 35–76 лет (медиана 55 лет). Среди них было 83,3 % мужчин и 16,7 % женщин. Всем пациентам выполнены цитологический и молекулярно-генетический методы диагностики.

Результаты. По результатам проведения цитогенетического исследования у 8 пациентов выявлен

нормальный диплоидный набор хромосом, у 2 – трисомия по хромосоме 8, у 1 – моносомия по хромосомам 12 и 16, у 1 – трисомия по хромосомам 4 и 21.

По результатам секвенирования найдены мутации в гене *FLT3* у 2 пациентов (2 случая внутренних тандемных дупликаций (*FLT3*-ITD), в 1 из них не выявлено аномалий стандартными методами диагностики: кариотипирование и ПЦР) и мутация в гене *KIT* у 1 пациента (точечная мутация в гене *KIT* представлена заменой нуклеотида аденина на тиазин в кодоне 2447 (A2447T)).

При проведении стандартной программной полихимиотерапии больным с указанными мутациями в генах *FLT3* и *c-KIT* не удалось достичь стойкой продолжительной ремиссии, требовалась интенсификация лечения, однако в целом прогноз общей выживаемости оставался неблагоприятным.

Выводы. Таким образом, *FLT3*-ITD-мутации являются одними из наиболее частых генетических изменений, а *c-KIT*-мутации встречаются реже, но оказывают отрицательное влияние на исход острого миелоидного лейкоза. Этот случай показывает значимость выявления мутаций, влияющих на неблагоприятный прогноз, таких как *FLT3*-ITD, а также проведения секвенирования генетического материала на первых этапах диагностики в качестве скрининга.

Прогностическая и диагностическая роль эстрогеновых рецепторов при люминальном раке молочной железы

Д.А. Рябчиков¹, А.М. Казаков¹, И.А. Дудина², Д.А. Денчик¹, И.К. Воротников¹, К.С. Титов³, М.В. Родионова⁴, Т.А. Богуш¹

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

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва;

³ГБУЗ «МКНЦ им. А.С. Логинова ДЗМ», Москва;

⁴ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

Задачи исследования. Изучить выраженность экспрессии эстрогеновых α (ER α) и β (ER β) рецепторов у больных люминальным РМЖ, определить корреляцию данного параметра с молекулярным подтипом опухоли и стадией.

Материалы и методы. Исследованы образцы опухолевой ткани молочной железы 88 пациенток с гистологически подтвержденным РМЖ, имеющим инвазивный компонент. Стандартные цитологические и ИГХ-исследования выполнены в отделе патологической анатомии опухолей человека НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Уровень экспрессии ER α и ER β был

определен с помощью биотин-стрептавидинового иммунопероксидазного метода с антителами SP1 к ER α на серийных депарафинизированных срезах опухолевой ткани. Кроме того, в лаборатории медицинской химии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина впервые для определения уровня экспрессии ER β был использован метод проточной цитофлуориметрии с применением мышиных моноклональных антител IgG клона 14C8 (ab288, Abcam), клона SP1, Abcam, вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем DyLight 650. Данный метод позволил не только количественно оценить уровень экспрессии ER разных типов, но и проанализировать ее интенсивность в каждой клетке. Также значительно снизилось влияние субъективной оценки: был исключен фактор гетерогенности опухоли за счет одномоментного анализа 5000 клеток и более.

Результаты. Частота гиперэкспрессии ER α составляет 86,4 %, ER β — 97,7 %, их коэкспрессия — 85,3 %. Среди ER α -положительных опухолей доминирует люминальный подтип А (63,2 %), среди ER α -отрицательных опухолей статистически значимо чаще наблюдался В-HER2-негативный подтип (58,3 %). Выявлено, что ER α -статус коррелирует со стадией заболевания. Среди ER α -отрицательного люминального рака частота I стадии составила 58,3 %, превышая показатель ER α -положительного статуса.

Выводы. Определение выраженности экспрессии ER α и ER β при РМЖ методом проточной цитофлуориметрии может служить одним из диагностических критериев идентификации молекулярного подтипа люминального РМЖ, а также использоваться в качестве прогностического фактора.

Частота соматических мутаций в генах *KRAS*, *NRAS* и *BRAF* в образцах колоректального рака с различным статусом микросателлитной нестабильности

А.В. Семьянихина¹, Н.И. Поспехова¹, В.М. Сафронова¹,
Т.В. Наседкина², Л.Н. Любченко¹

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

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

Введение. Рак толстой кишки (РТК) — одно из самых частых злокачественных новообразований. Молекулярно-генетические изменения, лежащие в основе колоректального рака, определяют его клиническое течение, прогноз и ответ на специфическое лечение. Соматический профиль *RAS/RAF*-каскада, компонента MAPK-сигнального пути, статус микросателлитной нестабильности

являются молекулярными маркерами, диагностика которых рекомендована при определении стратегии лечения больных РТК, планировании хирургического, химиотерапевтического и таргетного лечения.

Задачи исследования. Оценить частоту соматических мутаций в генах *KRAS* (экзоны 2 и 3), *NRAS* (экзоны 2, 3 и 4) и *BRAF* (экзоны 11 и 15), а также статуса микросателлитной нестабильности в опухолевых образцах колоректального рака.

Материалы и методы. В исследование включено 80 образцов опухолевой ткани пациентов с морфологически верифицированным диагнозом РТК.

Выделение ДНК из образцов опухолевой ткани выполняли с применением комплекта реагентов Cobas DNA Sample Preparation Kit (Roche Diagnostics, Швейцария). ДНК-генотипирование проводили с помощью наборов реагентов Cobas® *KRAS* и *BRAF/NRAS* Mutation Test (LSR) (Roche Diagnostics, Швейцария). Статус микросателлитной нестабильности оценивали с использованием стандартной панели однонуклеотидных маркеров BAT25, BAT26, NR21, NR24 и NR27 методом фрагментного анализа.

Результаты. Образцы РТК с отсутствием микросателлитной нестабильности (MSS) характеризовались высокой частотой соматических мутаций в гене *KRAS* (35,4 %). Патологический *NRAS*- и *BRAF*-генотип в MSS-опухолях составил 12,5 и 8,3 % соответственно. В группе больных с низким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-L) соматические мутации выявлены только в гене *KRAS* (55,6 %). Высокий уровень микросателлитной нестабильности в опухолях сочетался с высокой частотой *KRAS*- и *BRAF*-мутаций (20 и 16 % соответственно). Частота *NRAS*-патологического генотипа в MSI-High-образцах составила 4 %. В нашем исследовании соматические мутации в генах *RAS* и *BRAF* были взаимоисключающими. Нами также не выявлено ни одного случая сочетания мутаций *KRAS* и *NRAS*.

Выводы. Частота соматических мутаций *RAS/RAF*-каскада отличается в опухолях с различным уровнем микросателлитной нестабильности.

Активация локальной ренин-ангиотензиновой системы при раке предстательной железы

Е.А. Черногубова^{1,2}, М.И. Коган², М.Б. Чибичян²,
И.А. Павленко³

¹ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН», Ростов-на-Дону;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону;

³ГБУ РО «Патологоанатомическое бюро», Ростов-на-Дону

Введение. Ренин-ангиотензиновая система (РАС) относится к числу систем организма, вовлеченных

в сложные пути канцерогенеза, и в последние годы привлекает внимание в связи с ее ролью в развитии РПЖ.

Задачи исследования. Анализ роли локальной РАС в патогенезе РПЖ.

Материалы и методы. В клиническую группу вошли 94 пациента с локальным (Т1–2) (66 %) и местно-распространенным (Т3–4) (34 %) РПЖ (средний уровень ПСА $32,64 \pm 0,98$ нг/мл, объем предстательной железы (ПЖ) $69,34 \pm 8,32$ мм³, сумма баллов по шкале Глисона по данным биопсии $6,55 \pm 1,14$, средний возраст пациентов $64,33 \pm 0,82$ года). Контрольную группу составили 20 практически здоровых мужчин. В секрете ПЖ определяли активность ангиотензинпревращающего фермента (КФ 3.4.15.1). Для ИГХ-исследования использовали материал полифокальных пункционных биопсий 10 больных, во всех случаях опухоль имела строение ацинарной аденокарциномы разной степени дифференцировки, соответствующей классификации Международного общества уропатологов (ISUP): в 2 случаях опухоль соответствовала группе ISUP-1, в 4 – ISUP-2/3, в 4 – ISUP-4/5. В ткани ПЖ оценивали экспрессию рецепторов ангиотензина II 2-го типа (Angiotensin II Type 2 Receptor, AT2-R).

Результаты. Увеличение активности ангиотензинпревращающего фермента в секрете ПЖ на 112,4 % ($p < 0,001$) по сравнению с контрольными показателями свидетельствует об активации локальной РАС и приводит к накоплению ангиотензина II в ткани ПЖ. Плейотропные функции ангиотензина II зависят от передачи сигналов через 2 типа рецепторов AT1-R и AT2-R. Существенных различий в количестве и распределении AT1-R при доброкачественной гиперплазии ПЖ, высокодифференцированной простатической интраэпителиальной неоплазии и аденокарциноме ПЖ, по данным других исследователей, не обнаружено (Septiadi I. et al., 2010).

Результаты ИГХ-исследования показали, что в ядрах опухолевых клеток наблюдается иммуноокрашивание с анти-AT2-антителами, причем интенсивность окрашивания не снижается по мере увеличения степени дедифференцировки. Наличие AT2-R в ядрах опухолевых клеток свидетельствует, по-видимому, о переходе на интракринный путь регуляции при РПЖ. Таким образом, по-видимому, подобный феномен характерен не только для тирозинкиназных рецепторов, но и для рецепторов, ассоциированных с G-белками

Выводы. Полученные нами данные подтверждают участие ангиотензина II и AT2-R в патогенезе РПЖ. Гиперактивность локальной РАС в ПЖ вовлечена в патогенез РПЖ.

Прогностические маркеры рецидива рака предстательной железы

Е.А. Черногубова^{1,2}, М.И. Коган², М.Б. Чибичян²

¹ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН», Ростов-на-Дону;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Приоритетной задачей современной онкоурологии является разработка новых подходов к мониторингу неопластических процессов в предстательной железе (ПЖ). Выявление белков, ассоциированных с агрессивными формами РПЖ, позволит получить новые данные о молекулярных механизмах канцерогенеза на разных этапах опухолевой прогрессии.

Задачи исследования. Идентифицировать маркеры для прогнозирования развития рецидива РПЖ.

Материалы и методы. В исследование включены 110 пациентов с РПЖ: 59 из них выполнена радикальная простатэктомия, 51 пациент получал гормонотерапию (ГЛТ). По результатам 18-месячного мониторинга уровня ПСА ретроспективно стратифицировали группы пациентов: с развитием биохимического рецидива и клиническими признаками рецидива; с безрецидивным течением. Для идентификации ассоциированных с прогрессированием РПЖ показателей определяли активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) (КФ 3.4.15.1) в сыворотке крови и экспрессию рецепторов ангиотензина II 2-го типа (Angiotensin II Type 2 Receptor, AT2-R) в ткани ПЖ.

Результаты. Установлено, что прогрессирование РПЖ, независимо от стадии заболевания и стратегии лечения РПЖ, ассоциировано с увеличением активности АПФ, которая начинает расти раньше, чем отмечается развитие биохимического рецидива. Построена прогностическая модель, позволяющая предсказать вероятность развития рецидива заболевания у конкретного пациента через месяц после начала лечения. Анализ активности АПФ и содержания ПСА в сыворотке крови позволил выделить группу пациентов с высоким риском развития рецидива после радикальной простатэктомии с чувствительностью и специфичностью 72,7 % ($p < 0,001$) и 91,2 % ($p < 0,001$); после ГЛТ – с чувствительностью и специфичностью 78,6 % ($p < 0,001$) и 94,6 % ($p < 0,001$) соответственно.

Увеличение активности АПФ у пациентов с прогрессированием РПЖ свидетельствует о накоплении ангиотензина II – пептидного регулятора канцерогенеза. Действие ангиотензина II осуществляется через 2 типа рецепторов AT1-R и AT2-R. Снижение экспрессии AT2-R в ткани ПЖ ассоциировано с прогрессированием заболевания после ГЛТ. И, напротив,

увеличение экспрессии AT2-R свидетельствует о благоприятном прогнозе терапии. При использовании модели предсказания биохимической прогрессии после ГЛТ в зависимости от значения AT2-R в ткани ПЖ чувствительность и специфичность теста составляют 87,5 % ($p < 0,01$) и 85,71 % ($p < 0,01$) соответственно.

Выводы. Анализ активности АПФ и экспрессии AT2-R в ткани ПЖ при РПЖ позволяет на ранних этапах терапии выделить группу пациентов с высоким риском развития рецидива заболевания и выбрать в отношении их оптимальную терапевтическую стратегию. РАС при РПЖ может рассматриваться как новая терапевтическая мишень для таргетной терапии.

Оценка безрецидивной выживаемости больных гормоноположительным первично-оперательным раком молочной железы с учетом *CYP2D6*-генотипа

Т.А. Шендрикова, А.В. Савинкова, М.Г. Филиппова,
Н. Мехтиева, С.М. Портной, Л.Н. Любченко

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. Тамоксифен, «золотой стандарт» адъювантной гормонотерапии больных РМЖ в репродуктивном и пременопаузальном периодах, также может назначаться в периоде постменопаузы. Длительность гормонотерапии тамоксифеном варьирует и может продолжаться до 5–10 лет. Тамоксифен биотрансформируется под воздействием фермента *CYP2D6* в эндоксифен (основной метаболит тамоксифена, главное действующее вещество). Показаниями к *CYP2D6*-генотипированию является необходимость прогнозирования эффективности тамоксифена у пациенток с гормоноположительным РМЖ, что позволит улучшить безрецидивную выживаемость (БРВ) и качество жизни больных.

