

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Сибирский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)

I международная конференция

# **ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ТРАНСЛЯЦИОННОЙ БИОМЕДИЦИНЕ**

5–7 сентября 2022 г.  
г. Томск

**СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ**

Томск  
Издательство СибГМУ  
2022

УДК 57(06)  
ББК 28.70я43  
Г 340

**Г 340**      **Генетические технологии в трансляционной биомедицине:** материалы I Международной конференции: Томск, 5–7 сентября 2022 г. – Томск: Изд-во СибГМУ, 2022. – 40 с.

ISBN 978-5-98591-158-9

В сборнике материалов I международной конференции «Генетические технологии в трансляционной биомедицине» представлены результаты научных исследований, посвященных фундаментальным аспектам генетической регуляции злокачественного роста, изучению молекулярных механизмов формирования, прогрессии злокачественных опухолей и их чувствительности к лекарственной терапии.

Сборник содержит фундаментальные данные, открывающие перспективы разработки инновационных подходов персонализированной терапии онкологических больных для улучшения качества жизни пациентов.

УДК 57(06)  
ББК 28.70я43

*Тезисы статей публикуются в авторской редакции. Ответственность за достоверность содержания работ лежит на авторах.*

ISBN 978-5-98591-158-9

© Сибирский государственный медицинский университет, 2022  
© Макет изд-ва СибГМУ, 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

СВЯЗЬ PD-L1 СТАТУСА ОПУХОЛИ С ЭКСПРЕССИЕЙ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ОПУХОЛЯХ ЖЕЛУДКА <b>Л.В. Спирина, А.В. Августинovich, С.Г. Афанасьев</b> .....	7
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МЕЛАНОМ <b>Ю.О. Бахарева, В.О. Тараканова, М.Ю. Рубаняк</b> .....	8
ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ТЕРАПИИ HER2-ПОЗИТИВНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТАРГЕТНОГО КОНЪЮГАТА НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ ЭКЗОТОКСИНА А PSEUDOMONAS И DARPIN G3, <b>Е.А. Безверхняя, М.С. Ларькина, М.С. Третьякова, Е.В. Плотников, Е.В. Подрезова, А.А. Шульга, Р.В. Зельчан, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов, В.М. Толмачев, А.М. Орлова, С.М. Деев</b> .....	9
ЧИСЛЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ ДЕАКТИВАЦИИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ-1 АСКОРБАТАМИ ЩЕЛОЧНЫХ МЕТАЛЛОВ <b>К.С. Бразовский, Е.В. Плотников, М.С. Третьякова, М.В. Белоусов</b> .....	10
АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА IL-10 У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 И 2 ТИПА, ИМЕЮЩИХ ДИАБЕТИЧЕСКУЮ ПОЛИНЕЙРОПАТИЮ И СИНДРОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ <b>А.С. Денисюкова, Л.А. Иванова, И.И. Павлюченко</b> .....	11
КЛЕТОЧНОЕ ОКРУЖЕНИЕ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ <b>А.В. Еремина, В.В. Черных, Н.П. Бгатова, В.В. Макарова, Ю.С. Таскаева, А.Н. Трунов</b> .....	12
ПРЕДИКТИВНАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ И АБЕРРАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК ГЕНОВ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ <b>Е.А. Здерева, М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова</b> .....	13
ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТРОЙНЫМ НЕГАТИВНЫМ ФЕНОТИПОМ. ОТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ КЛАССИФИКАЦИИ К ЛЕЧЕНИЮ <b>М.К. Ибрагимова, М.М. Цыганов, Н.В. Литвяков</b> .....	14
РОЛЬ БИОБАНКИРОВАНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ <b>Е.М. Каменских, А.Ю. Крыгина, Ю.Г. Бирулина, О.С. Федорова</b> .....	15
РОЛЬ ГЕНА ВТОРОЙ ФАЗЫ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ GSTP1 (ILE105VAL) В РАЗВИТИИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА <b>Н.Я. Костюшок, И.И. Павлюченко, Л.А. Иванова</b> .....	16

ПОИСК ГЕНОВ ОНКСУПРЕССОРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АБЕРРАНТНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ <b>В.В. Курилин, В.П. Терещенко, В.В. Денисова, Г.Ю. Ушакова, Н.В. Пронкина, И.В. Шишкова, С.В. Сенников</b> .....	17
ОЦЕНКА АБЕРРАНТНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОВ ОНКСУПРЕССОРОВ НА ФОНЕ КЛЕТочНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ <b>В.В. Курилин, Е.В. Куликова, А.В. Соколов, Ю.А. Кожевников, Д.Д. Блинова, Н.М. Старостина, И.В. Шишкова, Н.В. Пронкина, С.В. Сенников</b> .....	18
ВЛИЯНИЕ СТРАТЕГИЙ МЕЧЕНИЯ ТЕХНЕЦИЕМ-99М НА ВИЗУАЛИЗАЦИЮ ЭКСПРЕССИИ HER2 В МОДЕЛИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ DARPIN G3 <b>М.С. Ларькина, Е.А. Безверхняя, М.С. Третьякова, Е.В. Плотников, А.А. Шульга, Е.В. Коновалова, А.Г. Воробьева, Р.В. Зельчан, Ф.Ш. Юлдашева, М.В. Белоусов, В.М. Толмачев, С.М. Деев</b> .....	19
НОКДАУН $\alpha 5$ ЦЕПИ ЛАМИНИНОВ СПОСОБСТВУЕТ ЧАСТИЧНОЙ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА И УВЕЛИЧИВАЕТ ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ХИМИОТЕРАПИИ <b>Д.В. Мальцева, М.П. Райгородская, Е.Н. Князев, В.Г. Згода, О.В. Тихонова, С.В. Никулин, А. Баранова, С.Родин, А.Г. Тоневицкий</b> .....	20
ОЦЕНКА ТАРГЕТНОГО АГЕНТА НА ОСНОВЕ АФФИБОДИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ МОЛЕКУЛЫ ИММУННОЙ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ B7-H3 <b>М. Oroujeni, E.A.Bezverkhniaia, T. Xu, Y. Liu, E.V. Plotnikov, I. Karlberg, A. Orlova, V. Tolmachev and F.Y. Frejd</b> .....	20
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК <b>А.Р. Есимбекова, И.С. Зинченко, Н.В. Палкина, Т.Г. Рукша</b> .....	22
ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА РЕКОМБИНАНТНОГО CD47 ЧЕЛОВЕКА В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТАРГЕТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ <b>А.С. Мустафаева, А. Сатиш, А.В. Ряполова, А.С. Авдюшкин, М.Э. Березкина, А. Бухарев, Д.О. Чернышова, А.К. Мисорин, М.С. Карбышев</b> .....	23
ПАНЕЛЬ МАРКЕРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ОТВЕТА НА НЕОАДЪЮВАНТНУЮ ХИМИОТЕРАПИЮ ЛЮМИНАЛЬНОГО В РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	

<b>В.В. Стрельников, В.О. Сигин, А.С. Танас, А.И. Калинин, М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, Н.В. Литвяков</b> .....	24
<b>РОЛЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ЭКЗОСОМ В ПРОГРЕССИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ</b>	
<b>О.С. Тутанов, А.И. Яловая, И.А. Рекеда, Т.А. Штам, Н.В. Юнусова, А.Ю. Александрова, С.Н. Тамкович</b> .....	25
<b>ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПРОФИЛЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ СОПРЯЖЕННЫЙ С ПРОГРЕССИЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ</b>	
<b>Л.А. Таширева, Т.С. Геращенко, В.М. Перельмутер</b> .....	27
<b>ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ МЕЖДОМЕННОГО ЛИНКЕРА НА БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ СЛИТЫХ С ABD КОНЪЮГАТОВ АФФИБОДИ-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО</b>	
<b>М.С. Третьякова, Tianqi Xu, Jie Zhang, Maryam Oroujeni, В. Боденко, М.В. Белоусов, А. Орлова, В. Толмачев, А. Воробьева, Torbjörn Gräslund</b> .....	28
<b>МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ПРИ АНАЛИЗЕ ЛИПИДОМА, ПРОТЕОМА И МЕТАБОЛОМА МАКРОФАГОВ И МОНОЦИТОВ</b>	
<b>В.Е. Франкевич, В.В. Чаговец, Н.А. Ломова, А.В. Новоселова</b> .....	29
<b>МЕХАНИЗМЫ ВЫХОДА ИЗ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИОПРЕПАРАТОВ</b>	
<b>И.А. Цыденова, М.М. Цыганов, М.К Ибрагимова, А.А. Нуштаева, Н.В. Литвяков</b> .....	30
<b>ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЯ ПОЛИАМИНОВ В МОЧЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ И СЗРП</b>	
<b>В.В. Чаговец, А.В. Новоселова, А.П. Магомедова, Е.В. Титова, Н.А. Ломова</b> .....	31
<b>ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ МАЛИГНИЗАЦИИ: ПОИСК НОВЫХ МАРКЕРОВ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ</b>	
<b>Н.В. Чердынцева, П.А. Гервас, Е.Э. Иванюк, А.А. Иванова, А.Ю. Молоков, А.А. Пономарева, Н.Е. Ермак, М.А. Булдаков</b> .....	32
<b>РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ, ВОЗДЕЙСТВУЮЩИХ НА ОПУХОЛЕВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ</b>	
<b>Д.О. Чернышова, М.Э. Березкина, А.И. Антонова, А.Д. Азарян, А.К. Мисорин, М.С. Карбышев</b> .....	34
<b>БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИХ PD-L1</b>	
<b>О.А. Шашкова, И.С. Малахов, Л.А. Терехина, К.О. Авров, А.А. Пиневиц, Н.Л. Вартамян, И.Ю. Крутецкая, М.А. Берлина, А.А. Крылова, С.В. Федоренко, М.П. Самойлович</b> .....	35
<b>ПРОТЕОМ ЭКЗОСОМ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАК ИСТОЧНИК БИОМАРКЕРОВ</b>	
<b>А.А. Шефер, Л.В. Яньшолле, А.Е. Григорьева, С.Н. Тамкович</b> .....	36

**МУТАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ОПУХОЛЕЙ НЕВЫЯВЛЕННОЙ ПЕРВИЧНОЙ  
ЛОКАЛИЗАЦИИ**

**А.А. Щеголева, Р.С. Воробьев, Е.В. Денисов .....37**

**ИССЛЕДОВАНИЕ НАТИВНОЙ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ИММУННЫХ КЛЕТОК В  
КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МАРКЕРА РЕАКТИВНОСТИ ПРОТИВ ОПУХОЛИ**

**Д.В. Южакова, А.В. Изосимова, А.М. Можеров, Е.В. Загайнова .....38**

**МИКРОРНК КАК ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ БИОМАРКЕРЫ МЕЗИАЛЬНОЙ ВИСОЧНОЙ  
ЭПИЛЕПСИИ (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

**К.Д. Яковлева, А.А. Усольцева, Е.А. Доморацкая, Д.В. Дмитренко .....39**

## СВЯЗЬ PD-L1 СТАТУСА ОПУХОЛИ С ЭКСПРЕССИЕЙ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ОПУХОЛЯХ ЖЕЛУДКА

### RELATIONSHIP OF PD-L1 TUMOR STATUS WITH MOLECULAR MARKERS EXPRESSION IN GASTRIC CANCERS

Л.В. Спирина<sup>1,2</sup>, А.В. Августинович<sup>1</sup>, С.Г. Афанасьев<sup>1</sup>

E-mail: [spirinalvl@mail.ru](mailto:spirinalvl@mail.ru)

<sup>1</sup>НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия

**Введение.** PD-L1 статус при раке желудка (РЖ) является значимым маркером для назначения терапии ингибиторами контрольных точек. Известно, что молекулярные особенности опухоли, к которым относят АКТ/mTOR сигнальный каскад, активация аутофагии, могут определять эффективность лечения.

Цель исследования: изучить экспрессии PD-1, PD-L1, PD-L2, транскрипционных факторов, факторов роста и LC3B у пациентов с РЖ в зависимости от PD-L1 статуса опухоли.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 38 пациентов с РЖ. Все больные проходили комбинированное лечение по схеме FOLFOX6 или FLOT с последующей частичной или полной гастрэктомией. PD-L1+ статус опухоли был зарегистрирован у 12 пациентов (CPS > 5), отрицательный статус был отмечен у 26 пациентов. Экспрессию молекулярных маркеров определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Содержание белка LC3B исследовали методом Вестерн Блоттинг.

**Результаты.** В результате проведенного исследования выявлено, что в PD-L1-положительных опухолях экспрессия PD-1 и PD-L2 увеличилась в 3,86 и 2,43 раза. При этом экспрессия NF-κB p50 и HIF-2 увеличилась в 15,05 и 12,34 раза в опухолях PD+ по сравнению с отрицательными опухолями. Показано, что уровень мРНК LC3B был связан со статусом опухоли PD-L1. Мы обнаружили, что содержание мРНК и белка увеличивается в 3,49 и 1,76 раза при ИHC PD-L1 положительном статусе опухоли по сравнению с отрицательным.

Выявлено снижение экспрессии 4EBP1 в опухолях в 2,2 раза с увеличением экспрессии VEGF и CAIX в 7,25 и 5,1 раза по сравнению с неизменными тканями после НАХТ. Кроме того, обнаружено увеличение экспрессии LC3B в 5,12 раза после НАХТ. Однако экспрессия PD, PD-L1 и PD-L2 при раке до и после НАХТ не изменялась. Показано снижение уровней мРНК АКТ и mTOR в 5,66 и 11,05 раза в PD-L1-положительных опухолях с повышением HIF-1, VEGF и CAIX, увеличившись в 26,8, 8,0 и 14,19 раза по сравнению с отрицательными. Полученное изменение биологических свойств раковых клеток подчеркивает участие множества внутренних механизмов в регуляции поведения раковых клеток.

