



ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

**Материалы
конференции**

**2–5 июля 2019 г.
Республика Алтай, г. Горно-Алтайск**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
«РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО КЛИНИЧЕСКОЙ ОНКОЛОГИИ»
ФГБУ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ОНКОЛОГИИ ИМ. Н. Н. БЛОХИНА
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СО РАН
АССОЦИАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ И ОРГАНИЗАЦИЙ ЛАБОРАТОРНОЙ СЛУЖБЫ
«ФЕДЕРАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Материалы конференции

Республика Алтай, г. Горно-Алтайск,
2–5 июля 2019 г.

Новосибирск
2019

УДК 616-006
ББК Р56я431
О 628

Редакционная коллегия:

д-р мед. наук, проф. А. А. Меружанович, И. В. Вихлянов,
д-р хим. наук, проф., акад. РАН В. В. Власов, канд. мед. наук В. Н. Гриневич,
д-р мед. наук М. А. Годков, д-р биол. наук Л. Ф. Гуляева,
канд. мед. наук И. А. Демидова, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН Е. Н. Имянитов,
д-р биол. наук, проф. М. А. Красильников, канд. биол. наук А. В. Кудрявцева,
д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН Н. Е. Кушлинский, д-р биол. наук Н. В. Литвяков,
д-р мед. наук Г. А. Раскин, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН И. С. Стилиди,
д-р мед. наук, проф. С. А. Тюлядин, канд. биол. наук М. Л. Филипенко,
Ph.D. A. Kel, Director of Research L. Milanese, Univ.-Prof. J. Borlak

О 628 Опухолевые маркеры: молекулярно-генетические и клинические аспекты : материалы конф. (2–5 июля 2019 г., Республика Алтай, г. Горно-Алтайск) / RUSSCO ; ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина ; Министерство здравоохранения РФ ; ИХБФМ СО РАН ; Ассоц. спец. и орг. лаб. службы «Федерация лабораторной медицины». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2019. — 74 с.

ISBN 978-5-4437-0931-4

Целью конференции является обзор современных трендов в онкодиагностике, а также формирование научно-практического сотрудничества ученых, работающих в области фундаментальной онкологии, и клинических врачей.

Основными научными направлениями конференции являются «жидкостная биопсия», генетика онкологических заболеваний, биомаркеры в таргетной терапии, персонализированная онкология, NGS в клинической практике, маркеры чувствительности к иммунотерапии, биологические маркеры в клинической диагностике онкологических заболеваний, клинические аспекты использования опухолевых маркеров, фундаментальные аспекты диагностики опухолей.

**УДК 616-006
ББК Р56я431**

ISBN 978-5-4437-0931-4

© RUSSCO, 2019
© ФГБУ НМИЦ онкологии
им. Н. Н. Блохина МЗ РФ, 2019
© Министерство здравоохранения РФ, 2019
© ИХБФМ СО РАН, 2019
© Ассоц. спец. и орг. лаб. службы
«Федерация лабораторной медицины», 2019

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

УДК 616-006.66

ЦИТОХИМИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ НЕЙТРОФИЛОВ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

CYTOCHEMICAL PROFILE OF CIRCULATING BLOOD NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

Т. В. Абакумова, И. И. Антонеева, Н. С. Хирдина, Ю. М. Лазарева

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия

T. V. Abakumova, I. I. Antoneeva, N. S. Khirdina, Yu. M. Lazareva

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

e-mail: taty-abakumova@yandex.ru

Оценено отношение нейтрофилов к лимфоцитам, изменение активности внутриклеточных ферментов полиморфноядерных нейтрофилов в периферической крови на разных стадиях колоректального рака. Это может быть использовано в качестве дополнительного диагностического маркера при подозрении на колоректальный рак.

Ключевые слова: нейтрофилы, колоректальный рак

The ratio of neutrophils to lymphocytes, changes in the activity of intracellular enzymes of polymorphonuclear neutrophils in peripheral blood at different stages of colorectal cancer were evaluated. This can be used as an additional diagnostic marker for suspected colorectal cancer.