Задачи исследования. Повысить эффективность адъювантной гормонотерапии тамоксифеном у больных гормоноположительным первично-оперательным РМЖ путем прогнозирования эффективности с использованием *CYP2D6*-генотипирования.

Материалы и методы. В исследование включены 111 больных РМЖ IA–IIB стадии, получавшие гормонотерапию тамоксифеном. Методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора «НПФ ДНК-Технология» выполнено молекулярно-генетическое исследование – определение полиморфных вариантов гена *CYP2D6* (*CYP2D6*3* (c2549delA, p.Arg259Glyfs, rs35742686), *CYP2D6*4* (c1846G>A, rs3893097) и *CYP2D6*6* (c1707T, p.Trp152Glyfs, rs5030655)). В зависимости от *CYP2D6*-генотипа пациенты распределены в 3 группы: экстенсивные (ЕМ),

интенсивные (ИМ) и медленные (РМ) метаболизеры тамоксифена.

Результаты. Средний возраст больных в группах составил $46,0 \pm 8,7$ года. По результатам генотипирования 78 (70,2 %) из 111 больных классифицированы как ЕМ; 26 (23,4 %) – ИМ; 7 (6,3 %) – РМ. Средняя длительность приема тамоксифена 20 мг/сут составила $2,7 \pm 1,7$ года. Пациенты ИМ и РМ были объединены в группу сниженного метаболизма (СМ), больные ЕМ составили группу нормального метаболизма (НМ). Лечение с включением полихимиотерапии (ПХТ) проведено у 50 (64 %) из 78 больных группы НМ, у оставшихся 28 (36 %) пациентов этой группы лечение не включало схемы ПХТ. У 25 (76 %) из 33 больных группы СМ лечение включало ПХТ, у 8 (24 %) пациентов этой группы лечение не включало ПХТ.

У 23 (20,7 %) из 111 пациентов развилось прогрессирование РМЖ на фоне приема тамоксифена 20 мг/сут. Прогрессирование после комплексного лечения с включением ПХТ развилось у 9 (11,5 %) из 78 больных группы НМ и у 6 (18,2 %) из 33 пациентов группы СМ. Таким образом, частота прогрессирования превалирует у пациентов группы СМ ($p > 0,05$). Прогрессирование после комбинированного лечения без включения ПХТ развилось у 2,6 % (2 из 78) больных группы НМ и у 18,2 % (6 из 33) пациентов группы СМ ($p = 0,02$). Нами были найдены статистически значимые различия в БРВ между больными групп НМ и СМ. Генотип *CYP2D6* ухудшает БРВ пациентов со сниженным метаболизмом ($p = 0,02$).

Выводы. Генотип *CYP2D6* влияет на БРВ больных гормоноположительным первично-оперательным РМЖ. У больных со сниженным метаболизмом БРВ статистически значимо хуже по сравнению с пациентами с нормальным метаболизмом ($p = 0,02$).

Полисомия хромосомы 7 в опухолевых клетках слизистой оболочки полости рта до и после лучевой терапии как показатель индивидуальной радиочувствительности

Т.Г. Шкаврова, Е.В. Голуб, В.В. Полькин, Г.Ф. Михайлова,
В.В. Цепенко, Ф.Е. Севрюков, В.С. Медведев, П.А. Исаев
МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России, Обнинск

Введение. Лечение рака слизистой оболочки полости рта предполагает радикальную хирургию с постоперационной адъювантной радиотерапией/ХТ или без нее. При проведении радиотерапии важно учитывать индивидуальную радиочувствительность пациента. Результаты исследований, проведенных *in vitro*

на клеточных линиях, полученных из сквамозных клеток карциномы человека, показали, что радиочувствительность клеток повышается при активации гена *EGFR* (Bonner J.A. et al., 1994). В дальнейшем было продемонстрировано, что высокий уровень экспрессии *EGFR* в опухолевых клетках орофарингеальной области коррелирует с повышением радиочувствительности (Smith B.D. et al., 2001). Количественные нарушения гена *EGFR* часто возникают за счет полисомии хромосомы 7, и это может иметь потенциальную прогностическую значимость для оценки индивидуальной радиочувствительности.

Задачи исследования. Исследование полисомии хромосомы 7 в опухолевых клетках слизистой оболочки полости рта до лучевой терапии и после нее.

Материалы и методы. Исследовали клетки опухоли 21 больного раком слизистой оболочки полости рта методом интерфазной флуоресцентной гибридизации *in situ* (I-FISH) с использованием ДНК проб *EGFR/CEP7* (Kreatech) до лучевой терапии и после первой суммарной очаговой дозы γ -излучения, диапазон которой составлял 18–26 Гр. Оценку достоверности различий проводили с помощью χ^2 -критерия.

Результаты. Встречаемость клеток с полисомией хромосомы 7 в среднем по группе до лечения и после лучевой терапии статистически значимо снизилась с 27,7 до 14,1 % ($p < 0,001$). При анализе индивидуального ответа на лучевую терапию у 12 (57 %) больных доля клеток с полисомией статистически значимо снизилась, у 5 (24 %) – осталась без изменений и у 4 (19 %) – статистически значимо увеличилась ($p < 0,05$).

Выводы. Предварительные данные показали, что после первой суммарной очаговой дозы практически у половины пациентов доля клеток с полисомией хромосомы 7 не снижается, а остается на прежнем уровне либо увеличивается. Из данных научной литературы известно, что наличие таких клеток приводит к прогрессии опухоли (Siebers T.J.H. et al., 2013) и увеличению вероятности развития рецидива (Pierssens D.D.C.G. et al., 2017).

Сравнительная оценка методов для выявления микрометастазов

И.Ж. Шубина, Л.Т. Мамедова, Н.В. Севян, М.В. Киселевский
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. Одной из важных проблем является вопрос обнаружения и оценки микрометастазов. Существуют различные методики их выявления и количественного определения, включающие иммуномагнитную сепарацию (ИМС), проточную цитометрию (ПЦ),

иммуноцитохимические и молекулярно-генетические методы. Несмотря на разнообразие как традиционных, так и самых высокотехнологичных методов, определение единичных опухолевых клеток затруднено в связи с их морфологическим разнообразием и все еще недостаточной специфичностью и эффективностью.

Задачи исследования. Сравнительное изучение эффективности выявления микрометастазов (циркулирующих опухолевых клеток).

Материалы и методы. Исследовали линии опухолевых клеток человека SCOV3 (рак яичников), MCF7 (РМЖ), K567 (эритробластный лейкоз), клинический материал (образцы опухолевой ткани, асцита, лимфы, периферической крови, костного мозга) больных раком яичников ($n = 23$), РШМ ($n = 7$), РМЖ ($n = 19$), рака легкого ($n = 16$). Выполняли цитологический анализ, ИФА, ИМС, ПЦ, ИГХ-анализ.

Результаты. На линиях клеток эпителиального происхождения SCOV3 и MCF7 указанными методами выявлена экспрессия эпителиального маркера EpCam, поверхностного антигена CD66a и растворимые рецепторы к СК8⁺18 в среде культивирования опухолевых клеток. Напротив, упомянутые маркеры отсутствовали в клетках лейкоза K562. В жидких средах клинического материала (лимфе, асците, сыворотке крови/крови) с помощью методов ИФА (СК8⁺18), ПЦ (CD66a) и ИМС (EpCam) маркеры опухолевых клеток выявлены в 50, 36 и 77 % случаев соответственно. Однако оказалось существенным, какой вид клинического материала подвергался исследованию. В асците цитологическим методом опухолевые клетки выявляли в 62 %, ИМС – в 20 %, ИФА – в 12 %, ПЦ – в 4 % случаев. В лимфе цитологически опухолевые клетки обнаруживали – в 10 %, ИМС – в 14 %, ИФА – в 46 %, ПЦ – в 30 % случаев. В крови: цитологически – в 3 %, ИМС – в 47 %, ИФА (в сыворотке) – в 49 %, ПЦ – в 1 % случаев. В образцах костного мозга пациентов с НМРЛ методом ИМС (СК7/8) выявлено 60 % случаев, содержащих цитокератин-положительные клетки. Анализ препаратов стандартного цитологического окрашивания обогатненной с помощью ИМС клеточной суспензии показал, тем не менее, в единичных случаях наличие ложноположительных результатов, т.е. клеток, которые цитологом не могли быть отнесены к опухолевым.

Выводы. Результаты выявления микрометастазов могут зависеть от использованной технологии. Необходимо учитывать вид клинического материала, который подвергается исследованию. Обогащенную методом ИМС клеточную суспензию следует контролировать цитологически. Методы ИМС, ПЦ и ИФА могут быть использованы для диагностики и мониторинга заболевания в целях обнаружения микрометастазов.

ВИРУСОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ ОПУХОЛЕЙ

Доклады

Растворимые формы основных компонентов сигнального пути контрольной точки иммунитета (PD-1 и PD-L1) в сыворотке крови больных раком почки: клинико-морфологические корреляции

Е. С. Герштейн¹, А. А. Морозов², И. О. Горячева¹,
А. А. Алферов¹, С. Д. Бежанова¹, В. В. Базаев²,
В. Б. Матвеев¹, Н. Е. Кушлинский¹

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

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

Введение. Рак почки — одно из наиболее иммуночувствительных онкологических заболеваний. Наиболее значимый прорыв в этой области произошел в результате создания препаратов, направленных на подавление сигнального пути, так называемой контрольной точки иммунитета — PD-1/PD-L1, — контролирующей в физиологических условиях аутоиммунную реакцию. Экспрессию PD-1 и/или PD-L1 в опухоли изучают в качестве как предикторов эффективности соответствующей иммунотерапии, так и молекулярных маркеров общего прогноза и выживаемости пациентов. С этой же целью можно использовать определение растворимых форм данных белков (sPD-1 и sPD-L1) в сыворотке или плазме крови.

Задачи исследования. Сравнительная оценка содержания sPD-1 и sPD-L1 в сыворотке крови практически здоровых лиц, больных раком и пациентов с доброкачественными опухолями почки и анализ взаимосвязи этих маркеров с основными клинико-морфологическими особенностями рака почки.

Материалы и методы. Были обследованы 110 больных раком (66 мужчин и 44 женщины; возраст 33–81 год) и 11 пациентов с доброкачественными опухолями (3 мужчин и 8 женщин; возраст 29–84 года) почки. В контрольную группу вошли практически здоровые 19 мужчин и 18 женщин соответствующего

возраста. Содержание sPD-L1 и sPD-1 в сыворотке крови определяли с помощью стандартных наборов для ИФА (Affimetrix, eBioscience, США).

Результаты. Содержание sPD-L1 в сыворотке крови первичных больных раком и пациентов с доброкачественными новообразованиями почки достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,0001$ и $< 0,05$). Уровень sPD-L1 достоверно возрастает с увеличением стадии заболевания ($p < 0,001$), при увеличении индекса Т от 1 до 3, снижаясь при Т4. Он достоверно выше у пациентов с метастазами в лимфатических узлах, независимо от их количества (N1 или N2), чем у больных с N0, повышен при наличии отдаленных метастазов, а также при опухолях со степенью злокачественности G₃₋₄, по сравнению с G₁₋₂. Уровни sPD-1 в обследованных группах достоверно не различались, не зависели от стадии рака почки, наличия метастазов в лимфатических узлах и отдаленных органах, но снижались при Т4 по сравнению с аналогичным показателем у пациентов с менее распространенной первичной опухолью, а также были достоверно ниже при светлоклеточном, чем при хромофобном и папиллярном гистологическом вариантах рака почки.

Выводы. Уровень sPD-L1 при раке почки коррелирует с распространенностью процесса и степенью злокачественности опухоли и может рассматриваться в качестве перспективного маркера для мониторинга эффективности анти-PD1/PD-L1-терапии. Вопрос о клиническом значении sPD-1 требует дальнейшего изучения.

Влияние на выживаемость больных раком шейки матки физического статуса вируса папилломы человека

М. К. Ибрагимова^{1,2}, М. М. Цыганов^{1,2}, И. В. Дерюшева¹,
О. Н. Чуруксаева^{1,2}, Л. А. Коломиец^{1,2}, Н. В. Литвяков^{1,2}

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

Введение. В инфицированной клетке ВПЧ может существовать в эписомальной (вне хромосом клетки),

интегрированной (встроенной в геном клетки) и смешанной (наличие свободного и встроенного в ДНК клетки-хозяина вируса) формах. Прогрессия от клеточных изменений, связанных с ВПЧ-инфекцией, до развития РШМ занимает 10–40 лет, но редко может развиваться за 1–2 года, что, несомненно, доказывает важность своевременного мониторинга больных с папилломавирусной инфекцией и проведения вирусологических исследований для выявления групп риска развития онкологической патологии.

Задачи исследования. Оценка безрецидивной и общей выживаемости ВПЧ-положительных (с учетом физического статуса ВПЧ 16-го типа) больных первичным РШМ.

Материалы и методы. В исследование были включены 140 пациенток (возраст 21–79 лет) с первичным РШМ I–IVA стадий. Диагноз верифицирован гистологически, опухоли охарактеризованы в соответствии с классификацией FIGO. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки. Выявление, генотипирование ДНК ВПЧ и определение физического статуса ДНК ВПЧ 16-го типа проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием комплектов реагентов фирмы Amplisens®. Оценку выживаемости выполняли по методу Каплана–Майера.