**Выводы.** PD-L1 статус опухоли при раке желудка является значимым маркером прогрессирования рака, выявляющим многочисленные внутренние механизмы распространения рака и приводящим к неэффективной терапии. Индукция аутофагии и неоангиогенеза выявлена в PD-L1-положительных опухолях желудка.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ МЕЛАНОМ

### MOLECULAR GENETICS VARIETY OF MELANOMA

Ю.О. Бахарева<sup>1</sup>, В.О. Тараканова<sup>1,2</sup>, М.Ю. Рубаняк<sup>1,2</sup>

E-mail: [bahareva.yo@ssmu.ru](mailto:bahareva.yo@ssmu.ru)

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия

<sup>2</sup> НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск, Россия

**Введение.** За последнее десятилетие мы значительно продвинулись в понимании молекулярной эпидемиологии меланомы. Всесторонняя каталогизация ландшафта драйверных мутаций позволила идентифицировать ключевые пути патогенеза и расширить терапевтические возможности в связи с разработкой таргетной терапии.

**Материалы и методы.** При подготовке данного исследования были проанализированы источники из электронных баз данных MEDLINE/PubMed, eLIBRARY, Google Scholar, опубликованные за последние 10 лет.

**Результаты.** Для поверхностно-распространяющейся меланомы характерна самая сильная связь с мутацией BRAF (40–50%), которая связана с кумулятивным ультрафиолетовым воздействием. У более зрелых пациентов чаще встречаются NRAS мутации, без четкой связи с ультрафиолетовым воздействием. NF мутации встречаются примерно в 12–14% случаев кожной меланомы. При десмопластической меланоме наиболее распространенные изменения обнаруживаются в генах-супрессорах опухолей CDKN2A (47%), TP53 (48%) и NF1 (55%). При акральной меланоме и меланоме слизистых оболочек частота мутаций BRAF и NRAS составляет 23,7% и 10,4%, соответственно. Для увеальной меланомы характерны GNA11 и GNAQ мутации.

**Выводы.** Показано, что при разных формах меланомы характерны определенные мутации, дальнейшее их изучение и каталогизация улучшит процесс диагностики и расширит возможности таргетной терапии.



ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ТЕРАПИИ HER2-ПОЗИТИВНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТАРГЕТНОГО КОНЪЮГАТА НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ  
ЭКЗОТОКСИНА А PSEUDOMONAS И DARPIN G3, ПОЛУЧЕННОЙ МЕТОДОМ ГЕННОЙ  
ИНЖЕНЕРИИ

EVALUATION OF THE POSSIBILITY OF THERAPY FOR HER2-POSITIVE MALIGNANT TUMORS  
USING A TARGETED CONJUGATE BASED ON EXOTOXIN A PSEUDOMONAS AND DARPIN G3

Е.А. Безвержня<sup>1,2</sup>, М.С. Ларькина<sup>1,2</sup>, М.С. Третьякова<sup>2,3</sup>, Е.В. Плотников<sup>2</sup>,  
Е.В. Подрезова<sup>2</sup>, А.А. Шульга<sup>2,5</sup>, Р.В. Зельчан<sup>2,3</sup>, М.С. Юсубов<sup>2</sup>, М.В. Белоусов<sup>1,2</sup>,  
В.М. Толмачев<sup>2,4</sup>, А.М. Орлова<sup>2,4</sup>, С.М. Деев<sup>2,5</sup>

E-mail: [yekaterinabezv@mail.ru](mailto:yekaterinabezv@mail.ru)

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия

<sup>2</sup> НИЦ «Онкотераностика», НИ ТПУ, г. Томск, Россия

<sup>3</sup> НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск, Россия

<sup>4</sup> Университет Уппсалы, Уппсала, Швеция

<sup>5</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия

**Введение.** Рецептор эпидермального фактора роста HER2, гиперэкспрессия которого отмечена при различных опухолях человека, является перспективной мишенью для диагностики и терапии рака. Новый таргетный конъюгат DARPIn G3-linker-LoPE (G3-LoPE) является перспективным иммунотерапевтическим агентом для терапии HER2-позитивных опухолей.

**Материалы и методы.** Для исследования специфичности связывания и интернализирующей способности *in vitro* в отношении HER2<sup>+</sup> и HER2<sup>-</sup> опухолевых линий получали конъюгат <sup>99m</sup>Tc-G3-LoPE. Для радионуклидной визуализации получали комплекс <sup>99m</sup>Tc-G3. Терапевтическая эффективность G3-LoPE отдельно и в комбинации с трастузумабом исследовалась на иммунодефицитных мышах NU/J с HER2<sup>+</sup> ксенотрансплантатами SKOV-3 и HER2<sup>-</sup> ксенотрансплантатами PC-3.

**Результаты.** G3-LoPE оказывает дозозависимый цитотоксический эффект в отношении HER2<sup>+</sup> линии SKOV-3. Изучение специфичности *in vitro* <sup>99m</sup>Tc-G3-LoPE продемонстрировало насыщаемое связывание с SKOV-3 (10,4±0,4 %), SKBR-3 (14,6±0,7%) и PC-3 (0,56±0,03%), пропорциональное уровню экспрессии рецептора HER2. Интернализация <sup>99m</sup>Tc-G3-LoPE в SKOV-3 и SKBR-3 происходит достаточно быстро (40–50% за 24 часа), что создает предпосылки для эффективной внутриклеточной доставки токсина. Радионуклидная молекулярная визуализация с радиокомплексом <sup>99m</sup>Tc-G3 позволяет различать опухоли с высокой и низкой экспрессией HER2, что подтверждает высокую HER2-специфичность. Оценка терапевтического эффекта изучаемой таргетной конструкции у мышей с ксенографтами SKOV-3 показала продление медианной выживаемости мышей по сравнению с контролем. Не было отмечено тенденции к потере веса ни в одной из групп экспериментальных животных по сравнению с контролем, что свидетельствует о хорошей переносимости терапии.

**Выводы.** G3-LoPE специфично связывается с HER2<sup>+</sup> опухолями и обеспечивает противоопухолевый эффект в ксенографтах SKOV-3, что характеризует G3-LoPE как потенциальный таргетный терапевтический агент для терапии HER2-позитивного рака.

# ЧИСЛЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ ДЕАКТИВАЦИИ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ-1 АСКОРБАТАМИ ЩЕЛОЧНЫХ МЕТАЛЛОВ

## NUMERICAL STUDY OF SUPEROXIDEDISMUTASE-1 POSTTRANSLATIONAL INACTIVATION BY ALKALI METAL SALTS OF ASCORBIC ACID

К.С. Бразовский<sup>1</sup>, Е.В. Плотников<sup>1</sup>, М.С. Третьякова<sup>1</sup>, М.В. Белоусов<sup>1,2</sup>

E-mail: [mbc@tpu.ru](mailto:mbc@tpu.ru)

<sup>1</sup>НИ ТПУ, г. Томск, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия

**Введение.** Супероксиддисмутаза-1 (СОД-1) играет важную роль в механизмах антиоксидантной защиты как нормальных, так и опухолевых клеток. Недавние исследования показали, что в опухолевых клетках наблюдается повышенное содержание СОД, что повышает устойчивость раковых клеток к оксидативному стрессу и, как следствие, снижает эффективность терапии. В течение продолжительного времени проводились исследования возможного противоопухолевого действия аскорбиновой кислоты и ее производных, однако были получены противоречивые данные об эффективности солей аскорбиновой кислоты как противоопухолевого средства. Большинство исследователей поддерживают идею о том, что возможная противоопухолевая активность аскорбатов обусловлена их прооксидантными свойствами, которые проявляются в определенном химическом окружении. Косвенным подтверждением этой концепции является экспериментально обнаруживаемое статистически значимое повышение концентрации активных форм кислорода в клеточных культурах, инкубированных с различными солями аскорбиновой кислоты. Возможна и альтернативная интерпретация экспериментальных данных, например, снижение активности внутриклеточной системы антиоксидантной защиты. Нами была предложена гипотеза о том, что аскорбаты щелочных металлов могут снижать активность одного из ключевых ферментов антиоксидантной защиты, а именно супероксиддисмутаза-1, за счет взаимодействия с активным центром, содержащим ион меди.

**Материалы и методы.** Проведено численное моделирование возможного взаимодействия активного центра СОД-1 с тремя солями аскорбиновой кислоты: аскорбатами лития, натрия и калия. Эти соли выбраны по причине их наибольшего распространения и применения, в том числе, как пищевых добавок и антипсихотических лекарственных средств. Моделирование проведено с использованием пакета для квантово-химических расчетов NWCHEM 7.0.2 на основе теории функционала плотности (DFT) с базисами 6-31G и cc-pVTZ. Геометрическая структура активного центра СОД-1 вначале была оптимизирована для окисленного и восстановленного состояний. Молекулы аскорбатов также были предварительно геометрически оптимизированы. Затем была вычислена оптимальная геометрия возможных комплексов при различных начальных условиях.

**Результаты.** Показано, что аскорбаты щелочных металлов не могут обмениваться электронами с ионом меди в активном центре СОД-1, однако существенно изменяют конфигурацию электрического поля этого центра. Как следствие, снижается вероятность взаимодействия активных форм кислорода с активным центром СОД-1, что эквивалентно частичной деактивации этого фермента.

**Выводы.** Предложена и теоретически подтверждена гипотеза возможного механизма снижения активности СОД-1 при взаимодействии с аскорбатами щелочных металлов. Необходимо получение экспериментальных доказательств в исследованиях на клеточных культурах.

## **АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА IL-10 У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 И 2 ТИПА, ИМЕЮЩИХ ДИАБЕТИЧЕСКУЮ ПОЛИНЕЙРОПАТИЮ И СИНДРОМ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ**

### **ANALYSIS OF IL-10 GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH TYPE 1 AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS WITH DIABETIC POLYNEUROPATHY AND DIABETIC FOOT SYNDROME**

А.С. Денисюкова, Л.А. Иванова, И.И. Павлюченко

E-mail: [denisyukovaa@yandex.ru](mailto:denisyukovaa@yandex.ru)

*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Краснодар, Россия*

**Введение.** IL-10 представляет собой противовоспалительный цитокин с более низкими уровнями циркуляции у пациентов с сахарным диабетом (СД). IL-10, подавляет выработку провоспалительных цитокинов, которые нарушают процессы регенерации в тканях.

**Материалы и методы.** Клинико-лабораторное оборудование ГБУЗ «КБСМП г. Краснодара» МЗ КК. Для дополнительных лабораторных исследований вся необходимая аппаратура имеется в полном объеме в лаборатории молекулярно-генетических и биохимических исследований кафедры биологии с курсом медицинской генетики КубГМУ.

**Результаты.** Среди 119 пациентов с СД 1 и 2 типа, имеющих ДН и СДС были выделены группы: 1-я – СД 1 тип с ДН (19 человек); 2-я – СД 1 тип с ДН и СДС (16 человек); 3-я – СД 2 тип с ДН (60 человек); 4-я – СД 2 тип с ДН и СДС (24 человека); 5-я – здоровые (19 человек). У всех этих групп пациентов исследовался полиморфизм гена IL-10 и оценивалась степень компенсации сахарного диабета. 1-я группа: мутация IL-10 у 2-х пациентов; 2-я группа: мутация IL-10 у 4-х пациентов; 3-я группа мутация IL-10 у 10-ти пациентов; 4-я группа мутация IL-10 у 7-ми пациентов; 5-я группа мутаций IL-10 нет. У пациентов с тяжелым течением ДН и СДС отмечались мутантные аллели IL-10. Однако, были пациенты, у которых не было тяжелого течения ДН и СДС при наличии мутантных аллелей IL-10. Соответственно, можно предположить, что у пациентов с мутацией IL-10 декомпенсация СД вызывает активацию экспрессии генов IL-10, что сопровождается тяжелым течением ДН и СДС. И, наоборот, у пациентов с компенсированным СД не активируется экспрессия IL-10, хотя пациенты имеют мутацию IL-10.

**Выводы.** Полученные данные повышают возможности диагностики ДН и СДС у пациентов с СД 1 и 2 типа на основе выявления особенностей полиморфизма генов IL-10, а также позволяют выявить пациентов, предрасположенных к тяжелому течению ДН и СДС, которым необходимо в первую очередь начать своевременную профилактику данных осложнений.

## КЛЕТЧНОЕ ОКРУЖЕНИЕ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

### CELLULAR ENVIRONMENT OF UVEAL MELANOMA

А.В. Еремина<sup>1</sup>, В.В. Черных<sup>1</sup>, Н.П. Бгатова<sup>2</sup>, В.В. Макарова<sup>2</sup>, Ю.С. Таскаева<sup>2</sup>,  
А.Н. Трунов<sup>1</sup>

E-mail: [alenska-er@mail.ru](mailto:alenska-er@mail.ru)

<sup>1</sup>ФГАУ НИМЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России», Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>НИИ клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск, Россия

**Введение.** Изучение морфологии клеток увеальной меланомы, является необходимостью для современного общества, так как помогает понять структуру клеток, обратить внимание на «болевые точки» данного заболевания, и, основываясь на этих данных, при современном развитии морфологических исследований, рассмотреть дальнейшие пути лечения столь злокачественного заболевания, используя современные представления о лимфатической системе глаза.