Результаты. Общая инфицированность ВПЧ составила 77,1 %. Из 108 ВПЧ-положительных больных РШМ ВПЧ 16-го типа идентифицирован у 87 (80,6 %) пациенток, 31-го типа – у 8 (7,4 %), 33-го типа – у 6 (5,6 %), остальные типы встречались менее чем в 3,5 % случаев. Для 87 пациенток с ВПЧ 16-го типа проведено определение физического статуса ДНК ВПЧ и показано, что частоты форм ВПЧ 16-го типа распределились следующим образом: эписомальная форма встречалась в 8,9 % случаев, смешанная – в 64,6 % и интегрированная – в 26,5 %. Следующим шагом было изучение исхода заболевания в зависимости от физического статуса вируса. Установлено, что у больных с эписомальной формой ВПЧ 16-го типа наблюдается 100 % безрецидивная и общая выживаемость. Самый неблагоприятный исход отмечается у больных с интегрированной формой ВПЧ 16-го типа.

Выводы. В результате исследования установлена прогностическая значимость физического статуса ВПЧ 16-го типа в отношении безрецидивной и общей выживаемости больных РШМ. Наличие эписомальной формы вируса является благоприятным прогностическим фактором. Интегрированная форма вируса – крайне неблагоприятный фактор прогноза, и выживаемость таких больных значительно ниже, чем пациенток со смешанной и эписомальной формой вируса.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-44-703 004).

Перенос генов Т-клеточного рецептора – новый способ формирования противоопухолевого иммунитета

Д.Б. Казанский¹, Л.М. Хромых¹, А.А. Калинина¹,
М.А. Замкова¹, А.В. Брутер¹, Н.А. Персиянцева¹,
И.О. Чикилева¹, Л.Н. Нестеренко², К.А. Собянин²

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

²ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва

Ранее при исследовании трансгенных животных нами были обнаружены Т-клеточные рецепторы (TCR), в распознавании которыми МНС/пептидных комплексов доминируют α -цепи (МНС – major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости). Мы показали, что мыши линии B10. D2 (R101), несущие трансген α -цепи TCR 1d1 клеток памяти, специфичный к молекуле гистосовместимости H-2K^b лимфомы EL4, отторгают клетки лимфомы EL4 в течение 3 дней, тогда как у мышей дикого типа этот процесс занимает 10–12 дней. Отторжение посторонней опухоли – мастоцитомы P815 – происходит в обычные сроки, что указывает на антигенную специфичность отторжения. Этот эффект может быть объяснен только тем, что трансгенная α -цепь способна объединяться с разнообразными эндогенными β -цепями и после выхода образовавшихся TCR на поверхность Т-лимфоцитов определять их специфичность, а также эффекторные функции.

В целях проверки этого предположения мы осуществили ретровирусную трансдукцию гена α -цепи TCR 1d1 в активированные Т-лимфоциты мышей линии R101 с последующим адоптивным переносом мышам той же линии. Результаты показали, что адоптивный перенос гена α -цепи TCR 1d1 приводит к защитным и терапевтическим эффектам у мышей, получивших трансплантат опухолевых клеток.

Для оценки представленности таких доминантных α -цепей TCR в репертуаре, а также универсальности обнаруженного явления мы провели аналогичную работу по поиску доминантных α -цепей TCR клеток памяти, специфичных к микробным патогенам – *Listeria monocytogenes* и *Salmonella typhimurium*. Для этого Т-клетки памяти, специфичные к микробным патогенам, рестимулировали в культуре *in vitro* и α -цепи подвергли секвенированию нового поколения (NGS) с последующим геномным клонированием полноразмерных α -цепей, представленность которых возрастала после рестимуляции специфическим антигеном.

Результаты экспериментов по трансдукции полученных генов в Т-лимфоциты и оценке приобретенных ими функциональных свойств показали, что доминантные α -цепи содержат около 20 % репертуара TCR

клеток памяти (5 из 24 вариантов для *Salmonella typhimurium* и 6 из 25 вариантов для *Listeria monocytogenes*).

Полученные результаты указывают на возможность существенного ускорения поиска TCR, пригодных для персонифицированной иммунотерапии онкологических заболеваний в клинике, а также на возможность использования обнаруженного эффекта для формирования экстренной защиты человека и животных от инфекционных заболеваний без проведения вакцинации.

Эволюционные концепции в онкологии и вирусологии

А.П. Козлов

ЧНИУ «Биомедицинский центр», Санкт-Петербург;
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург;

ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург;
ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН», Москва

Интеграция эволюционной биологии и наук о здоровье привела к возникновению дарвиновской медицины, эволюционной эпидемиологии и эволюционной онкологии. К эволюционной онкологии можно отнести сравнительную онкологию (XIX–XX вв.), представления о соматической эволюции опухолевых клеток и отборе в популяциях опухолевых клеток (Cairns, 1975; Nowell, 1976, 1986), противораковой селекции (anti-cancer selection) (Graham, 1992), так называемую экологическую гипотезу (Gatenby, 2009) и т. д.

Нами развиваются представления о роли опухолей в эволюции организмов (Козлов, 1983, 1987, 1988, 2008, 2016; Kozlov, 1979, 1996, 2010, 2014, 2016). Согласно этим представлениям наследуемые опухоли на ранних стадиях прогрессии или доброкачественные опухоли могли снабжать эволюционирующие многоклеточные организмы дополнительными клеточными массами для экспрессии эволюционно новых генов, возникающих в ДНК клеток зародышевой плазмы. В докладе будут рассмотрены нетривиальные предсказания нашей теории и их экспериментальное подтверждение.

Значение вирусов для эволюции их хозяев было впервые отмечено Н. Anderson (1970). Эти представления были более глубоко разработаны В.М. Ждановым и Т.И. Тихоненко (1974), а также D. Reaney (1974). Согласно этим представлениям осуществляемый с помощью вирусов обмен значительными сегментами ДНК между различными видами организмов, а также между более крупными таксономическими группами является важным фактором эволюции. В настоящее время эти представления получают все больше поддержки (Rohwer и Thurber, 2009).

Таким образом, опухоли и вирусы могли предоставлять материал для эволюции их хозяев.

Активация провоспалительной программы в модельных опухолеассоциированных макрофагах под воздействием цисплатина

И.В. Ларионова^{1,2}, Т.А. Дронова², Т. Лиу³, В.Б. Рябов^{1,3},
А.М. Киселев⁴, Е.В. Денисов^{1,2}, Д.С. Халяпин¹,
Н.В. Чердынцева^{1,2}, Ю.Г. Кжышковска^{1,3}

¹Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

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

³Институт трансфузионной медицины и иммунологии, Медицинский факультет Маннгейма, Университет Гейдельберга, Гейдельберг, Германия;

⁴ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Известно, что ХТ обеспечивает условия вовлечения иммунной системы в цитотоксический ответ опухолевых клеток. Иммунные клетки могут модифицировать эффективность ХТ в направлении прогрессии опухоли. Результаты некоторых исследований показывают, что, например, опухолеассоциированные макрофаги (ОАМ) накапливаются в опухолях после ХТ и способствуют развитию рецидива опухоли. Однако механизмы редактирования ОАМ под влиянием ХТ остаются до конца неизученными.

С помощью секвенирования следующего поколения нами получены уникальные данные, показывающие, что основными группами генов, активированными цисплатином, являются гены, вовлеченные в воспалительный ответ, интерферонзависимые пути, p53-зависимый апоптоз, гены, отвечающие на репарацию ДНК. В качестве модельной системы ОАМ нами была использована система стимуляции свежевыделенных CD14+ моноцитов цитокинами IL-4 (интерлейкин 4) и TGFβ (трансформирующий фактор роста β) и путем добавления к моноцитам супернатантов от опухолевых клеток MCF-7 (РМЖ) и Colo206F (колоректальный рак). Нами проведено полнотранскриптомное секвенирование на платформе Illumina NextSeq500. С помощью программы fsea проводили обогащение по биохимическим и регуляторным путям с использованием списков генов, ранжированных по уровню экспрессии и значению *p*. Для биоинформатического анализа использовали базы данных Hallmark gene sets, Reactome, KEGG. Подтверждение данных секвенирования проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени на модельных макрофагах 6 независимых доноров.

Показано, что с наибольшим уровнем значимости на транскрипционном уровне повышалась экспрессия

генов, вовлеченных в интерферонзависимые пути: *CXCL10*, *IRF7*, *FAS*, *GBP1*, *MX1*. Методом ПЦР в режиме реального времени выявлено повышение экспрессии этих генов в образцах после добавления цисплатина, что однозначно подтверждает обнаруженные нами с помощью секвенирования следующего поколения изменения транскрипционного профиля ОАМ.

Таким образом, по данным как секвенирования следующего поколения, так и анализа отдельных генов методом ПЦР можно сделать вывод о том, что ответ макрофагов на цисплатин вызывает активацию воспалительной программы. Влияние данной программы на опухолевую прогрессию является перспективным направлением исследований в нашей лаборатории.

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

Цитотоксический противоопухолевый эффект моноклональных антител против раково-тестикулярного антигена PRAME

А.В. Мисюрин^{1,2}, Ю.П. Финашутина^{1,2}, Н.А. Лыжко^{1,2},
О.Н. Солопова¹, Н.Н. Касаткина¹, В.В. Тихонова¹,
В.А. Мисюрин¹

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

²ООО «ГеноТехнология», Москва

Раково-тестикулярный антиген PRAME активирован не менее чем у 50 % больных с различными злокачественными новообразованиями. Обнаружено, что PRAME является одним из драйверов канцерогенеза. Как правило, с экспрессией PRAME связан неблагоприятный клинический прогноз и резистентность к ХТ опухолей. Показано, что с помощью молекулярного определения экспрессии PRAME можно эффективно оценить минимальную остаточную болезнь при онкогематологических заболеваниях. PRAME рассматривается в качестве перспективной мишени для разработки иммунотерапевтических подходов для лечения PRAME-экспрессирующих неоплазий. Мы обнаружили, что онкобелок PRAME локализуется не только в ядре и цитоплазме опухолевых клеток, но и на их поверхности. Кроме того, нами показано, что высокий титр антител у иммунизированных рекомбинантным белком PRAME лабораторных мышей подавляет рост меланомы B16F10, трансфицированной и устойчиво экспрессирующей человеческий ген PRAME. Нами получена серия гибридом, продуцирующих мышиные моноклональные антитела против человеческого белка PRAME. В экспериментах *in vitro* обнаружено, что некоторые из этих антител обладают цитотоксической активностью в отношении PRAME-экспрессирующих опухолей. Анализ первичной

последовательности варьируемых участков иммуноглобулиновых генов тяжелых и легких цепей показал, что эти гибридомы продуцируют антитела, имеющие одинаковые герминальные гены, но различающиеся между собой 4–5 нуклеотидными заменами, очевидно, обусловленными стадией гипермутирования в зародышевых центрах лимфатических узлов одного и того же клона-предшественника. Моноклональные антитела, полученные именно из этих гибридом, эффективно окрашивают поверхность клеток PRAME-экспрессирующих опухолевых линий.

Особенности папилломавирусной инфекции при плоскоклеточном цервикальном раке у иммунокомпрометированных больных

А.Л. Рунов¹, Т.Ф. Савостьянов², А.С. Лисянская²,
Е.В. Курчакова¹, М.Г. Исагулянц³, Л.Е. Албегова⁴,
М.С. Вонский¹

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

²СПб ГБУЗ «Городской клинический онкологический диспансер», Санкт-Петербург;

³ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва;

⁴СПб ГБУЗ «Городская туберкулезная больница № 2», Санкт-Петербург

ВПЧ высокого канцерогенного риска является причиной всех цервикальных раков и большинства случаев рака анального канала, головы и шеи. Несмотря на то что иммунная система в большинстве случаев ($\approx 90\%$) способна элиминировать ВПЧ-инфекцию, в оставшихся случаях персистенция ВПЧ высокого канцерогенного риска приводит к развитию инвазивных опухолей, а при поражении иммунитета риск развития инвазивного ВПЧ-ассоциированного цервикального рака увеличивается в 5–10 раз. В настоящей работе нами исследованы особенности ВПЧ-инфекции у иммунокомпрометированных женщин с плоскоклеточным РШМ.

Исследование проводили на основании разрешения этического комитета НИЦЭМ им. акад. Н.Ф. Гамалеи (протокол 11 от 03.06.2017). В работе использованы препараты гистологически верифицированных парафинизированных фиксированных в формалине образцов опухоли плоскоклеточного РШМ больных следующих групп: контрольная группа ($n = 10$); группа ВИЧ (+) ($n = 11$); группа туберкулеза (ТБ) (+) ($n = 8$) и группа ВИЧ (+) ТБ (+) ($n = 10$) из коллекции ГКОД г. Санкт-Петербурга. ДНК выделяли с помощью набора Allprep DNA/RNA FFPE Kit (Quagen) согласно инструкции производителя. Присутствие ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска (типы 16, 18, 31, 33,

35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59) определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием тест-системы Амплисенс ВПЧ высокого канцерогенного риска генотип-FL (Интерлабсервис). Число копий ДНК ВПЧ оценивали по разности значений порогового цикла для данного ВПЧ и контрольного гена β -глобина (Δ Сt).

Показано, что поражение иммунитета приводит к расширению спектра ВПЧ, выявляемых в ткани опухоли, ассоциированных с инфекцией ТБ или ТБ + ВИЧ коинфекцией в большей степени, чем с моноинфекцией ВИЧ. При этом ВИЧ-инфекция в ряде случаев ассоциирована со снижением вирусной нагрузки ВПЧ 16-го типа в ткани опухоли на фоне коинфекции ВПЧ других типов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-54-30 002).

Measurement of NK cell activity in patients with cancer

Vladimir Jurisic

*Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia;
Institute of Oncology and Radiology, Belgrad, Serbia*

Human natural killer (NK) cells are an important subpopulation of the innate immune system, and comprise about 15 % of all lymphocytes. Functionally, NK cells are

able to lyse transformed, infected, and allogeneic cells without prior sensitization or MHC restriction, and play an important role in antitumor immune defense by two proposed mechanisms, secretory and non-secretory. Erythromyeloid leukemia cells line (K-562) was commonly used as target here like in many other investigation. NK cell function was determined in kinetic study and by different assay. In this study a) standard ^{51}Cr release assay, b) LDH release assay from target cells and c) intracellular perforin and intracellular d) IFN- γ amount in effectors gated CD3 $^{-}$ CD56 $^{+}$ cells were analyzed and used for estimation of NK cell function. Correlation between Cr release and LDH release was obtained simultaneously with percentage of apoptosis and necrosis in target K-562 cells. The percentage of intracellular amount of perforin are decrease from 95.32 % (measured at 4 h) to 85.54 % (measured at 24 h) and correlates with significant decrease of IFN- γ expression from 6.8 % (measured at 4 h) to 3.9 % (measured at 24 h) (Mann-Whitey U test, $p < 0.05$). However, intracellular expression of CD107, analyzed in gated NK effectors population, showing increasing values from 0.91 % (measured at 4 h) to 15.51 % (measured at 24 h) that corresponding with death target K-562 cells. So, these data indicated that using several assay we can analyzed molecular mechanism involved in cytotoxic activity of NK cells by measuring effectors cell function simultaneously with measurement of degree of target cell (K-562 cells). Together these data can help much more for understanding molecular mechanism NK cell function in hematological tumor as well in other tumors.

Постеры

Отработка экспериментальной модели для изучения механизма и поиска предикторов иммунотерапии рака анти-CTLA-4-антителами

Л.Н. Барбашова¹, Д.В. Южакова¹, Г.В. Шаронов^{1,2},
Е.В. Загайнова¹, Д.М. Чудаков^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва

Введение. Появившись около 10 лет назад, терапия с использованием антител к контрольным точкам активации иммунитета произвела переворот в области онкологии. Сегодня этот подход позволяет полностью вылечивать некоторые формы рака на последней стадии, однако помогает он пока лишь небольшому проценту пациентов. Повысить эффективность иммунотерапии можно путем индивидуального подбора типа иммунотерапии, а также сочетанием нескольких подходов и препаратов. Для рационального подбора терапии и их сочетаний сегодня не хватает понимания механизмов и предикторов эффективности иммунотерапии. Для изучения молекулярно-клеточных механизмов противоопухолевого иммунитета необходимы подходящие опухолевые модели и схемы их терапии на мышах, которые сегодня недостаточно развиты.

Задачи исследования. Отработка схемы иммунотерапии мышшиной меланомы B16 антителами против CTLA-4.

Материалы и методы. В работе использованы трансгенные мыши, у которых регуляторные Т-клетки экспрессируют химерный транскрипционный фактор FoxP3-EGFP. Мышам подкожно инокулировали 1 млн клеток линии B16 и на 9–10-й день после инокуляции начинали иммунотерапию. Терапевтические антитела против мышшиного CTLA-4 вводили внутривенно.

Результаты. В результате оптимизации нами была подобрана схема иммунотерапии, которая, с одной стороны, обеспечивает выраженный терапевтический эффект, с другой – позволяет выделить опухолинфильтрирующие лимфоциты (TILs) разных субпопуляций (CD4 и CD8 T-, B- и регуляторные Т-клетки) с помощью флуоресцентно-активированной клеточной сортировки в количестве не менее 2000 клеток. Такое количество TILs необходимо для дальнейшего анализа репертуаров их антигенных рецепторов и спектра экспрессируемых генов, проводимого в со-

трудничестве с коллегами из Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Нами выявлено увеличение содержания CD4 хелперных Т-лимфоцитов в опухоли после терапии и относительного содержания В-клеток по мере роста опухоли. Последний факт указывает на образование в опухоли герминативных центров, которые играют ключевую роль в противоопухолевом иммунном ответе.

Выводы. Полученные данные указывают на сложный характер иммунного ответа при иммунотерапии меланомы B16 и на важную роль в нем CD4⁺- и В-клеток. Более детально изучить данный ответ мы планируем путем геномного анализа субпопуляций лимфоцитов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Российской Федерации (грант № 14. W03.31.0005).

Характеристика иммунного инфильтрата Уртино-подобного варианта папиллярного рака щитовидной железы

А.В. Боголюбова¹, А.Ю. Абросимов², С.Ю. Смирнова³,
Д.В. Купраш¹, П.В. Белоусов¹

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

²ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва;

³ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва

Клетки иммунной системы – неотъемлемый компонент микроокружения неопластической ткани, который может как стимулировать, так и замедлять рост опухоли. Одним из редких гистологических вариантов папиллярного рака щитовидной железы (ПРЩЖ) является Уртино-подобный ПРЩЖ, характеризующийся обильной лейкоцитарной инфильтрацией стромы опухоли. Тем не менее детальный анализ иммунного инфильтрата стромы данной опухоли не проводился.

Нами проведен ИГХ-анализ основных популяций лейкоцитов 9 случаев Уртино-подобного ПРЩЖ, который показал преобладание плазматических клеток и Т-лимфоцитов в иммунном инфильтрате стромы опухолей. Анализ клональности опухолинфильтрирующих В- и Т-лимфоцитов, проведенный по протоколу мультиплексного ПЦР BIOMED-2/Euroclonality, показал поликлональный характер, что может

свидетельствовать об иммунном ответе на широкий спектр опухоль-ассоциированных антигенов.

Анализ *in silico* субпопуляционного состава иммунных клеток для случаев Уртино-подобного ПРЩЖ, взятых из базы данных TCGA (<https://cancergenome.nih.gov/>), был проведен с применением данных из работы Thorsson и соавт., посвященной изучению иммунного ландшафта опухолей человека (Immunity 2018;48 (4):812–30). Продемонстрировано, что различные параметры, указывающие на противоопухолевый иммунный ответ (количество опухолинфильтрирующих лимфоцитов, плазматических клеток, отношение макрофагов M1/M2 и др.), повышены в случае Уртино-подобного ПРЩЖ по сравнению с другими вариантами ПРЩЖ.

Таким образом, результаты комплексного ИГХ, молекулярно-биологического и анализа *in silico* указывают на опухолеспецифический характер иммунной инфильтрации Уртино-подобного ПРЩЖ.

Работа выполнена в рамках реализации научной программы при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-315-00168).

Ассоциация развития устойчивости опухолевых клеток TNP-1 к химиотерапии под действием цитомегаловируса с изменением баланса изоформ белка P73

С.С. Емельянова¹, Я.Ю. Чернорыж², К.И. Юрлов²,
Н.Е. Федорова², А.А. Куш², А.В. Иванов³, С.Н. Кочетков³,
В.Н. Вербенко¹, Г.Р. Виноградская¹

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл.;

²ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии
им. акад. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва;

³ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Устойчивость опухолей к ХТ – важнейшая проблема современной медицины. Цитомегаловирус (ЦМВ) не является общепризнанным онкогенным вирусом, но способен индуцировать антиапоптотическую программу, препятствующую противоопухолевой терапии. Одной из мишеней ЦМВ при развитии апоптоза может быть белок семейства транскрипционных факторов p53–p73, имеющий ряд изоформ, оказывающих как проапоптотическое (полноразмерная изоформа TAp73), так и онкогенное (укороченная ΔNp73) действие. Изменение их баланса в сторону ΔNp73 может приводить к устойчивости клеток к противоопухолевой терапии.

Ранее нами был показан защитный эффект ЦМВ в культуре лейкемических клеток TNP-1, обработанных противоопухолевым препаратом доксорубицином

(ДОКС). Результаты исследования транскрипции гена *p73* показали его высокую активность, характерную для опухолевых клеток. Отношение уровней изоформ-специфических матричных РНК (мРНК) этого и референсного гена *GAPDH* составило 3×10^{-2} и 1×10^{-2} для изоформ TAp73 и ΔNp73 соответственно, что на 3 порядка выше, чем экспрессия гена *p73* в неопухолевых клетках – фибробластах человека (10^{-5} для TAp73 и отсутствие сигнала для ΔNp73). Экспрессия мРНК TAp73 и ΔNp73 сохранялась на высоком уровне как минимум 48 ч после инфицирования клеток ЦМВ.

На белковом уровне ЦМВ сдвигал соотношение TAp73/ΔNp73 в сторону укороченной изоформы. Через 24 ч после инфицирования оно составляло $0,73 \pm 0,03$ против $0,86 \pm 0,04$ в контрольных клетках. ДОКС увеличивал количество белка *p73* и значительно сдвигал отношение TAp73/ΔNp73 в сторону полноразмерной изоформы до $1,78 \pm 0,29$ в неинфицированных клетках, а в инфицированных лишь приближал к единице ($0,98 \pm 0,07$).

При развитии апоптоза в клетке должны активироваться механизмы, сдвигающие соотношение TAp73/ΔNp73 в сторону TA. Существует механизм деградации ΔNp73 белком-регулятором полиаминового цикла – антизимом, который активируется при накоплении высших полиаминов. Инкубация TNP-1 с ингибитором катаболизма полиаминового цикла N,N'-бис(2,3-бутадиенил)-1,4-бутандиамина гидрохлоридом приводила к восстановлению чувствительности клеток к ДОКС и двукратному возрастанию отношения TAp73/ΔNp73 в ДОКС-обработанных инфицированных и не инфицированных клетках.

Таким образом, устойчивость опухолевых клеток к ХТ, вызываемая ЦМВ, может быть связана со способностью вируса ингибировать деградацию укороченной изоформы ΔNp73, что, в свою очередь, ведет к изменению баланса TAp73/ΔNp73. Этот эффект отменяется при использовании N,N'-бис(2,3-бутадиенил)-1,4-бутандиамина гидрохлорида, за счет чего запускается апоптотическая программа, приводящая к повышению эффективности ХТ.

Изучение экспрессии эндогенных ретровирусов человека в зависимости от их эволюционной новизны

А.А. Макашов, А.П. Козлов

ЧНИУ «Биомедицинский центр», Санкт-Петербург;
ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург;
ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург

Введение. Ранее мы показали, что человеческий геном содержит многие эволюционно новые гены и/или нуклеотидные последовательности, которые экспрессируются опухолеспецифически либо преимущественно в опухолях. Для подобных генов был предложен термин *TSEEN* (*tumor specifically expressed, evolutionarily new*) — эволюционно новые гены с опухолеспецифической экспрессией (Kozlov, 2014, 2016). В нашей недавней работе (Makashov et al. Unpublished) мы показали, что разные классы опухолеассоциированных генов обладают различной эволюционной новизной, подтвердили существование генов *TSEEN*. Также мы продемонстрировали коэволюцию онкогенов, генов — опухолевых супрессоров и дифференцировочных генов, что свидетельствует о возможной роли опухолей в происхождении новых клеточных типов.

Задачи исследования. Анализ опухолеспецифичности экспрессии эндогенных ретровирусов семейств HERV-K для молочной железы, предстательной железы и тканей легкого.

Материалы и методы. Последовательности эндогенных ретровирусов человека были получены из открытой базы данных HERVd (<https://herv.img.cas.cz/>). Данные РНК-секвенирования нормальных и опухолевых тканей были получены из баз GTEx (<https://gtexportal.org/home/>) и TCGA (The Cancer Genome Atlas) (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>) соответственно. Анализ специфичности экспрессии выполнен с помощью программ MOSAIK, использованной для выравнивания ридов на нуклеотидные последовательности эндогенных ретровирусов, и HTSeq-count, примененную для подсчета количества ридов и установления относительной величины экспрессии (FPKM). Проверяться экспрессия гена *env* каждого представителя семейства.

Перспективные пути повышения эффективности иммунотерапии рака с использованием блокаторов иммунных контрольных точек

С.Б. Оникиенко¹, В.А. Черешнев², В.Ю. Кравцов^{1,3},
И.Б. Максимов⁴, А.В. Земляной¹, Н.В. Бычкова³,
В.В. Лищенко³, А.Л. Ниворожкин⁵

¹ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург;
²ФБУН «Институт иммунологии и физиологии УО РАН», Екатеринбург;
³ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург;
⁴АО «РТ-Медицина» ГК «Ростех», Москва;
⁵Alternative Innovative Technologies, LLC, Бостон, США

Введение. За создание новых препаратов, совершивших революцию в иммунотерапии рака, которые блокируют тормозные рецепторы Т-лимфоцитов, в 2018 г. присуждена Нобелевская премия по медицине. Эта терапия помогает при лечении метастатического рака в 10–30 % случаев. Однако она может вызывать опасные для жизни аутоиммунные побочные реакции. Это диктует необходимость проведения исследований, направленных на уменьшение выраженности побочных реакций и повышение эффективности применения блокаторов иммунных контрольных точек.

Задачи исследования. Изучить эффективность лечения и выраженность побочных реакций при комбинированном применении пониженных доз блокатора PD-1 ниволумаба с двойным блокатором PD-1 и Tim-3 рецепторов БТШ70, онколитическим вирусом Сендай, низкомолекулярными производными продигиозана и пробиотиком *Streptococcus salivarius*. Разработать технологии персонализированной иммунотерапии с учетом результатов иммунологического обследования пациента.