**Материалы и методы.** Были взяты фрагменты энуклеированных по медицинским показаниям глаз у 11 больных с диагнозом «меланома хориоидеи». Для иммуногистохимического исследования использовали маркеры эндотелия кровеносных и лимфатических сосудов (CD31 и Podoplanin). Изображения тканевых срезов глаза получали с помощью светового микроскопа «Leica DME».

**Результаты.** Методами электронной микроскопии и иммуногистохимического анализа показаны типичные по строению кровеносные капилляры и сосуды и определены различные типы клеток стромы увеальной меланомы. В каналах внеклеточного матрикса, окружающих скопления опухолевых клеток, выявлены макрофаги, фибробласты разной степени дифференцированности и эндотелиоподобные клетки с большим содержанием кавеол в цитоплазме. Наличие в каналах внеклеточного матрикса локальных структур, окрашивающихся на маркеры кровеносных и лимфатических сосудов (CD31 и Podoplanin) свидетельствуют, что описанные эндотелиоподобные клетки могут быть структурной основой для опухолевых кровеносных и лимфатических сосудов.

**Выводы.** Трудности выявления лимфатических элементов в структурах глаза человека, обусловлены органо-специфичностью их строения, отсутствием однозначных молекулярных маркеров и требуют дальнейшего исследования с использованием дополнительных поверхностных и внутриклеточных маркеров для уточнения цитологической принадлежности данных клеток.

## ПРЕДИКТИВНАЯ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ И АБЕРРАЦИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК ГЕНОВ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

### PREDICTIVE AND PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF EXPRESSION AND ABERRATIONS OF THE DNA COPY NUMBER OF CHEMOSENSITIVITY GENES IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

Е.А. Здерева, М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова  
E-mail: [zdereva.e@gmail.com](mailto:zdereva.e@gmail.com)

*НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск, Россия*

**Введение.** Для персонализации лечения онкологических больных, определяются маркеры химиочувствительности. Экспрессия некоторых генов в опухолевой ткани связана с химиорезистентностью и прогнозом у больных раком молочной железы (РМЖ). Интерес представляют исследования хромосомных aberrаций в локусах данных генов, влияющие на уровень экспрессии генов.

**Цель.** Провести анализ связи экспрессии генов химиочувствительности *ERCC1*, *RRM1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TUBB3*, *TYMS*, *GSTP1* с эффектом неoadъювантной химиотерапии (НХТ).

**Материалы и методы.** Обследовано 97 больных с морфологически верифицированным диагнозом РМЖ люминального В подтипа и клинической стадией IIА–IIIВ. Для анализа aberrаций числа копий (CNA) проводили микроматричный анализ на ДНК-чипах высокой плотности CytoScan™HD Array фирмы Affymetrix (USA). Для биоинформатического анализа использовалась программа «Chromosome Analysis Suite 4.0». Уровень экспрессии оценивали при помощи ОТ-ПЦР. Анализ выживаемости проводили по методу Каплана–Мейера.

**Результаты.** У больных с наличием объективного ответа на лечение экспрессия *RRM1* статистически выше, по сравнению с пациентами со стабилизацией и прогрессированием ( $p=0,04$ ). Высокие уровни экспрессии генов *TOP2α* и *TYMS* связаны с наличием объективного ответа на лечение ( $p=0,03$ ). Аналогичный результат показан для гена *TUBB3* у пациентов, пролеченных таксотером в монорежиме. Высокий уровень экспрессии гена *GSTP1* сопряжен с низкой эффективностью НХТ по схеме СР ( $p=0,05$ ). Анализ связи наличия хромосомных aberrаций в исследуемых генах химиочувствительности у пациентов с РМЖ показал, что CNA слабо коррелирует с эффектом НХТ. Пациенты с гиперэкспрессией гена *GSTP1* имеют 100% безметастатическую выживаемость (log-rank test  $p=0,02$ ). У пациентов с наличием делеции гена *RRM1* наблюдаются лучшие показатели выживаемости по сравнению с нормальной копийностью данного гена и амплификацией. Наличие амплификации гена *GSTP1* обуславливает высокую выживаемость (5-летняя БМВ 86%), тогда как при делеции данный показатель превышает чуть более 50%.

**Выводы.** Несмотря на весьма противоречивые результаты, можно сказать, что в будущем оценка данных параметров будет полезна с точки зрения персонализированного подхода к выбору химиотерапевтических препаратов.

*Работа выполнена в рамках конкурса 2021–2023 гг. на получение стипендии Президента РФ молодыми учеными и аспирантами.*

# ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ТРОЙНЫМ НЕГАТИВНЫМ ФЕНОТИПОМ. ОТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ КЛАССИФИКАЦИИ К ЛЕЧЕНИЮ

## WHOLE GENOME ANALYSIS OF BREAST TUMOR WITH A TRIPLE NEGATIVE PHENOTYPE. FROM MOLECULAR CLASSIFICATION TO TREATMENT

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

E-mail: [imk1805@yandex.ru](mailto:imk1805@yandex.ru)

<sup>1</sup>НИИ онкологии Томского НИМЦ, г. Томск, Россия

<sup>2</sup>НИ ТГУ, г. Томск, Россия

**Введение.** Несмотря на разнообразие различных классификаций для трижды негативного рака молочной железы (ТН РМЖ), основанных на геномных, транскриптомных, протеомных, эпигеномных, иммунологических данных, на сегодняшний день не представлено классификации, имеющей прогностическую значимость. Более того, в настоящее время отсутствует «мутационная (tumor mutation) классификация» ТН РМЖ. Целью настоящей работы явилось представление нового подхода в молекулярно-генетической классификации ТН РМЖ с прогнозированием исхода больных.

**Материалы и методы.** В работе использованы данные трех баз: TCGA, Metabric и МСК.

По данным базы TCGA частота мутаций оценивалась у 171 пациентки с ТН РМЖ и 774 больных РМЖ других молекулярных подтипов. Для дополнительного анализа также использовалась база данных Metabric с включением 270 пациентов с ТН РМЖ.

**Результаты.** При сравнении только соматических мутаций ТН РМЖ по базам данных TCGA и Metabric, определено пересечение по 4 генам: *DNAH5* (5p15.2), *TG* (8q24.22), *AHNAK* (11q12.3), *BRCA1* (11q12.3). Показано, что в группе с наличием мутаций данных 4 генов медиана общей выживаемости (ОВ) превышает аналогичную у пациенток с мутацией *PIK3CA* более, чем в 2 раза. Медиана безрецидивной выживаемости (БВ) в группе с мутацией *PIK3CA* составила 67 мес., а в группе с 4 мутациями не достигнута.

Показано, что для пациентов с отсутствием неoadъювантной химиотерапии (НХТ) в группе с 0–1 амплификацией генов стволовости медиана ОВ составила 211 мес., а в группе с 2 и более амплификациями медиана ОВ снизилась более, чем в 2 раза. Для пациентов с НХТ в группе с 0–1 амплификацией медиана ОВ составила 112 мес., а в группе с 2 и более амплификациями медиана ОВ выросла в 1,75 раза.

**Выводы.** Для ТН РМЖ возможно дополнительно использовать следующие классификации:

1. Классификацию на основе амплификаций генов стволовости для определения целесообразности назначения НХТ.
2. Классификацию В. Lehmann с учетом интерпретации FUTURE trial для определения схемы НХТ больным, которым она показана.
3. Мутационную классификацию для прогнозирования исхода пациентов и определения тактики дальнейшего лечения в адъювантном режиме.

Работа поддержана грантом РФФ 22-25-00499.

## РОЛЬ БИОБАНКИРОВАНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### БИОBANKIG ROLE IN GENETIC RESEARCH

Е.М. Каменских, А.Ю. Крыгина, Ю.Г. Бирулина, О.С. Федорова

E-mail: [kamenskih.em@ssmu.ru](mailto:kamenskih.em@ssmu.ru)

*ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия*

**Введение.** Биобанкирование является универсальным и ключевым методом проведения преаналитического этапа биомедицинских исследований. Генетические исследования требуют соблюдения определенных техник сбора, транспортировки, пробоподготовки и хранения биологических материалов.

**Материалы и методы.** Были проанализированы источники из электронных баз данных MEDLINE/PubMed, eLIBRARY, Google Scholar, опубликованные за последние 10 лет. Ключевыми словами для поиска были выбраны: “биобанк”, “криоконсервация”, “генетические исследования”; “biobank”, “cryopreservation”, “genetic research”.

**Результаты.** В качестве источников для выделения генетического материала могут использоваться антикоагулированная цельная кровь и ее компоненты (лейкоцитарный слой или мононуклеарные клетки крови), сухие капли крови, тканевые биоптаты, спинномозговая жидкость, плевральный выпот, моча и фекалии. Внеклеточная ДНК (вкДНК) может выделяться из крови, мочи, слюны, синовиальной и цереброспинальной жидкости. Сбор производится в специальные контейнеры, содержащие стабилизаторы, например, для крови и мочи – соли ЭДТА в разных концентрациях. При необходимости, транспортировка осуществляется с поддержанием холодной цепи от 4 до -196 °С. После центрифугирования плазма (или сыворотка) могут храниться длительное время при температуре -80 °С. При хранении от нескольких недель до 11 лет при температуре -22 до -32 °С отмечалось снижение выхода ДНК из-за фрагментации на 3,92% ежегодно. Возможно хранение цельной крови или лейкоцитарной пленки при комнатной температуре на специальных носителях с добавлением стабилизаторов ДНК (трегалозы или поливинилового спирта) или в герметичных миникапсулах из нержавеющей стали с содержанием аргона и гелия. Выделенную ДНК также можно хранить при комнатной температуре в высушенном виде при добавлении специальных стабилизаторов, так как образец находится в аморфном некристаллическом или стекловидном состоянии, при котором молекулы теряют способность диффундировать, что предотвращает деградацию нуклеиновых кислот. Предотвратить депурирование, депиримидинирование, дезаминирование и гидролиз в водных растворах нуклеиновых кислот можно, используя щелочные буферы.

**Выводы.** На любом преаналитическом этапе генетических исследований требуется соблюдение требований биобанкирования, что связано с рисками ухудшения качества образцов и снижением возможности выделения генетического материала. Систематизация накопленного опыта позволит разработать рекомендации по использованию биобанкирования как обязательного метода генетических исследований для повышения качества и воспроизводимости получаемых результатов.

## РОЛЬ ГЕНА ВТОРОЙ ФАЗЫ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ GSTP1 (ILE105VAL) В РАЗВИТИИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

### THE ROLE OF THE GENE OF THE SECOND PHASE OF THE XENOBIOTIC BIOTRANSFORMATION SYSTEM GSTP1 (ILE105VAL) IN THE DEVELOPMENT OF DIABETIC NEPHROPATHY IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Н.Я. Костюшок, И.И. Павлюченко, Л.А. Иванова

E-mail: [ShagalovaN@list.ru](mailto:ShagalovaN@list.ru)

*ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Краснодар, Россия*

**Введение.** Сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа) – это полигенное мультифакторное заболевание. Особую роль в прогнозе течения болезни пациента играет такое грозное осложнение сахарного диабета, как диабетическая нефропатия (ДНП), приводящая в своем исходе к хронической болезни почек. Выявление предикторов, которые, в комплексе с уже известными повреждающими факторами могут оказывать влияние на прогрессирование нефропатии, прежде всего, за счет избыточного образования мембрано- и цитотоксических продуктов перекисного окисления липидов, является важной проблемой в диабетологии. В нашей работе была проведена оценка полиморфизма гена GSTP1 (ILE105VAL), как одного из ключевых ферментов 2 фазы биотрансформации ксенобиотиков и была оценена его роль в развитии ДНП у пациентов с СД 2 типа.

**Материалы и методы.** Изучались две популяции: пациенты с СД 2 типа и пациенты без СД 2 типа. В основную группу были включены 50 пациентов с СД 2 типа в возрасте 45–70 лет, без тяжелых сопутствующих патологий, с длительностью сахарного диабета до 5 лет, уровнем гликированного гемоглобина не более 10 %, и уровнем СКФ более 45 мл/мин/1.73м<sup>2</sup>. Контрольная группа была сформирована из 20 условно здоровых доноров.

**Результаты.** Проведена оценка полиморфизма гена GSTP1 (ILE105VAL), как одного из ключевых ферментов 2 фазы биотрансформации ксенобиотиков и была оценена его роль в развитии ДНП у пациентов с СД 2 типа.

Генотипирование при помощи ПЦР позволило в дальнейшем разделить пациентов основной и контрольной группы на подгруппы в зависимости от определяемого полиморфизма гена GSTP-1 (I105V): гомозиготы с нулевым (делеционным) генотипом (гомозиготы по аллелю 2 – 0/0) гомозиготы с нормальным генотипом (гомозиготы по аллелю 1 – +/+), гетерозиготы с генотипом (+/0) по определенным генам и генным локусам.

**Выводы.** Выявление мутантного гомозиготного (0/0) полиморфизма гена GSTP-1 (I105V) сочетается с достоверным снижением уровня фермента глутатион-S-трансферазы в крови и повышением уровня малонового диальдегида (в сравнении с показателями контрольной группы). Также данный полиморфный вариант приводит к повышению микроальбуминурии, повышению уровня креатинина и снижению уровня скорости клубочковой фильтрации у пациентов с СД 2 типа и ДНП.