Материалы и методы. При гиперэкспрессии PD-1 рецепторов Т-лимфоцитов вводили ниволумаб (1,5–2,0 мг/кг) в комбинации с БТШ70 (0,05–0,1 мг/кг) 1 раз в 2 нед ($N = 6–12$). При снижении экспрессии PD-1 дополнительно вводили онколитический вирус Сендай 1–2 раза в неделю ($N = 12$). При сохранении гиперэкспрессии PD-1 применяли *Streptococcus salivarius*, а при повышении экспрессии Tim-3 вводили нетоксичные производные продигиозана (0,01 мг/л), полученные путем его обработки пучком электронов (патент РФ № 2662916). Выявляли перспективность применения ниволумаба, БТШ70 и их комбинации путем цитометрического определения PD-1⁺ лимфоцитов до инкубации биопроб с этими препаратами и после нее.

Результаты. При применении ниволумаба (1,5–2,0 мг/кг) в сочетании с БТШ70 побочных реакций

не наблюдалось. У 4 из 7 пациентов выявлен частичный регресс опухоли. При изолированном приеме ниволумаба в дозе 3 мг/кг этот эффект обнаружен у 2 из 6 пациентов, аутоиммунные реакции – у 3 из 6. При персонализированной иммунотерапии частичный регресс опухоли выявлен в 34 из 65 случаев, в контрольной группе – в 16 % случаев. После циторедуктивного хирургического лечения рака полный ответ на персонализированную терапию получен у 7 пациентов.

Выводы. Персонализированная терапия рака на основе комбинации ниволумаба с БТШ70, онколитическим вирусом Сендай, низкомолекулярными производными продигозана и пробиотиком *Streptococcus salivarius* позволяет значительно повысить эффективность иммунотерапии.

Фенотипические особенности моноцитов классической и неклассической субпопуляций при раке молочной железы

М.Р. Патышева¹, М.Н. Стахеева¹⁻³, О.Е. Савельева¹,
Н.А. Тарабановская¹, Е.М. Слонимская¹,
Ю.Г. Кжышковска^{2,4}, Н.В. Чердынцева^{1,2}

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

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

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», Томск;

⁴Отдел врожденного иммунитета и толерантности, Институт трансфузионной медицины и иммунологии, Медицинский факультет, Маннхайм, Университет Гейдельберга, Маннхайм, Германия

Введение. В настоящее время известно, что моноциты, являясь пластическим ресурсом для пополнения пула опухолеассоциированных макрофагов, вовлечены в патогенез злокачественного роста (Mantovani A. et al., 2012). Актуальным считается определение основных субпопуляций моноцитов, различающихся по своему эффекторно-регуляторному потенциалу, а также закономерности их поляризации в крови, определяющей их дальнейший про- либо противоопухолевый статус в ткани.

Задачи исследования. Исследовать популяционную структуру моноцитов крови в ассоциации с маркерами M1/M2-поляризации при РМЖ.

Материалы и методы. В исследование были включены 8 здоровых женщин и 7 пациенток с верифицированным диагнозом РМЖ, у которых также методом ИГХ идентифицировали молекулярный подтип. Популяционную принадлежность и признаки M1/M2-поляризации моноцитов определяли по экспрессии субпопуляционных маркеров (CD14 и CD16) и маркеров M1/M2-поляризации (HLA-DR и CD163 соответственно) методом проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Полученные результаты показали, что моноциты вовлекаются в процесс опухолевой прогрессии дифференцированно. Обнаружено, что при РМЖ классическая субпопуляция CD14⁺CD16⁻ составляла 63,66 % и была ниже аналогичного показателя у здоровых женщин (91,02 %; $p < 0,1$). При этом у больных РМЖ доля моноцитов с фенотипом неклассической субпопуляции CD14⁻CD16⁺, наоборот, превышала соответствующий показатель у здоровых лиц (4,04 и 0,17 %; $p < 0,05$). В отношении маркеров поляризации продемонстрировано, что если в группе доноров экспрессия CD163 наблюдалась практически на всех клетках классической популяции (CD14⁺CD16⁻CD163⁺ – 99,97 %), то у пациенток с РМЖ количество моноцитов CD14⁺CD16⁻CD163⁺ было ниже и составило только 39,41 % ($p < 0,1$). Поляризованные по M1-типу CD14⁻CD16⁺HLA-DR⁺ были обнаружены только при трижды негативном подтипе опухоли, который считается наиболее иммуногенным, в отличие от люминального B и Her2⁺ подтипов (13,12; 0 и 0 % соответственно; $p < 0,1$).

Выводы. У пациенток с РМЖ характерны выраженные различия в субпопуляционной структуре моноцитов периферической крови. Трижды негативный подтип РМЖ отличается присутствием моноцитов, поляризованных по противоопухолевому типу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-29-06 037).

Разнообразие штаммов вируса Эпштейна–Барр у этнических татар

К.В. Смирнова^{1,2}, Н.Б. Сенюта¹, И.В. Ботезату¹,
Т.Е. Душенькина¹, А.К. Лубенская¹, А.А. Фроловская¹,
С.В. Петров³, А.В. Лихтенштейн¹, В.Э. Гурцевич¹

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

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва;

³ГАОУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер Минздрава Республики Татарстан», Казань, Республика Татарстан

Введение. Известно, что население России состоит из многочисленных древних этносов, сохранивших собственную культуру, обычаи и населяющих, как правило, исторически закрепленные за ними территории. Поэтому представляется важным провести сравнительную характеристику персистирующих у этих народов штаммов вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), передаваемых из поколения в поколение на протяжении веков.

Задачи исследования. Выяснить, отличаются ли штаммы ВЭБ, персистирующие среди этнических

татар г. Казани, от штаммов, циркулирующих у представителей славянских народов г. Москвы, и различаются ли уровни заболеваемости ВЭБ-ассоциированными патологиями в сравниваемых регионах.

Результаты. Анализ нуклеотидных аминокислотных последовательностей 41-го ампликона основного вирусного онкогена *LMP1*, полученных из 60 буккальных смывов (из остальных образцов амплифицировать *LMP1* не удалось), выявил их существенную вариабельность, но гомологию только с 3 вариантами гена из классификации Edwards et al. (1999) – B95.8/A (31,7 %; 13/41), Med– (17,1 %; 7/41) и China1 (7,3 %; 3/41). В отличие от образцов *LMP1* татарского происхождения, подавляющее число образцов *LMP1*, полученных от славян г. Москвы, относилось к варианту B95.8/A (82,5 %; 33/40), остальные соответствовали другим вариантам белка изучаемого вирусного онкогена – NC (7,5 %; 3/40), China1 (7,5 %; 3/40) и Med– (2,5 %; 1/40).

Среди образцов *LMP1* татарского происхождения в 18 (43,9 %) случаях состав обнаруженных мутаций не позволил их отнести ни к одному из перечисленных выше вариантов. Из их числа в 7 (17,1 %) случаях обнаружена моногруппа образцов *LMP1*, отличающаяся не только от московских, но и от других казанских образцов, и обозначенная нами, как *LMP1-Tat^K*. Эта группа образцов характеризовалась сочетанным содержанием делеций 5 аминокислот в кодонах 312–316 и 382–386.

Выводы. С учетом генеалогии изучаемых лиц, возможно, вариант *LMP1-Tat^K* относится к эволюционно древнему штамму вируса. Дальнейшие исследования ВЭБ, а также особенностей генотипа этнических татар, вероятно, позволят выяснить, оказывают ли влияние определенные штаммы ВЭБ на показатели заболеваемости и смертности у татарского населения.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-015-00 505А).

Иммунизация рекомбинантным антигеном PRAME усиливает клеточный иммунный ответ у животных с PRAME-экспрессирующей опухолью

Ю.П. Финашутина, Н.А. Лыжко, В.А. Мисюрин,
Л.А. Кесаева, О.Н. Солопова, Н.Н. Касаткина,
А.В. Мисюрин

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава
России, Москва

Введение. Раково-тестикулярный антиген PRAME не экспрессируется в нормальных тканях, но избыточно экспрессируется в различных опухолях. Этот белок

способен вызывать специфический иммунный ответ у пациентов с меланомой и другими опухолями. Т-клеточный ответ играет основную роль в противоопухолевом иммунитете. Таким образом, разработка новых подходов для оценки иммунотерапевтического потенциала белка PRAME является перспективным исследованием.

Задачи исследования. Оценить изменение клеточного иммунного ответа при профилактической вакцинации рекомбинантным человеческим белком PRAME на животной модели развития опухоли.

Материалы и методы. Мыши породы C57Bl/6 были иммунизированы 4 раза с интервалами в 14 дней внутрибрюшинно рекомбинантным белком PRAME. Клетки мышечной меланомы B16-F10 были трансфицированы плазмидой для экспрессии человеческого гена *PRAME* и подкожно трансплантированы после последней иммунизации. На 21-й день после введения клеток определяли иммунный статус методом проточной цитометрии. Также измеряли уровень интерферона γ (ИФН- γ), секретируемого спленоцитами *in vitro* при стимуляции рекомбинантным белком, методом ИФА. Для статистического анализа использовали критерий Манна–Уитни.

Результаты. Предварительная иммунизация мышей рекомбинантным белком PRAME на порядок замедляет развитие меланомы, экспрессирующей человеческий антиген PRAME ($p = 0,0003$). Также в спленоцитах в группе иммунизированных животных отмечалось больше клеток, экспрессирующих ИФН- γ ($p = 0,09$) и ФНО ($p = 0,03$), и меньшее количество CD25⁺-регуляторных клеток ($p = 0,03$). Иммунорегуляторный индекс CD4/CD8 в этой группе более соответствовал реактивному процессу ($p = 0,03$).

Выводы. Предварительная вакцинация рекомбинантным белком PRAME замедляет рост меланомы на животной модели и стимулирует клеточный иммунный ответ.

Раковые клетки используют PD-1⁺-лимфоциты для собственного питания

Е.О. Чучалин¹, С.Б. Оникиенко¹, А.Л. Ниворожкин²,
В.И. Лищенко¹, И.Б. Максимов³, В.Ю. Кравцов¹

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

²Alternative Innovative Technologies, LLC, Бостон, США;

³АО «РТ-Медицина» ГК «Ростех», Москва

Введение. Феномен «клеточного каннибализма» является одним из механизмов жизнеобеспечения опухолевых клеток. Поглощение лимфоцитов с признаками апоптоза раковыми клетками обеспечивает их питанием и способствует пролиферации. Рецепторы PD-1 активируют механизмы клеточной гибели

лимфоцитов. Изучение PD-1-зависимых реакций во взаимодействиях лимфоцитов и опухолевых клеток *in vivo* необходимо для понимания механизмов лечебного действия ингибиторов рецепторов PD-1.

Задачи исследования. Иммуноцитохимическое исследование взаимодействий «плавающих» раковых клеток с циркулирующими в плевральной жидкости PD-1⁺-лимфоцитами у пациентов с метастатической аденокарциномой яичника.

Материалы и методы. Аспирационные биоптаты получены у 6 пациентов с метастазированием опухоли в плевральную полость. Аспираты отстаивали в течение часа, осадок переносили на предметные стекла. Иммуноцитохимические исследования проводили с использованием антител к PD-1-рецепторам, лимфоцитам CD-3⁺, CD-4⁺, CD-8⁺. Цитологические исследования выполняли под иммерсией (×1000)

Результаты. Выявлены PD-1-положительные Т-лимфоциты, ассоциированные с клетками аденокарциномы яичника. Эти клетки, в отличие от неассоциированных с раковыми клетками PD-1⁺-лимфоцитами, имеют признаки повреждения – гранулированный хроматин, неравномерное окрашивание, изменения формы клетки. Установлено, что апоптотические PD-1⁺-тельца фагоцитируются раковыми клетками. Формирование данных комплексов с разрушением

лимфоцитов может быть способом обеспечения питательными веществами злокачественных клеток в планктонном состоянии при отсутствии кровеносных сосудов, которое соответствует прогрессии метастазов из первичных опухолей. Признаки цитонекроза и апоптоза в злокачественных клетках обнаруживаются только в тех случаях, когда они ассоциированы одновременно с лимфоцитами PD-1⁻ и PD-1⁺. При таком варианте онколизиса наблюдаются картины коллективного апоптоза опухолевых и иммунокомпетентных клеток. Иммуноцитохимические исследования свидетельствуют о том, что активация противоопухолевого иммунного ответа ингибиторами PD-1-рецепторов происходит только при их исходной гиперэкспрессии в цитотоксических Т-лимфоцитах.

Выводы. При метастатической аденокарциноме яичника с развитием канцероматоза плевры PD-1⁺-лимфоциты образуют комплексы с «плавающими» раковыми клетками в плевральной жидкости и подвергаются фагоцитозу, а раковые клетки остаются целыми. Эти взаимодействия могут обеспечивать рост и пролиферацию злокачественных клеток. Иммуноцитохимические исследования PD-1-зависимых реакций в ассоциациях Т-лимфоцитов с комплексами злокачественных клеток позволяют изучать механизмы целевого иммунного ответа и мониторировать иммунотерапию рака.

Тезисы

Стресс-индуцированные молекулы ULBP-1, -2 в сыворотке крови больных раком желудочно-кишечного тракта

Е. В. Абакушина¹, Д. Н. Абакушин², Ю. В. Гельм¹,
И. А. Пасова¹

¹МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии»
Минздрава России, Обнинск;
²ООО «Клиника № 1», Обнинск

Введение. На поверхности НК-клеток экспрессируется ряд активирующих и ингибирующих рецепторов. Один из значимых активирующих рецепторов – NKG2D, лигандами которого являются стресс-индуцированные молекулы MICA/B, ULBP-1–6. Трансформированные клетки способны сбрасывать лиганды рецептора NKG2D со своей поверхности и ускользать от распознавания эффекторными лимфоцитами. Растворимые сывороточные формы молекул ULBP могут взаимодействовать со своим рецептором NKG2D на поверхности лимфоцитов и ингибировать их функциональную активность. Обнаружение данных молекул в сыворотке крови больных раком желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) может служить одним из супрессивных факторов для противоопухолевого иммунного ответа.

Задачи исследования. Определение уровня стресс-индуцированных молекул ULBP-1 и -2 в сыворотке крови больных раком ЖКТ и доноров.

Материалы и методы. Уровень молекул ULBP-1 и -2 определяли в сыворотке крови 20 больных раком ЖКТ с помощью ИФА с использованием набора реагентов DuoSet ELISA human ULBP-1 и -2 (R&D Systems, США) согласно инструкции производителя. Контрольную группу составили 30 доноров. Оптическую плотность образцов измеряли при длине волны 450 нм на фотометре ChroMate 4300 (AwarenessTechnology, США). Данные представляли как среднее по группе. Использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. У больных раком ЖКТ сывороточный уровень ULBP-1 оказался выше в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой в 2434 пг/мл ($p < 0,001$). Также у онкологических больных не выявлено случаев отсутствия в циркуляции данных стресс-индуцированных молекул. Большинство пациентов (78 %) имели концентрацию ULBP-1, превышающую максимальные значения. Замечено, что концентрация ULBP-1 выше у пациентов с наличием большой опухолевой массы. Это утверждение нельзя применить к другому лиганду

NKG2D – белку ULBP-2. В сыворотке крови как доноров, так и онкологических больных не обнаружены молекулы ULBP-2 данной аллельной формы. Концентрация молекул ULBP-2 в сыворотке крови всех пациентов была равна фоновым значениям.

Выводы. Обнаружение в сыворотке крови лигандов NKG2D – молекул ULBP-1 – в больших концентрациях с большой вероятностью может свидетельствовать о наличии опухолевых клеток и развитии злокачественного новообразования, а также служить маркером злокачественного роста. Данный лиганд может являться не только маркером наличия злокачественного новообразования у пациента, но и фактором, который появляется в сыворотке крови раньше, чем объективно можно оценить развитие заболевания инструментальными методами исследований. Молекулы ULBP-1 могут дополнить спектр имеющихся опухолеассоциированных маркеров в диагностике онкологического заболевания у больных раком ЖКТ.

Иммунологические маркеры цервикальных неоплазий, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией

О. С. Абрамовских, Л. Ф. Телешева, В. Ф. Долгушина
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск

Важную роль в генезе малигнизации играет иммунная система. Проведено комплексное иммунологическое исследование показателей системного и местного иммунитета у пациенток с цервикальными интраэпителиальными неоплазиями (ЦИН) I, II, III ($n = 116$), ассоциированными с наличием ВПЧ высокого риска. Наличие в цервикальном канале ВПЧ высокого риска подтверждалось методом ПЦР в реальном времени с определением вирусной нагрузки.

Результаты. Частота выявления ВПЧ 16-го и 33-го типов возрастала по мере увеличения степени тяжести ЦИН. Показатель вирусной нагрузки у пациенток с ЦИН I составил $5,79 \pm 0,25$ lg ВПЧ на 10^5 клеток человека, с ЦИН II и III – $4,8 \pm 0,33$ и $4,9 \pm 0,2$ lg ВПЧ на 10^5 клеток человека соответственно. Продемонстрировано, что характер изменений показателей иммунитета имел как однонаправленные тенденции, которые выражались в повышении уровня ИФН- γ (пг/мл) цервикальной слизи, так и отличительные особенности, характеризующиеся дисбалансом всех звеньев иммунной системы: от легкого к тяжелому, осложненному

течению заболевания. С помощью бинарной логистической регрессии были исследованы иммунологические маркеры, позволяющие с высокой точностью определить риск прогрессии ЦИН II, III, ассоциированных с ВПЧ высокого риска: в цервикальной слизи — уровень ИФН- α (пг/мл); в периферической крови — количество CD3⁺8⁺ (%) и уровень ФНО- α (пг/мл). С учетом полученных результатов иммунологического обследования по разработанным математическим моделям возможно формирование группы пациенток высокого риска развития ЦИН II, III.

Установленные в результате проведенных исследований иммунологические маркеры позволяют дифференцированно подходить к тактике ведения женщин с ВПЧ-ассоциированной патологией шейки матки, индивидуально прогнозировать развитие цервикальных неоплазий и повысить эффективность лечебных мероприятий, что своевременно будет способствовать ранней профилактике РШМ.

На разработанный метод прогноза прогрессии ЦИН, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией, получен патент РФ 2 520 746 «Способ использования иммунологических маркеров для прогноза прогрессии ЦИН, ассоциированных с папилломавирусной инфекцией».

Получение и анализ активности НК-клеточных линий, секретирующих противоопухолевый белок лактаптин

Т.Н. Беловежц^{1,2}, А.Н. Чикаев¹, Д.С. Матвиенко^{1,2},
А.А. Горчаков^{1,2}, С.В. Кулемзин¹, О.А. Коваль^{1,3},
Е.В. Кулигина³, А.В. Таранин^{1,2}

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

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск;

³ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск

Введение. Терапия злокачественных заболеваний с помощью Т- и НК-лимфоцитов с химерными антигенными рецепторами (CAR) становится все более эффективной и применяется все чаще. Тем не менее, несмотря на значительный успех в борьбе с онкогематологическими заболеваниями, результаты, полученные для солидных опухолей, значительно скромнее. Ограниченная эффективность CAR Т-терапии для солидных опухолей связана со следующими основными причинами: 1) иммуносупрессивное окружение

опухоли, угнетающее активность эффекторных клеток; 2) гипоксия, которая характерна для подлежащих слоев опухоли; 3) высокая гетерогенность солидных опухолей, являющаяся наиболее серьезной проблемой. Последняя особенность солидных опухолей приводит к тому, что использование CAR к одному антигену быстро вызывает появление популяции клеток-эскейперов, не несущих целевого антигена на своей поверхности. Эти клетки становятся неуязвимыми для CAR Т-терапии, приводя к быстрому развитию рецидива и дальнейшему росту опухоли. Возможным подходом для решения данной проблемы может быть использование CAR-лимфоцитов, секретирующих противоопухолевые агенты широкой специфичности. В нашей работе в качестве такого агента был выбран лактаптин — небольшой белок, обладающий противоопухолевой активностью в отношении широкого спектра раковых клеток.

Материалы и методы. Нами была сконструирована лентивирусная конструкция, кодирующая короткую форму лактаптина, RL2, слитую с лидерным пептидом люциферазы Gaussia, для обеспечения эффективной секреции лактаптина. С использованием данной конструкции получены лентивирусные частицы и проведена трансдукция НК-клеток линии YT дикого типа, а также CAR-модифицированных клеток YT. Для анализа противоопухолевой активности полученных клеток применяли метод RTCA, в качестве мишеней использовали клетки аденокарциномы предстательной железы.

Результаты. Полученные клетки YT-lact и CAR-YT-lact обеспечивают эффективную секрецию лактаптина *in vitro*, позволяя достигать его концентраций в супернатанте в диапазоне 1–3 нг/мл. При инкубации с раковыми клетками-мишенями клетки CAR-YT осуществляют лизис мишеней с помощью CAR-зависимых и независимых механизмов. Наблюдается тенденция к повышению цитотоксичности клеток CAR-YT, секретирующих лактаптин.

Выводы. Создание CAR НК-клеток и клеточных линий, секретирующих противоопухолевые агенты широкого спектра действия, является перспективным направлением совершенствования иммунотерапевтических инструментов. Секреция лактаптина НК-клеточными линиями возможна, при этом лактаптин не оказывает токсического действия на клетки-носители. Необходимы дальнейшие исследования полученных линий, в том числе на моделях *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, соглашение № 14.604.21.0169 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60417X0169).

Вирус папилломы человека при плоскоклеточных карциномах редких локализаций (клиническое наблюдение первично-множественных опухолей яичника и сигмовидной кишки)

А.Б. Виллерт, А.А. Завьялов, Л.А. Коломиец, Е.А. Фесик, М.Б. Каракешишева, Е.Г. Григорьев

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский НИМЦ РАН», Томск

Введение. ВПЧ является главной причиной развития плоскоклеточного РШМ (Herald zur Hausen, 1974). Установлено, что ВПЧ лежит в основе развития плоскоклеточных карцином других локализаций. В России в структуре общей онкологической заболеваемости на долю ВПЧ-ассоциированных злокачественных новообразований приходится 5 %, из них 25 % локализованы вне половой сферы.

Задачи исследования. Показать наличие ДНК ВПЧ высокого онкогенного риска в опухолевой ткани яичника и сигмовидной кишки на примере клинического наблюдения.

Материалы и методы. В нашем наблюдении пациентке Т. 53 лет с разницей 9 мес диагностировано поражение плоскоклеточной карциномой яичников и сигмовидной кишки, что стало предметом дискуссий для дифференциальной диагностики между первично-множественным характером процесса и раком сигмовидной кишки с вторичным поражением яичников.

Результаты. Клинико-морфологические характеристики опухолей в данном наблюдении свидетельствовали в большей степени в пользу первично-множественного характера процесса. ВПЧ-типирование опухолевой ткани проводили методом ПЦР в режиме реального времени, который показал присутствие ВПЧ высокого онкогенного риска (16-й тип) в опухоли как яичника, так и сигмовидной кишки.

Плоскоклеточная карцинома яичника является редкой патологией, как и плоскоклеточная карцинома сигмовидной кишки. Гистогенез плоскоклеточного рака любой из этих локализаций остается окончательно не установленным и обсуждается в рамках нескольких конкурирующих гипотез. Роль ВПЧ в развитии плоскоклеточных карцином яичника данными молекулярного анализа пока не подтверждена. Среди зарегистрированных случаев выявлены ассоциации с дисплазией шейки матки, а также с наличием белка Е6 ВПЧ 16-го типа в ткани опухоли. Наблюдения плоскоклеточных карцином толстой кишки единичны.

Выводы. Молекулярно-генетические особенности данного наблюдения гипотетически предполагают вирусную природу плоскоклеточных карцином яичника

и кишечника, выделяя данную подгруппу редких опухолей в качестве обособленной среди злокачественных опухолей этих локализаций.

Рак предстательной железы и онкогенные вирусы папилломы человека: имеется ли ассоциация?

Г.М. Волгарева, В.Д. Ермилова, А.В. Хачатурян

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Высокие показатели заболеваемости РПЖ и смертности от этой патологии, а также высокие темпы роста данных показателей свидетельствуют о важности изучения природы РПЖ и поиска способов его профилактики. Вопрос о возможной ассоциации РПЖ с онкогенными ВПЧ остается предметом дискуссий. В случае подтверждения факта ассоциации РПЖ с ВПЧ откроется перспектива предупреждения этого заболевания путем прививания мальчиков вакцинами, разработанными для профилактики РШМ.

Задачи исследования. Протестировать методом ПЦР хирургически удаленные при радикальной простатэктомии ткани предстательной железы больных РПЖ на предмет присутствия в этих тканях онкогена *E7* ВПЧ 16-го и 18-го типов (ВПЧ16 и ВПЧ18), — основных типов ВПЧ, ответственных за возникновение РШМ.

Материалы и методы. Впервые в подобном исследовании для лучшей сохранности ДНК были использованы криоконсервированные (не подвергавшиеся обработке формалином и парафином) образцы опухолей. Также впервые был применен метод микродиссекций для накопления однородных клеток (рака, дисплазии, нормального эпителия железы). В качестве положительных контролей использовали образец ВПЧ16-положительного РШМ, а также клетки ВПЧ18-положительной линии HeLa.

Результаты. ДНК онкогена *E7* ВПЧ16 обнаружена в материалах от 7 больных РПЖ из 17 обследованных, в том числе во всех гомогенных областях РПЖ от 5 больных. Продукты амплификации, соответствующие онкогену *E7* ВПЧ18, обнаружены в клетках тяжелых дисплазий предстательной железы от 2 других больных РПЖ. В 5 случаях площадь препарата была достаточной для того, чтобы выделить ДНК не только из патологически измененных клеток, оказавшихся *E7* ВПЧ-положительными, но также и из соседних с ними микроскопически условно нормальных клеток. Попытки обнаружения онкогенов *E7* ВПЧ в условно нормальных клетках дали отрицательные результаты.

Выводы. Полученные данные позволяют предполагать участие онкогенных ВПЧ в генезе РПЖ. Проблема заслуживает дальнейшего изучения.