## ПОИСК ГЕНОВ ОНКСУПРЕССОРОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ АБЕРРАНТНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРИ ГЕМОБЛАСТОЗАХ

### SEARCH FOR ONCOSUPPRESSOR GENES FOR THE STUDY OF ABERRANT METHYLATION IN HEMOBLASTOSIS

В.В. Курилин, В.П. Терещенко, В.В. Денисова, Г.Ю. Ушакова, Н.В. Пронкина,  
И.В. Шишкова, С.В. Сенников  
E-mail: [2221910@ngs.ru](mailto:2221910@ngs.ru)

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия*

**Введение.** Процесс развития опухоли сопряжен с повреждением внутриклеточной регуляции нормальных клеток, который сопровождается метилированием генов онкосупрессоров. Эти нарушения наблюдаются как при солидных опухолях, так и при гемобластозах. Изучение aberrантного метилирования целевых генов, ответственных за появление пула лейкозных клеток, позволит диагностировать на ранних этапах развития той или иной формы лейкозов и оценить на ранних сроках эффективность терапии. Для выявления онкологического процесса на ранних этапах его развития и его прогрессирования используется эпигенетическая ДНК-диагностика, основанная на технологии GLAD-ПЦР анализа aberrантно метилированных регуляторных участков онкосупрессоров в опухолевой ДНК.

**Материалы и методы.** У 19 пациентов с первично выявленными гемобластозами (лимфома Ходжкина – 9 пациентов, острый миелобластный лейкоз – 4 пациента, В-клеточная неходжкинская лимфома – 3 пациента, неходжкинская лимфома – 3 пациента) в первый день госпитализации была забрана периферическая кровь, из которой была выделена геномная ДНК из легкой фракции клеток крови согласно инструкции производителя (ООО «Сибэнзайм»). Клинический диагноз подтвержден результатами клинико-лабораторных исследований. Проведен биоинформационный анализ генов-онкомаркеров гемобластозов, из которых выбраны гены RARB и SIPA для последующей оценки наличия участков метилирования этих генов.

**Результаты.** У пациентов с разными видами гемобластозов выявлены участки метилирования генов RARB и SIPA, которые имеют различия в копийности. Получены предварительные биоинформационные данные по подбору целевых регуляторных участков-онкосупрессоров, которые описаны при гемобластозах.

**Выводы.** Выявленные участки метилирования генов RARB и SIPA и их различия по копийности у больных с разными видами гемобластозов, могут служить основой, наряду с другими генами-онкомаркерами, для создания методов эпигенетической диагностики гемобластозов.

## ОЦЕНКА АБЕРРАНТНОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ ГЕНОВ ОНКОСУПРЕССОРОВ НА ФОНЕ КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

### EVALUATION OF ABERRANT METHYLATION OF THE REGULATORY REGIONS OF ONCOSUPPRESSOR GENES DURING CELLULAR IMMUNOTHERAPY IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

В.В. Курилин<sup>1</sup>, Е.В. Куликова<sup>1</sup>, А.В. Соколов<sup>2</sup>, Ю.А. Кожевников<sup>1</sup>, Д.Д. Блинова<sup>1</sup>,  
Н.М. Старостина<sup>1</sup>, И.В. Шишкова<sup>1</sup>, Н.В. Пронкина<sup>1</sup>, С.В. Сенников<sup>1</sup>

E-mail: [2221910@ngs.ru](mailto:2221910@ngs.ru)

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1», г. Новосибирск, Россия

**Введение.** Известно, что одним из перспективных инструментов раннего выявления мониторинга онкологического процесса считается эпигенетическая ДНК-диагностика, включающая определение aberrантно метилированных регуляторных участков-онкосупрессоров в опухолевой ДНК, которые инактивируются при такой модификации. Этот метод востребован, особенно для оценки эффективности современных методов клеточной иммунотерапии онкологических заболеваний, направленных на индукцию противоопухолевого иммунного ответа.

**Материалы и методы.** У 13 больных колоректальным раком IIА-IIIВ стадии, после хирургического лечения, был проведен полный цикл клеточной иммунотерапии на основе аутологичных антиген-праймированных дендритных клеток и *in vitro* индуцированных мононуклеарных клеток (ограниченное клиническое исследование NCT0321493 (clinicaltrials.gov)). У 4 больных была проведена оценка aberrантного метилирования регуляторных областей генов по сайтам RCGY на разных сроках проведения иммунотерапии (до иммунотерапии, через 3 месяца и через 6 месяцев после иммунотерапии). Согласно инструкции производителя набора (ООО "Сибэнзайм"), из периферической крови больных выделяли геномную ДНК из легкой фракции клеток крови. Далее проводили GLAD-ПЦР исследование с использованием метилзависимой ДНК-эндонуклеазы (патент РФ №2630669). Эффективность иммунотерапии оценивали *in vitro* по прямой цитотоксической активности мононуклеарных клеток, индуцированных антиген-праймированными дендритными клетками, против клеточной линии колоректального рака человека (Colo-320).

**Результаты.** У пациентов, у которых наблюдали увеличение показателя цитотоксичности к 6 месяцам после иммунотерапии по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, были получены положительные результаты GLAD-ПЦР анализа, что может указывать на наличие опухолевых клеток в организме больного. У пациента, у которого показатель цитотоксического теста наоборот уменьшился, GLAD-ПЦР анализ был отрицательным, что может указывать на элиминацию опухоли. Следует отметить, что у всех обследованных пациентов, через 3 мес. после иммунотерапии, результаты GLAD-ПЦР анализа были отрицательные.

**Выводы.** Оценка aberrантного метилирования регуляторных областей генов онкосупрессоров позволяет на ранних этапах оценить эффективность противоопухолевой иммунотерапии. Это важно для планирования проведения дополнительных курсов терапии, в том числе и иммунотерапии.

## ВЛИЯНИЕ СТРАТЕГИЙ МЕЧЕНИЯ ТЕХНЕЦИЕМ-99М НА ВИЗУАЛИЗАЦИЮ ЭКСПРЕССИИ HER2 В МОДЕЛИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ ОПУХОЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ DARPIN G3

### INFLUENCE OF THE <sup>99m</sup>Tc-LABELLING STRATEGIES ON IMAGING OF HER2 EXPRESSION IN MALIGNANT CANCER MODEL USING THE DARPIN G3

М.С. Ларькина<sup>1,2</sup>, Е.А. Безверхняя<sup>1,2</sup>, М.С. Третьякова<sup>2</sup>, Е.В. Плотников<sup>2</sup>, А.А. Шульга<sup>2,4</sup>,  
Е.В. Коновалова<sup>2,4</sup>, А.Г. Воробьева<sup>2,3</sup>, Р.В. Зельчан<sup>2</sup>, Ф.Ш. Юлдашева<sup>2</sup>, М.В. Белоусов<sup>1,2</sup>,  
В.М. Толмачев<sup>2,3</sup>, С.М. Деев<sup>2,4</sup>

E-mail: [marialarkina@mail.ru](mailto:marialarkina@mail.ru)

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия

<sup>2</sup>НИ ТПУ, г. Томск, Россия

<sup>3</sup>Университет Уппсалы, г. Уппсала, Швеция

<sup>4</sup> ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Москва, Россия

**Введение.** Рецептор эпидермального фактора роста человека второго типа (HER2) гиперэкспрессирован при раке молочной железы, яичников, легкого, желудка, простаты. В настоящее время радионуклидная молекулярная визуализация с использованием таргетной молекулы DARPIn G3, меченной доступным технецием-99m является самым перспективным методом в выявлении рака с гиперэкспрессией HER2.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследования использовали скаффолды DARPIn G3 с различными хелатными группами и технеций-99m. Для тестов *in vitro* использовали клеточные линии с экспрессии HER2: SK-BR-3, SKOV-3, PC-3. *In vivo* проводили на иммунодефицитных мышах NU/J с ксенографтами SKOV-3 и PC-3.

**Результаты.** Был проведен молекулярный дизайн и создан ряд стабильных таргетных агентов, включающих DARPIn G3, хелатные центры (N<sub>3</sub>S или HYNIC) и технеций-99m. Были применены три стратегии мечения технецием-99m: окси-технеция-99m (пятивалентного) и HYNIC-технеция-99m в сравнении с трикарбонильной химией. Радиохимические выходы всех радиокоњуговатов – свыше 80% при радиохимической чистоте более 95%. Исследования *in vitro* продемонстрировали, что все исследуемые агенты специфичны к HER2 с наномолярной аффинностью (K<sub>D</sub>=1-5 нмоль), имеют медленную скорость интернализации на уровне 25-40%. Для всех агентов поглощение опухолью в SKOV-3 ксенографтах с высокой экспрессией HER2 было значительно выше (p<0,05, непарный t-критерий), чем в PC-3 ксенографтах с низкой экспрессией HER2. Стабильность *in vivo* подтверждена для всех вариантов низким поглощением активности в слюнных железах и желудке. Применение стратегий окси-технеция-99m и HYNIC-технеция-99m позволяет снизить поглощение в почках от 4 до 25 раз, однако повышается захват в печени, легких и селезенке по сравнению с агентом, меченным трикарбонильным технецием-99m.

**Выводы.** Созданные таргетные агенты на основе DARPIn G3 и технеция-99m специфически связываются с опухолями в ксенографтах SKOV-3, экспрессирующих HER2, и являются подходящими агентами для визуализации экспрессии HER2 и стратификации пациентов для терапии, направленной на HER2.

## НОКДАУН $\alpha 5$ ЦЕПИ ЛАМИНИНОВ СПОСОБСТВУЕТ ЧАСТИЧНОЙ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА И УВЕЛИЧИВАЕТ ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ХИМИОТЕРАПИИ

### KNOCKDOWN OF $\alpha 5$ LAMININ CHAIN LEADS TO PARTIAL DEDIFFERENTIATION OF COLORECTAL CANCER CELLS AND INCREASES THEIR SENSITIVITY TO CHEMOTHERAPY

Д.В. Мальцева<sup>1</sup>, М.П. Райгородская<sup>1</sup>, Е.Н. Князев<sup>1,2</sup>, В.Г. Згода<sup>3</sup>, О.В. Тихонова<sup>3</sup>,  
С.В. Никулин<sup>1</sup>, А. Баранова<sup>4</sup>, С. Родин<sup>5</sup>, А.Г. Тоневицкий<sup>1,2</sup>

E-mail: [d.maltseva@gmail.com](mailto:d.maltseva@gmail.com)

<sup>1</sup>Факультет биологии и биотехнологии, НИУ ВШЭ, г. Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Москва, Россия

<sup>3</sup>ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», г. Москва, Россия

<sup>4</sup>Школа системной биологии, Университет Джорджа Мэйсона, г. Фэрфакс, США

<sup>5</sup>Кафедра хирургических наук, лаборатория Ангстрема, Университет Уппсалы, г. Уппсала, Швеция

**Введение.** Взаимодействие опухолевых клеток с внеклеточным матриксом (ВКМ) влияет на скорость прогрессирования рака и метастазирования. Одним из основных компонентов ВКМ являются ламинины, гетеротримерные гликопротеины, состоящие из  $\alpha$ ,  $\beta$ , и  $\gamma$  цепей ( $\alpha\beta\gamma$ ). Ламинины, взаимодействуя со своими рецепторами на поверхности клетки, регулируют множество клеточных процессов.

**Материалы и методы.** Осуществлен shRNA-опосредованный нокдаун  $\alpha 5$  цепи ламининов в клетках линии колоректального рака человека HT-29. Проанализировано влияние нокдауна на пролиферацию и миграцию клеток, чувствительность клеток к 5-фторурацилу при культивировании на пластике без покрытия и покрытом ламинином 521, а также на изменение транскриптома (с помощью микрочипов Affimetrix) и протеома (масс-спектрометрический анализ).

**Результаты.** Нокдаун  $\alpha 5$  цепи ламининов в 1,6 раза снижает пролиферацию клеток колоректального рака. Исследование миграции клеток по поверхности пластика не показало значимых различий между контрольной (HT29-shCtrl) и линией с нокдауном  $\alpha 5$  цепи ламининов (HT29-shLAMA5). Однако, при культивировании на ламининах 332 и 411 линия HT29-shCtrl демонстрировала увеличение миграции по сравнению с пластиком без покрытия, тогда как для HT29-shLAMA5 такого эффекта не наблюдалось. Анализ транскриптома показал снижение экспрессии некоторых маркеров дифференцировки эпителия кишечника, включая *ANXA13*, *KRT20*, *MUC13* и *SI*, а также увеличение экспрессии маркера стволовых клеток *LRG5*. Анализ протеома подтвердил изменение экспрессии *ANXA13*, *KRT20*, а также выявил различие экспрессии таких рецепторов  $\alpha 5$ -содержащих ламининов, как Лютеран,  $\alpha 6$  и  $\alpha 4$  субъединицы интегринов, свидетельствуя о возможном перераспределении рецепторов на поверхности клеток. Полученные данные указывали на вовлеченность Wnt- и mTORC1-сигнальных путей в наблюдаемые в клетках изменения. Кроме того, HT29-shLAMA5 демонстрировала большую чувствительность к 5-фторурацилу, по сравнению с HT29-shCtrl, что может быть связано с активацией ER-стресса по данным транскриптома.

**Выводы.** Показано, что нокдаун  $\alpha 5$  цепи ламининов приводит к Wnt- и mTORC1-зависимой частичной дедифференцировке клеток колоректального рака. Этот процесс также ассоциирован с активацией сигнальных путей ER-стресса, что способствует повышению чувствительности клеток к 5-фторурацилу.

## ОЦЕНКА ТАРГЕТНОГО АГЕНТА НА ОСНОВЕ АФФИБОДИ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ МОЛЕКУЛЫ ИММУННОЙ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ B7-H3

### EVALUATION OF AN AFFIBODY-BASED BINDER FOR IMAGING OF IMMUNE CHECKPOINT MOLECULE B7-H3

M. Oroujeni<sup>1,2</sup>, E.A.Bezverkhniaia<sup>3,4</sup>, T. Xu<sup>1</sup>, Y. Liu<sup>1</sup>, E.V. Plotnikov<sup>3</sup>, I. Karlberg<sup>2</sup>, A. Orlova<sup>3,5</sup>, V. Tolmachev<sup>1,3</sup> and F.Y. Frejd<sup>1,2</sup>

E-mail: [plotnikov.e@mail.ru](mailto:plotnikov.e@mail.ru)

<sup>1</sup>*Department of Immunology, Genetics and Pathology, Uppsala University, 75185, Uppsala, Sweden*

<sup>2</sup>*Affibody AB, 17165, Solna, Sweden*

<sup>3</sup>*Research Centrum for Oncotheranostics, Research School of Chemistry and Applied Biomedical Sciences, Tomsk Polytechnic University, 634050 Tomsk, Russia*

<sup>4</sup>*Scientific and Research Laboratory of Chemical and Pharmaceutical Research, Siberian State Medical University, Tomsk, 634050, Russia*

<sup>5</sup>*Department of Medicinal Chemistry, Uppsala University, 75183 Uppsala, Sweden*

**Introduction.** B7-H3 (CD276) is type I transmembrane protein belonging to the B7 ligand family of immune checkpoint molecules. B7-H3 has a low level of expression in most normal organs and tissues, but is overexpressed in a wide variety of cancers. This protein inhibits tumor antigen-specific immune responses, leading to a protumourigenic effect. It also could be a target for imaging and therapy. One of the promising scaffolds for radionuclide imaging are Affibody molecules, which can be produced either synthetically or in bacteria by the use of recombinant DNA technology. The goal of this study was to evaluate targeting properties of the AC12 Affibody molecule labelled with <sup>99m</sup>Tc.

**Materials and methods.** Affibody-based binder AC12 was produced by cellular-based selections aid yeast-display and labelled with <sup>99m</sup>Tc. Ovarian carcinoma SKOV-3 and breast carcinoma BT-474 cell lines were used for binding specificity and affinity in vitro tests. Biodistribution and targeting properties were evaluated in BALB/C nu/nu mice bearing B7-H3-positive SKOV-3 xenografts.

**Results.** This new affibody agent expressed highly B7-H3 specific binding properties in vitro. Uptake of agent in B7-H3-positive SKOV-3 xenografts was 6-fold higher than in B7-H3-negative xenografts in mice, which proved B7-H3-specific targeting in vivo. It was shown quick clearance of radioactivity from organs and tissues.

**Conclusions.** The functional activity of a new target agent with high specificity against immune check-point molecule B7-H3 was studied. The data obtained confirm the high activity and prospects for clinical practice.

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ПОКОЯЩИХСЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

### EPIGENETIC MECHANISMS OF QUIESCENT CANCER CELL REGULATION

А.Р. Есимбекова<sup>1</sup>, И.С. Зинченко<sup>1</sup>, Н.В. Палкина<sup>1</sup>, Т.Г. Рукша<sup>1</sup>

E-mail: [tatyana\\_ruksha@mail.ru](mailto:tatyana_ruksha@mail.ru)

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Россия

**Введение.** Среди гетерогенной популяции опухолевых клеток выделяют так называемые дормантные или покоящиеся опухолевые клетки, находящиеся в G0-фазе клеточного цикла. Дормантные опухолевые клетки характеризуются особыми генетическими, эпигенетическими и фенотипическими свойствами, их наличие связывают с развитием лекарственной устойчивости.

**Материалы и методы.** Клетки меланомы подвергались воздействию противоопухолевыми агентами – дакарбазином, вемурафенибом. Оценивалось распределение по фазам клеточного цикла на основе проточной цитометрии; профилирование микроРНК и транскриптомный анализ выполнялись на основе микроэррея.

**Результаты.** Дакарбазин, в других сериях экспериментов – вемурафениб повышали процентное содержание G0-положительных клеток. Выявлено, что при воздействии дакарбазином в клетках меланомы BR0 отмечалось повышение доли дормантных клеток в 4,3 раза, в SK-MEL-2 – в 4 раза. При воздействии вемурафенибом наблюдалась аналогичная тенденция – в 3,7 раза и в 1,3 раза соответственно. Профилирование микроРНК определило, что повышение доли G0-положительных клеток связано с повышением уровня микроРНК, регулирующих гены – компоненты сигнальных путей «MAPK», «RAS», «Фокальная адгезия». Анализ транскриптома определил, что повышение доли G0-положительных клеток сопровождается изменением механизмов внутриклеточной сигнализации, среди которых отмечались сигнальные каскады с максимальным числом дифференциально экспрессируемых генов «VEGFA-VEGFR2», «Клеточный цикл», «MAPK», «RAS», «Фокальная адгезия». Дальнейший функциональный анализ показал повышение адгезивных свойств у G0-положительных клеток.

**Выводы.** Показано, что микроРНК опосредуют изменение фенотипа дормантных клеток, в том числе, их способности к адгезии, что может отражать их роль в формировании премеаггративных ниш.

*Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (№ 19-15-00110, <https://rscf.ru/project/19-15-00110/>).*

**ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА РЕКОМБИНАНТНОГО CD47 ЧЕЛОВЕКА  
В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ  
ТАРГЕТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ**

**HETEROLOGOUS PRODUCTION OF HUMAN CD47 EXTRACELLULAR DOMAIN IN  
PROCARIOTIC EXPRESSION SYSTEM FOR FUTHER DEVELOPMENT  
OF TARGET-SPECIFIC ANTIBODIES**

А.С. Мустафаева, А. Сатиш, А.В. Ряполова, А.С. Авдюшкин, М.Э. Березкина,  
А. Бухарев, Д.О. Чернышова, А.К. Мисорин, М.С. Карбышев  
E-mail: [riapolovaav@biocad.ru](mailto:riapolovaav@biocad.ru)

АО Биокад, г. Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Антиген CD47 – трансмембранный белок, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов и вовлеченный в различные сигнальные пути, например, связываясь с сигнальным регуляторным белком  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ). Упомянутое взаимодействие является триггером сигнала «don't eat me» для макрофагов, тем самым ингибируя фагоцитоз. Таким образом, высокая представленность CD47 позволяет опухолевым клеткам уклоняться от иммунного надзора. Известно, что связывание антител с внеклеточным доменом CD47 способствует фагоцитозу опухолевых клеток макрофагами. Получение препарата человеческого антигена CD47 является первым шагом для создания моноклональных антител, используя методы генной инженерии. В данной работе мы показали, что возможно получить препарат CD47 с низким содержанием примесей и корректным фолдингом, используя прокариотическую систему экспрессии.

**Материалы и методы.** В формате скрининговой экспрессии проверены комбинации штаммов *E. coli*, экспрессионных векторов, тегов. Материалом для исследования служили супернатанты и клеточные дебрисы (тела-включения) после индукции экспрессии целевого белка в трансформированных клетках *E. coli*. Связывание полученного антигена с контрольным антителом было проверено методом иммуноферментного анализа (ИФА).

**Результаты.** Собранными генетическими конструкциями на основе векторов pET22 и pSOL, содержащими вставку CD47 с разными тегами, была проведена трансформация клеток *E. coli* штаммов: SHuffle T7 Express, Rosetta-gami2 (DE3) pLysS, C41(DE3), BL21(DE3), Arctic Express (DE3). По результатам электрофореза в ПААГ клеток, трансформированных конструкциями на основе вектора pET22, и полученных из них клеточных дебрисов и супернатантов, установлено, что экспрессируемый белок накапливается в тельцах включения клеток и в растворимой форме практически не наблюдается. Для конструкций, содержащих вставку внеклеточного домена CD47 с различными тегами и полученных в векторе pSOL, наибольший выход целевого белка в растворимом виде наблюдали при слиянии целевого белка с тегами TSF и MBP и последующей экспрессии в штаммах BL21(DE3) и Rosetta-gami2 (DE3) pLysS. Оценка уровня связывания полученного белка с антителом анти-Human CD47 (BIOCAD) была подтверждена в ИФА.

**Выводы.** Выполненное исследование является основой для разработки прокариотической экспрессионной платформы, позволяющей в короткие сроки получать корректно уложенные полипептиды с высоким выходом целевого продукта и приемлемым уровнем чистоты.

## ПАНЕЛЬ МАРКЕРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ОТВЕТА НА НЕОАДЪЮВАНТНУЮ ХИМИОТЕРАПИЮ ЛЮМИНАЛЬНОГО В РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

### DNA METHYLATION MARKER PANEL TO PREDICT RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN LUMINAL B BREAST CANCER

В.В. Стрельников<sup>1</sup>, В.О. Сигин<sup>1</sup>, А.С. Танас<sup>1</sup>, А.И. Калинин<sup>1</sup>, М.М. Цыганов<sup>2</sup>,  
М.К. Ибрагимова<sup>2</sup>, Н.В. Литвяков<sup>2</sup>

E-mail: [fstrel@list.ru](mailto:fstrel@list.ru)

<sup>1</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»,  
г. Москва, Россия

<sup>2</sup>НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск, Россия

**Введение.** Нарушения метилирования ДНК – это раннее и частое событие в канцерогенезе. Возможность обнаружения с помощью хорошо зарекомендовавших себя методов и стабильность метилирования в образцах с течением времени делают метилирование ДНК перспективным биомаркером, что придаёт актуальности в том числе задачам по разработке лабораторных тест-систем, которые позволят предсказывать чувствительность опухоли к НХТ ещё до начала лечения, с использованием биоптата в качестве материала для анализа.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования послужили биопсийные образцы люминального ВРМЖ, полученные до начала НХТ. Широкогеномное бисульфитное секвенирование выполнено для 44 образцов разведочной выборки; на дополнительной выборке из 35 образцов проведено определение параметров диагностической ценности разработанных тест-систем многолокусной метилчувствительной ПЦР в режиме реального времени (МЧ-кПЦР).

**Результаты.** На разведочной выборке биопсийного материала люминального ВРМЖ, взятого до начала лечения, впервые выполнен широкогеномный поиск маркеров метилирования ДНК в группах опухолей, чувствительных и устойчивых к НХТ, и выявлены дифференциально метилированные участки генома, различающие эти группы. Сформирована оригинальная тест-система из маркеров метилирования для формирования классификатора ответа на НХТ при раке молочной железы (панель генов TTC34, LTBR, CLEC14A,  $cvAUC=0,76$ ; 95% CI=0,75–0,78, с чувствительностью 0,7 и специфичностью 0,79). Разработан метод многолокусной метилчувствительной количественной ПЦР, позволяющий мультиплексировать несколько таргетных и контрольные геномные локусы (положительный контроль амплификации и контроль эффективности гидролиза метилчувствительной рестриктазой) в одной реакции.

**Выводы.** Широкогеномный скрининг дифференциального метилирования ДНК – эффективный способ идентификации диагностически ценных молекулярно-генетических маркеров. Объединение наиболее информативных маркеров в мультиплексные тест-системы в формате ПЦР в реальном времени обеспечивает трансляцию результатов эпигеномного скрининга в практическую лабораторную диагностику.



## РОЛЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ЭКСОСОМ В ПРОГРЕССИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

### THE ROLE OF BLOOD CIRCULATING EXOSOMES IN THE PROGRESSION OF BREAST CANCER

О.С. Тутанов<sup>1</sup>, А.И. Яловая<sup>1</sup>, И.А. Рекеда<sup>2</sup>, Т.А. Штам<sup>3</sup>, Н.В. Юнусова<sup>4</sup>,  
А.Ю. Александрова<sup>5</sup>, С.Н. Тамкович<sup>1</sup>  
E-mail: [s.tamkovich@g.nsu.ru](mailto:s.tamkovich@g.nsu.ru)

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины, СО РАН, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Новосибирский областной клинический онкологический диспансер, г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>Петербургский институт ядерной физики им Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», г. Гатчина, Россия

<sup>4</sup>НИИ онкологии ТНИМЦ, г. Томск, Россия

<sup>5</sup>НИМЦ онкологии им Н.Н. Блохина, г. Москва, Россия

**Введение.** Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее часто диагностируемым видом злокачественного новообразования у женщин (24,5%). Понимание того, как развивается это гетерогенное заболевание и подтверждение механизмов прогрессирования опухоли имеет первостепенное значение. Экзосомы являются везикулами дальнего действия, обеспечивая связь между клетками как в физиологических условиях, так и при патологиях, в частности, РМЖ.

**Материалы и методы.** Экзосомы из плазмы и цельной крови больных РМЖ (n=46) и здоровых женщин (ЗЖ, n=23) получены ультрафильтрацией с последующим ультрацентрифугированием. Природа полученных экзосом подтверждена с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, крио-микроскопии, проточной цитофлуориметрии, трекового анализа. Ангиогенную активность экзосом оценена с помощью методики образования капиллярноподобных структур в эндотелиальных клетках пупочной вены человека на Матригеле (BD BioSciences). Стимуляция клеточной подвижности и способность к адгезии клеток MCF10A (псевдо-нормальные клетки) и SKBR-3 (карцинома МЖ) оценена после добавления экзосом плазмы и суммарной крови ЗЖ и больных РМЖ. Наблюдаемые эффекты регистрировали посредством фотографирования лунок на конфокальном микроскопе Zeiss (Jena, Germany). Белки экзосом идентифицировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Уровень экзосомальных микроРНК оценивали с помощью ПЦР в режиме «реального времени» после проведения обратной транскрипции.