Регуляция экспрессии гена *IL33*, кодирующего цитокин семейства *IL-1*, в клетках мелкоклеточной карциномы легкого и рака молочной железы человека

А.М. Горбачева

ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва; биологический факультет ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва

Введение. Многие опухоли отличаются пониженной экспрессией генов молекул аларминов (эндогенных сигналов опасности), которые при распознавании иммунными клетками стимулируют развитие реакций врожденного и адаптивного иммунитета. Подавление раковыми клетками таких сигналов считается одним из возможных способов избежать иммунного надзора. Клетки стромы опухоли также могут активировать канцерогенез, привлекая MDSC (myeloid-derived suppressor cells) и Т-регуляторные клетки, что приводит к формированию иммуносупрессивного микроокружения. Результаты недавних исследований показали, что цитокин *IL-33*, первоначально охарактеризованный как индуктор дифференцировки Т-хелперов 2-го типа, также является алармином. Он экспрессируется как клетками различных опухолей, так и их стромой, участвуя в поддержании баланса между прогрессированием злокачественных заболеваний и противоопухолевым иммунитетом. В частности, пониженный уровень экспрессии *IL33* в клетках РМЖ человека ассоциирован с прогрессией опухоли, в то время как повышенная его экспрессия ингибирует пролиферацию и метастазирование раковых клеток в мышинной модели легочной карциномы Льюиса и опухоли молочной железы 4Т1.

Задачи исследования. Вследствие значимой роли *IL-33* и уровня его экспрессии для выживания и миграции раковых клеток представляется интересным определить механизмы, регулирующие транскрипцию данного гена и выявить возможные способы ее модуляции.

Результаты. В данной работе в качестве модельной системы были использованы клетки РМЖ человека MCF-7 и клетки опухоли легкого NS1H-196. В ходе исследования идентифицированы предположительные регуляторные элементы гена *IL33*, в составе которых определены области, играющие ключевую роль в транскрипции данного гена. В зонах, важных для регуляции экспрессии *IL33*, выявлены сайты связывания транскрипционных факторов, потенциально значимых для модуляции активности регуляторных элементов в данных клеточных линиях. С применением siRNA-опосредованной системы подавления экспрессии

проведена предварительная оценка зависимости уровня активности регуляторных элементов от присутствия в системе предсказанных факторов транскрипции.

Выводы. Ожидаемые результаты могут стать отправной точкой для поиска новых мишеней противоопухолевой терапии, основанной на модуляции экспрессии *IL33*.

Адаптивный иммунный ответ при раке носоглотки в детском возрасте

Н.М. Каримова, Д.Ш. Полатова, А.А. Исмаилова, Б.Ю. Юсупов, К.Р. Нуридинов, М.М. Бобоев, И.М. Искандарова, М.И. Абдухакимова, А.Т. Хайитова

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр онкологии и радиологии Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан

Задачи исследования. Изучение состояния клеточных и гуморальных факторов адаптивного иммунного ответа при раке носоглотки в детском возрасте.

Материалы и методы. В обследование были включены данные 36 детей и подростков с опухолями носоглотки (27 (75 %) мальчиков и 9 (25 %) девочек). Средний возраст пациентов составил $14,9 \pm 2,4$ года. Опухоль носоглотки чаще выявлялась в подростковом возрасте – в 43,9 % случаев, а в возрасте 11–15 лет она встречалась в 38,8 % случаев.

Результаты. Анализ иммунофенотипа Т-лимфоцитов у детей, больных раком носоглотки, показал наличие достоверного подавления экспрессии CD3⁺ на Т-лимфоцитах и абсолютное его значение по сравнению со значениями контрольной группы ($p < 0,05$). Очевидно, снижение общего пула Т-лимфоцитов (CD3⁺) наблюдается в основном за счет подавления числа Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер CD4.

Анализ содержания CD8⁺Т-цитотоксических лимфоцитов у детей, больных раком носоглотки, показал, что наблюдалось достоверное повышение относительного содержания CD8⁺Т-цитотоксических лимфоцитов при сравнении с аналогичным показателем контрольной группы ($p < 0,05$). Выявлено достоверное повышение относительного числа CD16⁺ЕКК в группе детей, больных раком носоглотки, по отношению к данным контрольной группы. Изучение содержания CD20⁺В-лимфоцитов позволило выявить наличие достоверного повышения их у больных детей по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы ($p < 0,05$).

Анализ полученных результатов позволил выявить определенные изменения в клеточном звене адаптивного иммунитета у больных раком носоглотки. Эти изменения проявились подавлением CD3⁺Т-лимфоцитов, CD4⁺Т-хелперов/индукторов, иммунорегуляторного индекса, повышением числа CD8⁺Т-цитотоксических лимфоцитов, CD16⁺ЕКК-клеток.

Выводы. Следовательно, изучение клинико-иммунологических особенностей течения рака носоглотки у детей и подростков, выявление этиологических факторов заболевания и особенности клинического течения позволят разработать алгоритм лечения с иммунотерапевтической терапией.

Цитологический анализ воспалительных заболеваний шейки матки у разных возрастных групп на примере Республики Саха (Якутия)

М.П. Кириллина^{1,2}, А.К. Иванова², Е.Л. Лушникова³,
И.В. Кононова¹

¹ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных
медицинских проблем», Якутск;

²Клиника медицинского института ФГАОУ ВО «Северо-Вос-
точный федеральный университет им. М.К. Аммосова»,
Якутск;

³Институт молекулярной патологии и патоморфологии
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундамен-
тальной и трансляционной медицины», Новосибирск

Основным пусковым моментом развития острых воспалительных заболеваний является инвазия микроорганизмов. Шейка матки представляет собой важный защитный барьер на пути распространения бактерий во внутренние половые органы. Практически все микроорганизмы, присутствующие во влагалище, за исключением лакто- и бифидобактерий, могут принимать участие в развитии воспалительного процесса.

По результатам цитологического исследования воспалительные заболевания шейки матки были диагностированы в 4629 случаях, что составило 61,0 % от общего числа исследованных женщин. У большинства женщин (1815 (39,2 %) случаев) преобладает дисбиоз флоры. Максимальная частота встречаемости отмечается в возрастной категории 18–29 лет – 740 (40,7 %) случаев и 30–44 лет – 693 (38,2 %) случая. Вторыми по частоте встречаемости были выявлены воспалительные процессы – 1809 (39,0 %) случая. В нашем исследовании косвенные признаки вирусной инфекции обнаружены в 689 случаях, что составило 14,9 % от общего числа воспалительных заболеваний. Максимальная частота встречаемости данной патологии в общей совокупности отмечается у женщин активного репродуктивного периода в возрасте 18–44 лет – 269 (39,0 %) случаев. Этим женщинам рекомендовано выполнить ВПЧ-тест. У 115 (2,5 %) женщин был зарегистрирован кандидозный кольпит. Значительно реже диагностировались фолликулярный цервицит (период постменопаузы) и хроническое воспаление (фертильный возраст), который был обнаружен в 2 % случаев от общего числа воспалительных заболеваний. При этом максимальная частота встречаемости отмечалась в возрасте 18–29 лет – 47 (49,5 %)

случаев и 30–44 лет – 25 (26,3 %) случаев. Трихомонадный кольпит (в 1,3 % случаях от общего числа воспалительных заболеваний органов малого таза) в большинстве случаев (49,1 %) был обнаружен у возрастной группы 18–29 лет. По нашим данным, в 47 (1,0 %) случаях были диагностированы косвенные признаки хламидиоза. Наибольшая их частота (38,3 %) зарегистрирована в возрасте 30–44 лет. Данные цитологического исследования при выявлении хламидийной инфекции являются ориентировочными и должны быть дополнены другими методами исследования (иммунофлуоресцентный анализ, ПЦР и др.).

Таким образом, инфекционно-воспалительные заболевания женских половых органов, вызываемые различными возбудителями, передаваемыми половым путем, или неспецифической микрофлорой, представляют серьезную медицинскую и социальную проблему.

Изменение профиля показателей клеток иммунной системы при преинвазивном и микроинвазивном раке шейки матки

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

ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный
университет», Петрозаводск

Введение. При вирус-ассоциированном РШМ на этапе развития цервикальных интраэпителиальных неоплазий (ЦИН) возможно обнаружение системного отрицательного влияния на иммунную систему.

Задачи исследования. Охарактеризовать профиль изменений в иммунной системе пациенток с ЦИН и микроинвазивным РШМ на основе экспрессии маркеров апоптоза (CD95/Fas, Annexin V) в основных популяциях лимфоцитов крови – CD4 и CD8 Т-клетках и естественных киллерах (natural killer, NK); численности клеток Tregs CD4 и CD8 по экспрессии маркеров CD25, CD127, FoxP3; численности субпопуляций NK-клеток (NKreg), а также Т-лимфоцитов с NK-подобным фенотипом (по относительному уровню CD3, CD16 и CD56).

Материалы и методы. Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проведено методом проточной цитофлуориметрии. Образцы крови получены от 77 пациенток с диагнозом ЦИН III степени и микроинвазивным РШМ непосредственно перед операцией. В группу контроля включены 30 здоровых женщин.

Результаты. Увеличение доли Т-лимфоцитов, связывающих Annexin V и коэкспрессирующих CD95/Fas в крови больных РШМ ($p < 0,05$), указывает на повышенный уровень спонтанного апоптоза Т-клеток

с возрастанием вклада Fas-зависимого пути. При дифференцированном анализе популяций CD4 и CD8 выявлен различный характер изменений экспрессии CD95, свидетельствующий о большей подверженности апоптозу CD8 Т-клеток в группе больных. Связывание Annexin V с популяцией CD3(–) увеличивалось в группе пациенток с микроинвазивным РШМ ($p < 0,05$), при этом различий в экспрессии CD95 на NK-клетках в группах не обнаружено ($p > 0,05$). Отмечены увеличение CD4(+) Tregs, CD8(+) Tregs и снижение соотношения CD3CD8/Treg. По общей численности циркулирующих NK-клеток анализируемые группы не различались, но для субпопуляций NKreg-клеток и NK-подобных Т-лимфоцитов выявлена тенденция к снижению их относительного количества, сопровождаемая изменением соотношения CD56dim/CD56bright NK-клеток в группе больных.

Выводы. Индукция инвазивного роста при РШМ поддерживается системными изменениями баланса регуляторных клеток врожденного и адаптивного иммунитета, что рассматривается в качестве объекта детального исследования при разработке новых методов иммунотерапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-75-10027).

Изменение транскрипционной активности раково-тестикулярных антигенов при росте клеточной линии HeLa

Д.С. Кутилин, Х.А. Могушкова

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

Введение. Раково-тестикулярные антигены гиперэкспрессируются в опухолях различного гистологического происхождения и слабо экспрессируются в большинстве нормальных тканей. Большое количество исследований посвящено клиническому потенциалу раково-тестикулярных генов (РТ-гены), при этом относительно мало известно об их функциях в нормальных и опухолевых клетках.

Задачи исследования. Изучение влияния роста клеточной массы HeLa на транскрипционную активность раково-тестикулярных антигенов.

Материалы и методы. Культивирование клеток HeLa CCL-2 проводили в стерильных плоскодонных культуральных флаконах в условиях контролируемого 5 % CO₂ и 95 % влажности при температуре 37 °С в среде RPMI-1640 с 10 % фетальной телячьей сывороткой и концентрацией гентамицина 50 мкг/мл. Через 1, 5 и 24 ч культивирования проводили микроскопирование монослойной культуры. Клеточные линии снимали

с подложки флакона путем трипсинизации раствором Трипсина/Версена. Подсчет общего количества клеток выполняли в камере Горяева с использованием 0,4 % раствора трипанового синего. Суммарную РНК из образцов (каждый содержал по 1 млн клеток) выделяли по методу Chomczynski и Sacchi. Синтез комплементарной ДНК проводили с использованием наборов Reverta-L. Определение относительной экспрессии 16 генов (*MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SYCP1*, *PRAME1*) осуществляли методом количественной ПЦР в режиме реального времени (референсный ген – *GAPDH*). Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с повторениями (оценивали влияние факторов А – время культивирования и Б – количества клеток).

Результаты. В ходе эксперимента кривую роста клеток HeLa можно было описать уравнением: $y = 1E + 06x + 26978$. Наблюдалось увеличение количества клеток на 3, 20 и 129 % через 1, 5 и 24 ч культивирования соответственно. Обнаружено, что факторы времени инкубации и количество клеток вместе взятые статистически достоверно ($p < 0,005$) влияли на экспрессию исследованных РТ-генов. По характеру наблюдаемых изменений 16 РТ-генов были разделены на 4 кластера: 1) повышающие экспрессию при увеличении количества клеток на 20 % и снижающие при увеличении количества клеток на 129 % – *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *GAGE3*, *GAGE4*, *NY-ESO1*; 2) только повышающие экспрессию – *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *MAGEC1*; 3) снижающие экспрессию при увеличении количества клеток на 20 % и повышающие при увеличении количества клеток на 129 % – *BAGE*, *XAGE3*, *SCPI*, *PRAME1*; 4) только снижающие экспрессию – *SSX2*.

Выводы. Транскрипционная активность 16 РТ-генов дифференциально изменяется при увеличении клеточной массы в процессе культивирования клеток HeLa, при этом по направленности обнаруженных изменений исследуемые РТ-гены можно разделить на 4 класса. Возможно, обнаруженные изменения экспрессии РТ-генов связаны с их ролью во взаимодействии опухолевых клеток между собой, изменяющемся при росте клеточной культуры.

Особенности экспрессии раково-тестикулярных генов в опухолях разных нозологий

Д.С. Кутилин, Х.А. Могушкова, К.И. Солдатова, О.И. Кит
ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, Ростов-на-Дону

Введение. Раково-тестикулярные антигены (РТА), слабо экспрессирующиеся нормальными соматически-

ми клетками и гиперэкспрессирующиеся раковыми клетками, могут быть эффективной мишенью для иммунотерапии. Иммунотерапевтические подходы, направленные на РТА при РМЖ, раке тела матки (РТМ), раке яичников (РЯ) и раке толстой кишки (РТК), находятся в начальной стадии разработок.