**Результаты.** Показано, что ангиогенный потенциал возрастает в ряду: суммарные экзосомы крови ЗЖ < суммарные экзосомы крови больных РМЖ < экзосомы плазмы больных РМЖ, при этом добавление суммарных экзосом крови ЗЖ к HUVEC ингибирует ангиогенез в системе *in vitro*. Экзосомы плазмы и суммарные экзосомы крови больных РМЖ значительно стимулируют клеточную подвижность: добавление к MCF10A приводит к увеличению количества мигрирующих клеток, а к SKBR-3 к увеличению количества мигрирующих клеток и их скорости. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии с высокой достоверностью ( $p < 0,05$ ) в экзосомах крови ЗЖ и больных РМЖ идентифици-

рованы 111 и 146 белков, соответственно. В регуляцию клеточной подвижности вовлечены 23% и 14% белков экзосом крови ЗЖ и больных РМЖ, соответственно, из них с негативной регуляцией данного процесса ассоциированы только 4 белка (АКТ1, АРОЕ, BARD1 и GDF2), уникальные для экзосом крови ЗЖ. В регуляцию ангиогенеза вовлечено значительно меньше экзосомальных белков – 9% у ЗЖ и 3% у больных РМЖ, а ингибирующие ангиогенез белки выявлены всего по одному в каждом случае (GDF2 и BMP7, соответственно). Выявлено достоверное изменение уровня ангиогенез-ассоциированной miR-24 между фракциями экзосом плазмы и суммарных экзосом крови как в норме ( $p=0,0009$ ), так и при раке молочной железы ( $p=0,0357$ ). Уровень ангиогенез-ассоциированной miR-92 достоверно отличается как в составе экзосом плазмы ( $p=0,0157$ ), так и в составе суммарных экзосом крови ( $p=0,0071$ ) здоровых женщин и первичных больных люминальным Б подтипом рака молочной железы.

**Выводы.** Секретируемые в кровотоки раковыми клетками экзосомы, ассоциированные с форменными элементами, наряду с экзосомами плазмы вовлечены в опухолевый рост и диссеминацию. Выявленные в составе экзосом белки и микроРНК, ассоциированные со стимуляцией клеточной подвижности и ангиогенеза, могут быть в дальнейшем использованы в разработке новых мишеней противоопухолевых препаратов.

*Работа выполнена при поддержке государственного бюджетного проекта РФ через ИХБФМ СО РАН № 121030200173-6 «Диагностика и терапия онкологических заболеваний».*

## ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПРОФИЛЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ СОПРЯЖЕННЫЙ С ПРОГРЕССИЕЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

### TRANSCRIPTOMIC PROFILE OF TUMOR MICROENVIRONMENT ASSOCIATED WITH BREAST CANCER PROGRESSION

Л.А. Таширева, Т.С. Геращенко, В.М. Перельмутер  
E-mail: [tashireva@oncology.tomsk.ru](mailto:tashireva@oncology.tomsk.ru)

*НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск, Россия*

**Введение.** Известно, что опухолевое микроокружение оказывает существенное влияние на биологическое поведение опухоли. Однако, не исследованными остаются транскрипционные паттерны микроокружения одиночных опухолевых клеток, являющихся прогностическим критерием гематогенного метастазирования рака молочной железы.

**Материалы и методы.** В исследование вошло 230 пациентов с диагнозом инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа (ИКНТ), люминальных молекулярно-генетических подтипов, I-IIIА стадии. Материалом для исследования послужил операционный материал. Оценка транскрипционного профиля микроокружения одиночных опухолевых клеток проводилась с использованием лазерной микродиссекции и высокопроизводительного параллельного секвенирования на платформе NextSeq 500 (Illumina, США).

**Результаты.** В микроокружении ООК у больных ИКНТ, имеющих гематогенные метастазы по сравнению с больными, не имеющими таковые, была обнаружена гипоэкспрессия генов *CD52* (в 7 раз), *NUDT3* (в 6 раз), *TAP1* (в 6 раз), *MLH1* (в 6 раз), *DIO2* (в 3 раза) ( $p < 0,001$ ). Генами, гиперэкспрессированными в микроокружении ООК у больных ИКНТ, имеющих гематогенные метастазы по сравнению с больными, не имеющими таковые, являлись *ADAM19* (в 2 раза), *PCDH18* (в 4 раза), *LAMA5* (в 4 раза), *LPCAT1* (в 5 раз), *FLVCR1* (в 5 раз) ( $p < 0,001$ ). Медиана безметастатической выживаемости у больных ИКНТ с низкой экспрессией гена *CD52* составила 78 месяца, в то время как у больных с высокой экспрессией гена *CD52* – 134 мес. ( $p = 0,0021$ ). Медиана безметастатической выживаемости у больных ИКНТ с высокой экспрессией гена *LPCAT1* составила 68 мес., в то время как у больных с низкой экспрессией гена *LPCAT1* – 108 мес. ( $p = 0,026$ ).

**Выводы.** Показано, что микроокружение одиночных опухолевых клеток имеет транскрипционные паттерны, которые могут обуславливать метастатические потенции рака молочной железы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (№19-75-30016).*

## ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ МЕЖДОМЕННОГО ЛИНКЕРА НА БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ СЛИТЫХ С ABD КОНЪЮГАТОВ АФФИБОДИ-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

### EFFECT OF INTER-DOMAIN LINKER COMPOSITION ON BIODISTRIBUTION OF ABD-FUSED AFFIBODY-DRUG CONJUGATES TARGETING HER2

М.С. Третьякова<sup>1,2</sup>, Tianqi Xu<sup>3</sup>, Jie Zhang<sup>4</sup>, Maryam Oroujeni<sup>3,5</sup>, В. Боденко<sup>1</sup>,  
М.В. Белоусов<sup>1,6</sup>, А. Орлова<sup>1,3</sup>, В. Толмачев<sup>1,3</sup>, А. Воробьева<sup>1,3</sup>, Torbjörn Gräslund<sup>4</sup>  
E-mail: [trremar@mail.ru](mailto:trremar@mail.ru)

<sup>1</sup> НИЦ «Онкотераностика», НИ ТПУ, г. Томск, Россия

<sup>2</sup> НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск, Россия

<sup>3</sup> Uppsala University, Uppsala, Sweden

<sup>4</sup> KTH Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

<sup>5</sup> Affibody AB, Solna, Sweden

<sup>6</sup> ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия

**Введение.** Конъюгаты лекарственных средств на основе молекул Affibody, слитых с альбуминсвязывающим доменом (ABD) продемонстрировали мощную противоопухолевую активность в доклинических терапевтических исследованиях. Дальнейшая оптимизация их молекулярной конструкции может усилить цитотоксическое действие на опухоли и свести к минимуму системную токсичность.

**Материалы и методы.** Были получены два конъюгата, содержащие тримерный  $(S_3G)_3$  и  $(G_3S)_3$  линкеры, радиоактивно меченные  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ , и проведено их параллельное сравнение *in vitro* и *in vivo* с исходным конъюгатом ZHER2:2891- $G_4S$ -ABD-mcDM1, содержащий мономерный линкер  $G_4S$ .

**Результаты.** Оба конъюгата с тримерными линкерами имели пониженную аффинность к HER2, мышинному и человеческому сывороточному альбумину *in vitro*, однако не наблюдалось различий в задержке крови у мышей NMRI в течение 24 ч после инъекции. Использование обоих линкеров  $(S_3G)_3$  и  $(G_3S)_3$  снижало поглощение конъюгатов печенью примерно в 1,2 раза по сравнению с использованием линкера  $G_4S$ .

**Выводы.** Длина и состав междоменных линкеров оказывают явное влияние на свойства конъюгатов. Это исследование предполагает, что линкеры  $(S_3G)_3$  и  $(G_3S)_3$  связаны с более низким сродством к HER2 и более слабым цитотоксическим эффектом *in vitro*. В то же время они обеспечивали более низкое поглощение печенью в исследованиях *in vivo*, тем самым снижая гепатотоксичность.

## МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ПРИ АНАЛИЗЕ ЛИПИДОМА, ПРОТЕОМА И МЕТАБОЛОМА МАКРОФАГОВ И МОНОЦИТОВ

### MASS-SPECTROMETRY IN THE ANALYSIS OF LIPIDOME, PROTEOME AND METABOLOME OF MACROPHAGES AND MONOCYTES

В.Е. Франкевич<sup>1,2</sup>, В.В. Чаговец<sup>1</sup>, Н.А. Ломова<sup>1</sup>, А.В. Новоселова<sup>1</sup>

E-mail: [vfrankevich@gmail.com](mailto:vfrankevich@gmail.com)

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, г. Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия

**Введение.** Иммунные клетки, такие как макрофаги и моноциты, перепрограммируют свой метаболизм в ответ на активацию рецепторов распознавания образов. Характеристика метаболома макрофагов и моноцитов, а также секретируемых ими метаболитов в нормальных и патологических условиях имеет решающее значение для понимания врожденной иммунной системы. Профилирование этих метаболомных изменений может быть достигнуто с помощью масс-спектрометрии. Различные масс-спектрометрические методы и подходы могут быть использованы для анализа метаболома макрофагов и моноцитов и их секрета.

**Материалы и методы.** Активированные моноциты и макрофаги *in vitro*, а также их секретом исследовались различными методами масс-спектрометрии высокого разрешения. Для создания методики анализа метаболома в модельных опухолеассоциированных макрофагах и в моноцитах были культивированы колонии моноцитов и макрофагов и на них опробованы различные варианты экстракции липидов и ЖХ-МС анализа полученных экстрактов. Липидные экстракты анализировали на жидкостном хроматографе Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Германия), соединенном с масс-анализатором Maxis Impact qTOF с ЭРИ источником ионов (Bruker Daltonics, Германия).

**Результаты.** Показаны различные масс-спектрометрические методы исследования клеток, такие как Single cell анализ, протеомное и метаболомное профилирование. Создана методика анализа метаболома в модельных опухолеассоциированных макрофагах и в моноцитах пациентов с опухолями различной локализации. Отработана методика определения липидного состава, компонентов метаболизма жирных кислот и митохондриальной активности. В результате работы создан протокол пробоподготовки и анализа макрофагальных лизатов и конденсированной среды для анализа метаболома и определения минимального количества клеток, необходимого для параллельного анализа генома, транскриптома и липидома. Показаны различия в метаболомном профиле модельных опухолеассоциированных макрофагах и моноцитах пациентов с опухолями различной локализации.

**Выводы.** Показано, что макрофаги и моноциты перепрограммируют свой метаболизм в ответ на активацию, что представлено на примере анализа липидного и аминокислотного профиля.

## МЕХАНИЗМЫ ВЫХОДА ИЗ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИМИОПРЕПАРАТОВ

### MECHANISMS OF ESCAPE FROM REPLICATIVE SENESCENCE OF TUMOUR CELLS AFTER EXPOSURE TO CHEMOTHERAPY

И.А. Цыденова<sup>1,2</sup>, М.М. Цыганов<sup>1</sup>, М.К. Ибрагимова<sup>1,2</sup>, А.А. Нуштаева<sup>3</sup>, Н.В. Литвяков<sup>1,2</sup>

E-mail: [tsydenova422@gmail.com](mailto:tsydenova422@gmail.com)

<sup>1</sup>НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск, Россия

<sup>2</sup>НИ ТГУ, г. Томск, Россия

<sup>3</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

**Введение.** При раке молочной железы у 25% больных опухолевые клетки (в том числе микрометастазов) после проведения неoadъювантной химиотерапии выходят из состояния репликативного старения и образуют макрометастазы. Целью данной работы является изучение способности опухолевых клеток к выходу из репликативного старения после воздействия химиопрепаратов в прямом эксперименте на клеточных культурах, различающихся по эктопической активации WNT-сигналинга за счет CNA генов WNT-сигналинга.

**Материалы и методы.** Использовали две линии опухолевых клеток: T47D с высоким уровнем и линию Vt474 с нормальным уровнем активации WNT-сигналинга. Выделение дифференцированных клеточных популяций CD44-/CD24+ проводили с помощью сортера Sony SH800S (Sony Biotechnology, США) При помощи IL6 индуцировали дедифференцировку до опухолевых стволовых клеток (ОСК). Для ингибирования WNT-сигналинга использовали ингибитор ICG-001 (1  $\mu$ M). Динамику роста культуры и формирование сфероидов фиксировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Япония). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения NIS-Elements. Определяли клеточность культур, ареал закрытия дна лунки и наличие маммосфер. Полнотранскриптомный анализ осуществляли на платформе Clarium S Assay.

**Результаты.** После воздействия цисплатина на субпопуляции EpCAM+CD44-CD24-/+ клеток опухолевых линий Vt474 и T47D динамика клеточности культур существенно различается. Полученные данные показывают, что клетки Vt474 с нормальным уровнем WNT-сигналинга не выходят из репликативного старения после воздействия цисплатина, в то время как клетки линии T47D выходят на 14 сутки из репликативного старения и дедифференцируются до ОСК. Совместное воздействие цисплатина и ингибитора привело к тому, что на 21 сутки практически все клетки этой линии погибли, в то время как один ингибитор не препятствовал пролиферации и образованию маммосфер. Действие ингибитора WNT ICG-001 подтверждалось транскриптомным анализом, и экспрессия 122/170 генов WNT-сигналинга оказывается сниженной более чем в 2 раза по сравнению с клетками без воздействия ICG-001.