Задачи исследования. Скрининг РТА, специфичных для РМЖ, РТМ, РЯ и РТК, на основании анализа транскрипционных профилей раково-тестикулярных генов (РТ-генов).

Материалы и методы. В исследовании использовали опухолевые и нормальные ткани молочной железы, тела матки, яичников и толстой кишки от 32, 27, 20 и 24 больных соответственно. Суммарную РНК из тканей выделяли по методу Chomczynski и Sacchi (2006). Для синтеза комплементарной ДНК использовали набор реагентов Reverta-L. Определение относительной экспрессии 16 генов (*MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SCP1*, *PRAME1*) осуществляли методом количественной ПЦР в режиме реального времени (референсные гены – *GAPDH* и *GUSB*). Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна–Уитни.

Результаты. У больных РМЖ обнаружено статистически значимое ($p < 0,005$) увеличение экспрессии *MAGEA3*, *MAGEA4* и *GAGE3* в опухолевой ткани относительно нормальной. У группы больных РТМ отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение экспрессии *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA4*, *MAGEB2*, *GAGE3*, *NY-ESO1*, *SCP1* и *PRAME1* в опухолевой ткани по сравнению с нормальной. У больных РЯ обнаружено статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение экспрессии *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *NY-ESO1*, а также снижение экспрессии *MAGEA3*, *MAGEA4*, *GAGE3*, *GAGE4*, *XAGE3*, *SSX2*, *SCP1* и *PRAME1*. В группе больных РТК выявлены статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение экспрессии *SSX2* и *PRAME1* и снижение экспрессии *BAGE* в опухолевой ткани относительно нормальной.

Выводы. Исследование транскрипционной активности РТ-генов позволило выявить наиболее характерные диагностические маркеры и иммунотерапевтические мишени для каждой нозологии: для РМЖ – *MAGEA3*, *MAGEA4* и *GAGE3*, для РТМ – *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA4*, *MAGEB2*, *GAGE3*, *NY-ESO1*, *SYCP1* и *PRAME1*, для РЯ – *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1* и *NY-ESO*, для РТК – *SSX2* и *PRAME1*.

Ассоциация экспрессии хитиназо-подобных белков с ответом на неоадьювантную химиотерапию у пациентов с колоректальным раком

И.В. Ларионова^{1,2}, М.В. Завьялова^{2,3}, Н.В. Чердынцева^{1,2}, Е.О. Казакова¹, Ю.Г. Кжышковска^{1,4}

¹Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск;

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

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

⁴Институт трансфузионной медицины и иммунологии, Медицинский факультет Маннгейма, Университет Гейдельберга, Гейдельберг, Германия

Введение. Терапевтическая чувствительность опухолей во многом зависит от внешних механизмов, представленных взаимоотношениями между опухолевыми клетками и другими компонентами микроокружения опухоли, в частности опухолеассоциированными макрофагами (ОАМ). Понимание принципиально важной роли ОАМ в определении эффективности противоопухолевой цитостатической терапии открывает перспективы разработки новых терапевтических подходов к лечению злокачественных новообразований на основе сбалансированного синергетического действия цитостатиков и инновационных иммуномодулирующих подходов.

Задачи исследования. В настоящем исследовании была изучена экспрессия хитиназо-подобных белков (ХПБ), секретирующихся ОАМ, при колоректальном раке в зависимости от эффективности неоадьювантной ХТ (НХТ). ХПБ продуцируются несколькими типами клеток и сочетают в себе свойства цитокинов и факторов роста. Макрофаги являются как источником ХПБ, так и клетками-мишенями для их регуляторных эффектов.

Материалы и методы. С помощью ИГХ исследовали операционный материал от 30 больных раком толстого кишечника с хорошим (частичная регрессия) и 30 больных с плохим (стабилизация или прогрессирование) ответом на НХТ.

Результаты. Мы показали, что в группе больных с хорошим ответом на НХТ реже обнаруживаются клетки воспалительного инфильтрата с положительной экспрессией YKL-40. Эти результаты коррелируют с уже известными данными, которые указывают на связь YKL-40 с плохим прогнозом для многих опухолей. В то же время в группе больных с хорошим ответом на НХТ обнаруживается более интенсивная экспрессия стабиллина I и ХПБ SI–CLP, что соответствует обнаруженному нами ранее отрицательному эффекту SI–CLP на хемотаксис моноцитов

как возможному механизму противоопухолевого действия SI-CLP-секретирующих ОАМ.

Выводы. Полученные данные указывают на то, что ОАМ перепрограммируются при химиотерапевтическом воздействии, а изучение механизмов взаимодействия опухолей с ОАМ обеспечивает возможности функционального перепрограммирования патогенетически значимых элементов иммунной системы для модификации микроокружения опухоли в направлении ингибирования роста опухоли и снижения риска метастазирования, а также положительного ответа на противоопухолевое лечение.

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

Молекулярно-генетические аспекты хронического лимфолейкоза

Е.Л. Назарова, Е.Н. Зотина, Н.В. Минаева,
Э.Е. Сухорукова, В.И. Шардаков

ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России», Киров

Введение. Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) относится к полиэтиологичным заболеваниям, в развитии которых играют роль как неблагоприятные факторы внешней среды, так и генетическая детерминированность опухолевой трансформации зрелых лимфоидных клеток. К генетическим причинам можно отнести наличие в геноме человека аллельных вариантов регуляторных участков генов врожденного иммунного ответа. Отмечено, что в патогенез ХЛЛ вносят заметный вклад не столько отдельные мутации, сколько определенные комбинации генов иммунного ответа.

Задачи исследования. Оценить роль сочетаний полиморфных локусов генов цитокинов и паттернраспознающих рецепторов в развитии ХЛЛ.

Материалы и методы. Проведен анализ межгенных взаимодействий на основе распределения комбинаций генов иммунного ответа у 205 больных ХЛЛ с медианой возраста 61 год (32–81 год). Генотипирование полиморфных участков генов врожденного иммунного ответа *TLR2* (rs5 743 708), *TLR3* (rs3 775 291), *TLR6* (rs5 743 810), *TLR9* (rs5 743 836), *IL1β* (rs2 856 841), *IL2* (rs2 069 762), *IL4* (rs2 243 250), *IL6* (rs1 800 795), *IL10* (rs1 800 871), *IL17A* (rs2 275 913), *CD14* (rs34 424 920), *TNFA* (rs1 800 629), *FCGR2A* (rs1 801 274) осуществляли методом ПЦР с аллельспецифичными праймерами. Анализ межгенных взаимодействий проводили с помощью непараметрической программы GMDR (<http://www.healthsystem.virginia.edu/internet/addiction-genomics/Software/>).

Результаты. У больных ХЛЛ выявлено 78 753 комбинации полилокусных генотипов 13 исследованных локусов генов иммунного ответа из 1 594 323 теоретически возможных, что свидетельствует о неслучайном

характере комбинирования аллельных вариантов анализируемых генов у данных пациентов. Обнаружены статистически значимые 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8-локусные модели межгенных взаимодействий цитокинов и паттернраспознающих рецепторов ($p < 0,0001$).

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о важной роли генов иммунного ответа в развитии ХЛЛ и в дальнейшем могут быть использованы в качестве диагностических и прогностических критериев заболевания.

Особенности микроокружения костного мозга пациентов с ДОК-положительным статусом при люминальном раке молочной железы

Д.А. Рябчиков¹, О.А. Безнос¹, И.А. Дудина², А.М. Казаков¹,
И.К. Воротников¹, Д.А. Денчик¹, Н.Н. Тупицын¹

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

²ФГАУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Введение. Диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) – уникальные клеточные популяции, обеспечивающие поддержание состояния «минимальной резидуальной болезни» (МРБ) в костном мозге (КМ) у пациентов после радикального лечения РМЖ. Особенности иммунной системы, гемопоэтического роста и сигнальных молекул КМ определяют путь развития ДОК (гибель, персистенция, местное и отдаленное метастазирование), но механизмы, участвующие в регуляции данных процессов, плохо изучены.

Задачи исследования. Определить частоту выявления ДОК в КМ, а также изучить клеточные (миелограмма, субпопуляции Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, НК-клеток) и антигенные (HLA-1, HLA-DR, CD71) особенности КМ и первичной опухоли в зависимости от ДОК-статуса у пациентов после хирургического лечения люминального РМЖ I–II стадий.

Материалы и методы. Материалом исследования явились образцы КМ 65 пациентов, полученные при стеральной пункции во время плановой операции. Для определения иммунологических характеристик КМ и наличия в нем ДОК использовали как стандартные цитологические методы, так и ИФА с применением моноклональных антител к цитокератинам CAM 5.2 (Becton Dickinson, США) и KL-1 (Immunotech, Франция). Впервые в России при использовании акустического фокусирующего цитометра Attune была повышена чувствительность метода обнаружения ДОК до уровня 1×10^{-7} миелокариоцитов. Исследования проведены в лаборатории иммунологии гемопоэза

НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина (руководитель – проф. Н. Н. Тупицын).

Результаты. ДОК-положительный статус определен у 40 % пациентов, причем корреляции со стадией, размером опухоли, экспрессией Ki-67 и/или степенью злокачественности не обнаружено. CD8⁺-клетки – единственная субпопуляция лимфоцитов КМ, статистически значимо связанная с ДОК. Уровень костномозговых CD8⁺-лимфоцитов у пациентов с ДОК-положительным статусом был достоверно ниже и составил 39,2 % против 48,1 % при отсутствии ДОК ($p = 0,011$). Количество миелокариоцитов при наличии ДОК было ниже: 57 тыс/мкл при ДОК-положительном статусе и 94 тыс/мкл при ДОК-отрицательном ($p = 0,007$). Другие параметры миелограммы не имели статистически значимых различий, не обнаружено существенных коррелирующих наличие ДОК с иммунофенотипом РМЖ (HLA-1: $p = 0,74$; HLA-DR: $p = 0,93$; CD71: $p = 0,46$).

Выводы. Формирование ДОК-положительного статуса после хирургического лечения РМЖ I–II стадий в большей степени зависит от клеточных и иммунологических характеристик КМ, чем от особенностей первичной опухоли. Баланс между CD8⁺-лимфоцитами и ДОК – один из возможных механизмов, обеспечивающих поддержание состояния МРБ. Вопрос о влиянии ДОК на гемопоэтический рост КМ остается открытым, но можно предположить, что костномозговые ниши, занимаемые ДОК, как минимум перекрываются с нишами гемопоэтических стволовых клеток.

Вирус-ассоциированный фенотип при неходжкинских лимфомах

З.З. Хакимов¹, А.А. Абдувалиев¹, А.А. Саримсаков²

¹Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Республика Узбекистан;

²Институт химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан

Проведен отбор 30 пациентов с вирус-ассоциированными неходжкинскими лимфомами (НХЛ)

для последующего получения опухолевого материала. У больных НХЛ наибольшая инфицированность наблюдалась вирусом простого герпеса (ВПГ) и вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ). У 18 пациентов был обнаружен вирус гепатита С, также у этих больных наблюдалось коинфицирование ВПГ1/2 и ВЭБ.

При распределении пациентов с НХЛ по возрастным декадам установлено, что пик заболеваемости приходится на возраст до 50 лет. Среди пациентов преобладают мужчины – 12 (66,7 %) против 6 (33,3 %); из 18 больных 8 (44,4 %) – жители сельской местности и 10 (55,6 %) – городские жители. У всех больных диагноз был установлен на основании данных и результатов комплексного обследования (клинико-биохимическое, рентгенологическое исследование, УЗИ, компьютерная томография (КТ), миелограмма, морфологическое).

Зоны поражения при НХЛ чаще всего приходились на шейные и подмышечные лимфатические узлы (более 50 %), затем на надключичные, паховые и забрюшинные (30–45 %), меньше всего отмечалось поражение подвздошных лимфатических узлов. По результатам комплексного обследования стадия ПА НХЛ выявлена у 3 (33,3 %), ПВ – у 2 (22,2 %), ПШВ – у 4 (44,4 %) больных.

У 4 из 18 больных НХЛ исходный уровень ВПГ1/2, ВЭБ, цитомегаловируса в плазме крови был отрицательный; у оставшихся 14 пациентов отмечалась высокая авидность ВПГ1/2 – в среднем 94,3 % (>50 %), а также высокая авидность цитомегаловируса – в среднем 72,2 % (>50 %). При иммунологическом обследовании у 8 больных наблюдался дисбаланс иммунорегуляторных популяций Т-лимфоцитов, подавление иммунорегуляторного индекса и увеличение количества киллерных клеток. Только у 1 больного с НХЛ стадии ПШВ клеточное звено иммунитета оказалось в норме. Показатели общего ИФН-статуса у всех больных были выше нормы ($15,6 \pm 0,8$ МЕ/мл), а уровень сывороточного ИФН оказался значительно ниже нормальных показателей – $18,0 \pm 2,8$ пг/мл.

Список сокращений

ВПЧ	вирус папилломы человека
ДИ	доверительный интервал
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИГХ	иммуногистохимический
ИФА	иммуноферментный анализ
ИФН	интерферон
КТ	компьютерная томография
НМРЛ	немелкоклеточный рак легкого
ОР	отношение рисков
ОШ	отношение шансов
ПКР	почечно-клеточный рак
ПСА	простатический специфический антиген
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РМЖ	рак молочной железы
РНК	рибонуклеиновая кислота
РПЖ	рак предстательной железы
РШМ	рак шейки матки
УЗИ	ультразвуковое исследование
ФНО	фактор некроза опухоли
ХТ	химиотерапия
IL	интерлейкин