**Выводы.** Проведенные нами культуральные исследования механистически доказывают, что выход из репликативного старения опухолевых клеток обусловлен эктопической активацией WNT-сигналинга за счет амплификаций активаторов и/или делеций негативных регуляторов генов WNT-сигналинга.

*Работа поддержана Грантом РФФ № 21-15-00243.*

## ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЯ ПОЛИАМИНОВ В МОЧЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ПРЕЭКЛАМПСИИ И СЗРП

### FEATURES OF THE POLYAMINES PROFILE IN URINE AND BLOOD PLASMA IN PRE-ECLAMPSIA AND FGR

В.В. Чаговец, А.В. Новоселова, А.П. Магомедова, Е.В. Титова, Н.А. Ломова  
E-mail: [vvchagovets@gmail.com](mailto:vvchagovets@gmail.com)

ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, г. Москва, Россия

**Введение.** Задержка роста плода (ЗРП), остается одной из ведущих проблем современного акушерства. Анализ эпидемиологических данных показывает, что помимо высокой заболеваемости и смертности в перинатальном периоде, дети с ЗРП входят в группу риска по развитию сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний при достижении ими зрелого возраста. Несмотря на постоянное совершенствование протоколов диагностики и ведения ЗРП, доля маловесных к сроку гестации детей составила 22% в 2012 г. согласно данным Исследовательской группы по эпидемиологии детского здоровья. В связи с этим поиск биомаркеров, отражающих состояние организма матери и плода является актуальным как для разработки новых методов диагностики патологических состояний, так и для изучения механизмов развития ЗРП.

Полиамины необходимы для выживания, роста и развития эмбриона и плода. Кроме того, полиамины могут вызывать аутофагию в клетках млекопитающих. Настоящее исследование было проведено для оценки изменений концентрации полиаминов у беременных с ЗРП по сравнению с группой пациентов с нормально протекающей беременностью и с преэклампсией, которая зачастую сопровождается ЗРП.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 73 беременных, которые поступили и были родоразрешены в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Группы преэклампсии и ЗРП составили 22 и 30 пациенток с подтвержденными соответствующими диагнозами; контрольную группу составила 21 соматически здоровая женщина с беременностью без осложнений.

Для анализа содержания спермина, путресцина, этилендиамина, 1,3-диаминопропана, кадаверина, 1,7-диаминогептана, 1,6-диаминогексана, N-ацетилпутресцина, N1-ацетилспермина и спермидина был разработан метод, включающий дериватизацию дансилхлоридом и последующую жидкостную обращенно-фазовую хроматографию с детекцией на масс-спектрометре с тройным квадруполом.

**Результаты.** В результате исследования было обнаружено, что статистически значимо отличается концентрация спермидина между группами норма-преэклампсия и норма-ЗРП, а также N-ацетилпутресцина между группами норма-преэклампсия. Полученные данные были использованы для создания моделей логистической регрессии, позволяющих отличить образцы пациентов исследуемых групп. В модели логистической регрессии в качестве независимых переменных вошли путресцин, 1,6-диаминогексан, N-ацетилпутресцин, спермидин и этилендиамин.

**Выводы.** Показано, что профиль полиаминов в моче и плазме крови отличается при преэклампсии и ЗРП, что позволяет предположить их заметную роль в рассматриваемых патологиях и возможность создания диагностической панели на их основе.

*Работа выполнена при поддержке РНФ (соглашение № 22-15-00232 от 13 мая 2022 г.).*

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ МАЛИГНИЗАЦИИ: ПОИСК НОВЫХ МАРКЕРОВ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ

### CANCER GENETICS: SEARCH FOR NOVEL MARKERS AND THERAPEUTIC TARGETS

Н.В. Чердынцева<sup>1,2,3</sup>, П.А. Гервас<sup>1</sup>, Е.Э. Иванюк<sup>1</sup>, А.А. Иванова<sup>1</sup>, А.Ю. Молоков<sup>1,2</sup>,  
А.А. Пономарева<sup>1</sup>, Н.Е. Ермак<sup>1</sup>, М.А. Булдаков<sup>1</sup>  
e-mail: [nvch@tnimc.ru](mailto:nvch@tnimc.ru)

<sup>1</sup>НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск, Россия

<sup>2</sup>НИ ТГУ, г. Томск, Россия

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск, Россия

Еще в 2001 г. D. Hanahan и R. Weinberg описали ключевые характеристики опухолей, приводящие к прогрессии, дополненные недавно свойством пластичности клеток опухоли и эпигеномным регулированием. В последней редакции статьи «Маркеры рака» D. Hanahan, обозначает процессы, способствующие приобретению признаков злокачественной опухоли: нестабильность генома и воспаление в микроокружении. Нестабильность и мутации генома (ДНК) являются фундаментальным компонентом патогенеза рака. Ответ на повреждение ДНК (DNA DamageResponse, DDR) кодируют многочисленные гены, взаимодействующие с системами контроля клеточного цикла и апоптоза. Нарушение ответа на повреждения ДНК (DDR) приводит к геномной нестабильности, обуславливает клональную эволюцию, путем аккумуляции драйверных aberrаций (CNA, перестройки, мутации), малигнизацию и прогрессию.

В то же время противоопухолевая терапия основана на том, что геномная нестабильность делает клетки опухоли более чувствительными к повреждению ДНК специфическими агентами. Существует взаимосвязь между дефицитом системы репарации ДНК и действием агентов, нацеленных на ДНК, репарация повреждений с двухцепочечным разрывом (DSB) становится невозможной, и реализуется гибель клеток опухоли.

Наследственные раковые синдромы ассоциированы с мутациями в генах репарации, повреждающими их функции. Высокопроизводительное секвенирование для идентификации мутаций вовлекает кодирующие регионы и экзон/интрон участки, тогда как нарушения в некодирующих регионах не учитываются. Патогенность мутации, то есть ее способность нарушать работу DDR, не всегда можно установить, и это может приводить к ошибкам диагностики и лечения, что ставит вопрос оценки клинической значимости мутаций, связанной с этнической (расовой) специфичностью их спектра (BradleyDowns, SanMingWang, J. cancergen.2021; Гервас П.А. и др. 2018–2022). Врожденные патогенные варианты BRCA1 и BRCA2 генов объясняют феномен наследственных случаев рака – РМЖ и РЯ, при этом наличие таких повреждений генов DDR позволило разработать терапевтический подход с использованием ингибиторов ферментов поли (АДФ-рибозо) полимеразы (PARP), которые играют ключевую роль в активации механизмов репарации. Сочетание функционального генетического дефекта в гене гомологичной репарации, и фармакологическое ингибирование компенсаторного DDR-пути компонента, такого как PARP, приводит к непреодолимой нестабильности генома, митотической катастрофе и гибели клеток. Клинические исследования показали очевидную выгоду использования такого подхода для пациентов. Маркерами назначения такой терапии служит наличие врожденной мутации в генах репарации. Терапевтический ландшафт противоопухолевых агентов, нацеленных на DDR, растет за счет



включения ингибиторов других ключевых медиаторов репарации и репликации ДНК, таких как ATM, ATR, CHK1 и CHK2, DNA-PK и WEE1.

Эпигенетическая регуляция – модификация ДНК, которая изменяет структуру хроматина и экспрессию генов без изменения нуклеотидной последовательности, ключевой фактор малигнизации и прогрессии злокачественных опухолей. Эпигенетические модификации ДНК и гистонов обратимо регулируют транскрипцию. Паттерны aberrантного метилирования связаны с частыми мутациями в генах, регулирующих метилирование ДНК. Все это способствует онкогенезу. Гипометилирование ведет к активации онкогенов, способствует пролиферации и инвазии рака молочной железы (Shin JI, NatRevClinOncol, 2014, 110). Препараты, воздействующие на регуляцию эпигеномных изменений, способны повышать экспрессию генов, выключенных при гиперметилировании. Они не оказывают прямого повреждающего действия на опухолевые клетки, но воздействуют на микроокружение, иммунную систему, повышают экспрессию антигенов и их презентацию иммунным клеткам, инициируя адаптивный иммунный ответ. Сегодня одним из направлений терапии является модификация элементов микроокружения для противоопухолевого эффекта (Kok-Tingetal. Molecular Therapy. 2021; 29: 5). Можно ожидать, что немутационное эпигенетическое перепрограммирование интегрально участвует в формировании фенотипической пластичности (D. Hanahan, HallmarksofCancer: new dimension. Cancer Discov. 2022 Jan;12(1):31–46.).

Агенты, нацеленные на ДНК, имеют реальные перспективы в терапии рака в сочетании с таргетной терапией и иммунотерапией. Для оптимизации и улучшения результатов лечения актуальным является:

- изучение механизмов действия разнообразных агентов, нацеленных на ДНК;
- модуляция путей репарации ДНК для повышения эффективности ДНК-повреждающих препаратов;
- разработка прогностических биомаркеров, в том числе с учетом этнических особенностей врожденных мутаций, ассоциированных с наследственным РМЖ/РЯ;
- оценка механизмов, лежащих в основе предсуществующей и приобретенной резистентности;
- создание рациональных, переносимых комбинаций со стандартом лечения (химиотерапия и лучевая);
- новые молекулярно-направленные агенты и ингибиторы иммунных контрольных точек;
- оптимизация лечения путем сочетания различных модальностей терапии;
- поиск клеток семян, ответственных за отдаленное метастазирование и идентификация молекулярных мишеней для терапии.

Мы показали, что циркулирующие опухолевые клетки у больных раком молочной железы представлены несколькими субпопуляциями с разными фенотипами и генетическими особенностями. Эти данные послужат основой для создания панели маркеров для назначения мультиадресной молекулярно-направленной терапии.

*Работа поддержана грантом Российского научного фонда №19-75-30016.*

## РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ, ВОЗДЕЙСТВУЮЩИХ НА ОПУХОЛЕВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

### RECOMBINANT ANTIBODIES DISCOVERY FOR TUMOR MICROENVIRONMENT TARGETING: CURRENT STATUS AND FUTURE PROMISES

Д.О. Чернышова, М.Э. Березкина, А.И. Антонова, А.Д. Азарян, А.К. Мисорин,  
М.С. Карбышев

E-mail: [chernyshovado@biocad.ru](mailto:chernyshovado@biocad.ru)

АО Биокэд, г. Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Создание рекомбинантных антител – одно из наиболее перспективных современных направлений в области развития новых подходов к терапии онкологических заболеваний. Однако молекулы, показывающие высокую эффективность в *in vitro* и *in vivo* исследованиях, зачастую не демонстрируют терапевтической рентабельности на этапе клинической разработки. Гетерогенность опухолей, комплексные механизмы защиты злокачественных клеток от иммунитета и сложная структура опухолевого микроокружения являются одними из ключевых факторов развития резистентности к иммунотерапии. Изучение опухолевого микроокружения – новая ступень в терапии онкологических заболеваний, играющая важную роль в развитии инновационных подходов лечения.

**Материалы и методы.** Мета-анализ проводили с использованием следующих баз данных: Tabs, GlobalData, Cortellis, PubMed и др., жёсткие критерии отбора позволили сформировать список мишеней, перспективных для дальнейшей разработки.

**Результаты.** Проведен анализ актуальных направлений исследований в области терапии онкологических заболеваний на предмет создания *ab initio* препаратов, направленных на специфический таргетинг клеток опухолевого микроокружения, составлен список приоритетных мишеней для разработки иммунотерапевтических препаратов, на примере проектов АО BIOCAD рассмотрены некоторые проблемы разработки *in vitro* и *ex vivo* моделей для оценки эффективности исследуемых молекул.

**Выводы.** По результатам мета-анализа показано, что несмотря на наличие отрицательных результатов на стадии клинических исследований, создание препаратов рекомбинантных антител для воздействия на опухолевое микроокружение является перспективным направлением развития терапевтической стратегии.

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩИХ PD-L1

### BIOLOGICAL MODEL FOR TESTING PHARMACEUTICALS AGAINST PD-L1

О.А. Шашкова<sup>1</sup>, И.С. Малахов<sup>1</sup>, Л.А. Терехина<sup>1</sup>, К.О. Авров<sup>1</sup>, А.А. Пиневиц<sup>1,2</sup>,  
Н.Л. Вартамян<sup>1</sup>, И.Ю. Крутецкая<sup>1</sup>, М.А. Берлина<sup>1</sup>, А.А. Крылова<sup>1</sup>, С.В. Федоренко<sup>1</sup>,  
М.П. Самойлович<sup>1,2</sup>

E-mail: [ujinolga@yandex.ru](mailto:ujinolga@yandex.ru)

<sup>1</sup>ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени акад. А.М. Гранова», г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Доклиническую оценку таргетных препаратов, как правило, проводят на иммунодефицитных мышах, которым прививают клетки человека, экспрессирующие биомаркеры-мишени. Эта модель дорогостоящая, требует специальных условий содержания и методов работы. Альтернативой животным с глубоким природным иммунодефицитом могут стать конвенциональные лабораторные животные, которым прививают видоспецифичные для них клетки, экспрессирующие биомаркеры человека. Развитие иммунного ответа против чужеродного биомаркера возможно подавить с помощью иммуносупрессивных препаратов или сублетального облучения. Такая временная иммуносупрессия не требует изменения условий содержания животных. В качестве биомаркера для разработки модели был выбран PD-L1, рассматриваемый в качестве одной из основных мишеней при создании препаратов, реактивирующих противоопухолевый иммунный ответ.

**Материалы и методы.** Рекомбинантные клетки мыши СТ26 (аденокарцинома кишечника мышей BALB/c), стабильно продуцирующие на мембране PD-L1 человека, получали методом ретровирусной трансдукции. Экспрессию PD-L1 человека на клетках выявляли методом проточной цитофлуориметрии. Уровень экспрессии гена *PD-L1* оценивали методом ПЦР в реальном времени. Клетки прививали сублетально облученным мышам F1(DBA×BALB/c) подкожно в количестве 1,5–5 млн клеток на животное.

**Результаты.** Создан штамм рекомбинантных клеток мыши, в котором 99,8% клеток несут на мембране PD-L1 человека. Уровень экспрессии *PD-L1* в рекомбинантных клетках находится на уровне активности гена домашнего хозяйства – *GAPDH*. У сублетально облученных мышей на 7–13 сутки после введения эти клетки формируют пальпируемые новообразования. Через 2 недели после прививки более 40% клеток опухолевого узла экспрессируют PD-L1 человека, при этом популяция клеток опухоли гетерогенна по плотности молекул на мембранах.

**Выводы.** Разработана биологическая модель для доклинического исследования в условиях конвенционального вивария препаратов, специфически связывающих PD-L1 человека.

*Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава РФ.*

## ПРОТЕОМ ЭКЗОСОМ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАК ИСТОЧНИК БИОМАРКЕРОВ

### BREAST CANCER EXOSOME PROTEOME AS A SOURCE OF BIOMARKERS

А.А. Шефер<sup>1,2</sup>, Л.В. Яньшолё<sup>3</sup>, А.Е. Григорьева<sup>1</sup>, С.Н. Тамкович<sup>1,2</sup>

E-mail: [a.shefer@g.nsu.ru](mailto:a.shefer@g.nsu.ru)

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, Россия

<sup>3</sup>Институт «Международный Томографический Центр» СО РАН, г. Новосибирск, Россия

**Введение.** Экзосомы представляют собой внеклеточные везикулы диаметром 30–150 нм, несущие на своей мембране тетраспанины CD9, CD63, CD81. Экзосомы секретируются всеми клетками организма, при патологических состояниях в биологических жидкостях возрастает их концентрация и изменяется состав.

**Материалы и методы.** Для идентификации в составе экзосом опухолеассоциированных белков были получены экзосомы клеточных линий HBL-100 (псевдо-нормальные эпителиоциты молочной железы), MCF-7 (люминальный А подтип карциномы молочной железы) и BT-549 (трижды негативный подтип карциномы молочной железы). Экзосомы клеточных линий были охарактеризованы трансмиссионной электронной и крио-микроскопией, трековым анализом и проточной цитофлуориметрией.

**Результаты.** Показано, что линии карциномы молочной железы MCF-7 и BT-549 секретируют в 7 и 4 раза больше экзосом, чем линия псевдо-нормальных эпителиоцитов, соответственно. Методом MALDI-TOF масс спектрометрии с высокой достоверностью идентифицирован 301 белок экзосом, из них, согласно базе данных Vesiclepedia, 32% впервые выявлены в составе экзосом. Сравнительный протеомный анализ идентифицированных белков экзосом выявил 26 белков, универсальных для всех клеточных линий эпителиоцитов и 8 белков, общих для линий карциномы молочной железы MCF-7 и BT-549. Методом сравнительного протеомного анализа выявлена тенденция к снижению содержания в составе экзосом внеклеточных белков и белков плазматической мембраны с увеличением агрессивности клеток, значительное повышение содержания белков с ДНК-связывающей функцией и вовлеченных в метаболизм белков в экзосомах опухолевых клеток MCF-7 и BT-549 по сравнению линией псевдо-нормальных эпителиоцитов HBL-100. Детальный анализ идентифицированных экзосомальных белков выявил большое количество белков с онкогенным потенциалом в культуре BT-549, также выявлены различия между молекулярными функциями белков экзосом, ответственных за метастатический потенциал в культурах MCF-7 и BT-549.

**Выводы.** Выявлены различия в белковом составе экзосом, секретируемых псевдо-нормальными и опухолевыми клетками, а также между экзосомами, секретируемыми опухолевыми клетками с различным метастатическим потенциалом.

*Исследование поддержано российским государственным бюджетным проектом ИХБФМ СО РАН № 121030200173-6 «Диагностика и терапия онкологических заболеваний».*

## МУТАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ОПУХОЛЕЙ НЕВЫЯВЛЕННОЙ ПЕРВИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

### MUTATIONAL PROFILE OF CANCER OF UNKNOWN PRIMARY

А.А. Щеголева, Р.С. Воробьев, Е.В. Денисов

E-mail: [shegolmay@gmail.com](mailto:shegolmay@gmail.com)

*НИИ онкологии Томского НИМЦ РАН, г. Томск, Россия*

**Введение.** Опухоли невыявленной первичной локализации (ОНПЛ) представляют собой метастатические очаги, для которых стандартное диагностическое исследование не позволяет определить первичный опухолевый очаг на момент постановки диагноза. Хотя частота выявления ОНПЛ не является высокой, данное заболевание характеризуется высокой агрессивностью и низкой эффективностью лечения, и значительное число больных имеют низкую выживаемость. Поэтому понимание биологии и механизмов формирования данного типа злокачественных новообразований является важной задачей.

Механизмы возникновения ОНПЛ до сих пор неизвестны. Одной из причин возникновения ОНПЛ могут быть нарушения в генах-регуляторах клеточной миграции, в частности эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Предполагается, что появление мутаций в данных генах приводит к фиксации клеток в состоянии гибридного ЭМП и приобретения ими способности к инвазии и метастазированию. Соответственно, исследование мутационного ландшафта ОНПЛ актуально и может пролить свет не только на природу данного типа злокачественных новообразований, но и выявить новые гены-регуляторы миграции и инвазии опухолевых клеток. Целью настоящего исследования было изучение мутационного профиля ОНПЛ и идентификация специфических генетических нарушений.

**Материалы и методы.** В исследование включены 7 пациентов с ОНПЛ на момент диагностики. Выделение ДНК из образцов ОНПЛ проводилось с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США). Полученные образцы ДНК (n=7) использовали для подготовки экзомных библиотек с помощью набора SureSelect XT v. 7.0 (Agilent, США) и последующего секвенирования на платформе NextSeq 2000 (Illumina, США). Биоинформатический анализ данных проводился с помощью инструментов GATK и ANNOVAR. Для поиска генов-драйверов канцерогенеза использовался инструмент

IntOGen. Для детекции aberrаций числа копий ДНК использовался инструмент CNVkit.

**Результаты.** В ОНПЛ обнаружены однонуклеотидные изменения и нарушения по типу инсерций и делеций в ранее описанных генах-драйверах развития различных онкологических заболеваний. Помимо этого, для ОНПЛ характерны aberrации числа копий ДНК в различных хромосомных регионах. Функциональное аннотирование мутированных генов показало вовлеченность большего их числа в клеточную адгезию, ремоделирование актинового цитоскелета, формирование ламеллиподий и филоподий, ЭМП и регуляцию аутофагии.

**Выводы.** ОНПЛ несут нарушения, которые затрагивают гены-регуляторы клеточной миграции и инвазии.

## ИССЛЕДОВАНИЕ НАТИВНОЙ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ИММУННЫХ КЛЕТОК В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО МАРКЕРА РЕАКТИВНОСТИ ПРОТИВ ОПУХОЛИ

### INVESTIGATION OF NATIVE AUTOFLUORESCENCE OF IMMUNE CELLS AS A POTENTIAL MARKER OF REACTIVITY AGAINST TUMOR

Д.В. Южакова<sup>1</sup>, А.В. Изосимова<sup>1,2</sup>, А.М. Можеров<sup>1</sup>, Е.В. Загайнова<sup>2</sup>

E-mail: [yuzhakova-diana@mail.ru](mailto:yuzhakova-diana@mail.ru)

<sup>1</sup>ПИМУ Минздрава России, г. Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup>ННГУ им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород, Россия

**Введение.** Метаболические пути, используемые Т-лимфоцитами, играют ключевую роль в иммунном ответе на опухоль. Инновационной платформой для оценки метаболического статуса клетки является время-разрешенный автофлуоресцентный имиджинг (FLIM) метаболических коферментов.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на мышах линии C57Bl/6 FoxP3-EGFP с подкожно привитой меланомой B16F0 вблизи пахового лимфоузла. Визуализацию свежих срезов лимфоузлов проводили на конфокальном микроскопе LSM 880 (Carl Zeiss, Германия) с FLIM приставкой TCSPC (Becker & Hickl, Германия) в канале кофермента никотинамидадениндинуклеотид (фосфата) НАД(Ф)Н (ex. 375 нм, em. 435–485 нм).

**Результаты.** Разработан оригинальный способ визуализации нативной автофлуоресценции иммунных клеток, приготовление срезов свежесыведенных лимфоузлов толщиной около 1 мм, помещение на чашку FluoroDish (WPI) со стеклянным дном и фиксация салфеткой, смоченной физиологическим раствором.

Методом FLIM в канале НАД(Ф)Н продемонстрировано увеличение процентного вклада короткой (свободной) компоненты НАД(Ф)Н ( $a_1$ ) при развитии опухоли (76.6% против 69,4% у здоровых мышей), что может быть ассоциировано со сдвигом в сторону гликолитического метаболизма для обеспечения повышенных потребностей антиген-активированных Т-клеток. Данные проточной цитометрии подтверждают повышение уровня экспрессии активационного маркера CD<sup>25+</sup>. Кроме того, отмечено значимое удлинение времен жизни свободной ( $t_1$ ) (0,56 против 0,45 нс) и связанной ( $t_2$ ) (3,24 против 2,35) компонент под влиянием опухоли. Это может быть обусловлено рядом причин, включая связывание НАДН с лактатдегидрогеназой и усиление пентозофосфатного пути для обеспечения высокой пролиферативной активности, что согласуется данными по анализу экспрессии маркера пролиферации Ki67.

**Выводы.** Таким образом, нативная автофлуоресценция иммунных клеток может быть надежным маркером иммунного ответа на опухоль. Будущие исследования будут направлены на оценку автофлуоресценции в качестве показателя эффективности иммунотерапии.

*Работа поддержана грантом РНФ № 21-74-00101.*

## МИКРОРНК КАК ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ БИОМАРКЕРЫ МЕЗИАЛЬНОЙ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ (ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

### MICRORNA – AS CIRCULATED BIOMARKERS FOR MESIAL TEMPORAL EPILEPSY (PILOT STUDY)

К.Д. Яковлева<sup>1</sup>, А.А. Усольцева<sup>1</sup>, Е.А. Доморацкая<sup>1</sup>, Д.В. Дмитренко<sup>1</sup>  
E-mail: [kris\\_995@mail.ru](mailto:kris_995@mail.ru)

*ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, г. Красноярск, Россия*

**Введение.** Височная эпилепсия (ВЭ) является одной из наиболее часто встречающихся форм фокальной эпилепсии у взрослых. В настоящее время активно проводится поиск неинвазивных биомаркёров эпилепсии с участием микроРНК.

**Цель:** исследовать экспрессию микроРНК-134 и микроРНК-106b в качестве нового неинвазивного диагностического биомаркёра мезиальной височной эпилепсии и ее связь с клиническими особенностями течения заболевания.

**Материалы и методы.** В исследование включено 45 человек: основная группа (пациенты с мезиальной ВЭ) – 19 человек, медиана возраста 29 лет; группа контроля – 26 человек, медиана возраста 26,5 лет. Проведено ранжирование пациентов в зависимости от длительности заболевания, количества применяемых противоэпилептических препаратов (ПЭП), ответа на фармакотерапию эпилепсии.

Выделение циркулирующих микроРНК из плазмы крови проводилось сорбционным методом, анализ экспрессии микроРНК производился методом ПЦР в режиме реального времени. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакета программ Statistica 10.0, SPSS 23.0 и приложения MS Excel for Windows.

**Результаты.** Экспрессия микроРНК-134 (представлена в виде: средняя экспрессия  $\pm$  SD) снижена у пациентов с мезиальной ВЭ и составила  $0,056786001 \pm 0,014980127$  против  $0,016676 \pm 0,015736$  в группе контроля (U0,05-тест,  $p < 0,01$  (0,00221)). ROC анализ кривой микроРНК-134 показал высокую чувствительность и специфичность с  $AUC=0,797$ . Полученная модель была статистически значимой ( $p=0,0001$ ).

Экспрессия микроРНК-106b повышена у пациентов мезиальной ВЭ и составила  $7,663171672 \pm 2,386535476$  против  $0,016676 \pm 0,015736$  в группе контроля (U0,05-тест,  $p < 0,01$  (0,00221)). ROC анализ кривой микроРНК-106b с  $AUC=0,68$ . Полученная модель была статистически не значимой ( $p=0,164$ ).

Статистически значимого изменения уровней микроРНК-134/106b в группе с фармакорезистентной мезиальной ВЭ и лекарственно-чувствительной формой ( $p=0,19/0,38$ ), склерозом гиппокампа и без ( $p=0,08/0,59$ ) не зарегистрировано.

**Выводы.** Экспрессия микроРНК-134 в плазме крови у пациентов с мезиальной ВЭ снижена, результаты ROC анализа свидетельствуют о высокой чувствительности и специфичности данного биомаркера для диагностики заболевания.

Научное издание

I международная конференция

# **ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ТРАНСЛЯЦИОННОЙ БИОМЕДИЦИНЕ**

5–7 сентября 2022 г.  
г. Томск

**СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ**

Издательство СибГМУ  
634050, г. Томск, пр. Ленина, 107  
тел. +7 (3822) 901–101, доб. 1760  
E-mail: [otd.redaktor@ssmu.ru](mailto:otd.redaktor@ssmu.ru)

Электронное издание