Keywords: neutrophils, colorectal cancer

Считается установленной связь колоректального рака (КРР) с колитом [1]. При этом нейтрофильные полиморфноядерные лейкоциты (Нф) активно участвуют в механизмах воспаления и регенерации кишечной стенки [2]. Единичные исследования, авторы которых оценивали цитохимический статус Нф, свидетельствуют об активации и последующей нормализации их функционально метаболической активности в фазы обострения и ремиссии воспалительного заболевания кишечника [3]. КРР является одной из наиболее распространенных причин смертности от рака во всем мире [4]. Отмечено, что в реакции иммунной системы на первичный КРР вовлечены в основном CD8⁺-лимфоциты, НК, ассоциированные с опухолью макрофаги, нейтрофилы [5]. Показано, что опухольассоциированные полиморфноядерные лейкоциты (ТАН) праймированы и инициируют мутации в эпителиальных клетках толстой кишки, что приводит к микросателлитной нестабильности [1]. Однако оценка морфофункционального статуса ТАН технически крайне сложна и практически невозможна на начальных стадиях канцерогенеза. В соответствии с вышеизложенным целью исследования была оценка цитохимического профиля Нф у больных КРР.

Материал и методы. Объектом исследования послужили Нф периферической крови 17 больных колоректальным раком II (Т3N0M0), III (Т3N1M0) и IV стадии (Т4N0-1M₀₋₂). Средний возраст составил 61,5±2,3 лет. Первичная опухоль локализовалась в правом фланге у

6 пациентов (35,3 %), левом фланге — у 11 (64,7 %). Морфологически у всех пациентов верифицирована аденокарцинома различной степени дифференцировки. Первичная опухоль в стадии Т3 была верифицирована у 11 (64,7 %) пациентов, Т4 — у 6 (35,3 %) пациентов соответственно. Контрольную группу составили практически здоровые пациенты ($n = 25$) в возрасте 22–45 лет. Нейтрофилы выделяли из лейкоцитарной взвеси на двойном градиенте плотности стерильных растворов фиколла-урографина ($\rho = 1,117$ и $1,077$ г/мл). Оценивали общее количество лейкоцитов (Le), абсолютное количество Нф и лимфоцитов (Лф), отношение Нф к Лф (NLR), способность Нф генерировать АФК в реакции восстановления нитросинего тетразолия (спонтанный и индуцированный НСТ-тест) [6]. Микробицидную активность оценивали и по уровню активности миелопероксидазы (метод Грэхема — Кнолля) и катионных белков по М. Г. Шубичу [7]. Результаты выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (СЦК). Связь между параметрами анализировали с использованием критерия Манна — Уитни ($p \leq 0,05$).

Результаты исследования. В результате проведенных исследований нами установлено значимое увеличение общего количества лейкоцитов, Нф и лимфоцитов, а также NLR при КРР по сравнению с контролем (см. таблицу).

Показатели лейкоцитов периферической крови у больных КРР на различных стадиях заболевания

Группа Показатель	Контроль $n = 25$	II стадия $n = 6$	III стадия $n = 6$	IV стадия $n = 5$
Le $\times 10^9/\text{л}$	6,54 $\pm$ 0,32	9,55 $\pm$ 1,64 $p_1 = 0,0499$	9,27 $\pm$ 1,00 $p_1 = 0,0103$, $p_2 = 1,000$	10,48 $\pm$ 0,48 $p_1 = 0,0102$, $p_3 = 0,1907$
Нф $\times 10^9/\text{л}$	3,78 $\pm$ 0,020	8,06 $\pm$ 1,77 $p_1 = 0,0046$	7,28 $\pm$ 0,85 $p_1 = 0,0018$, $p_2 = 0,7533$	8,44 $\pm$ 0,53 $p_1 = 0,0102$, $p_3 = 0,1982$
Лф $\times 10^9/\text{л}$	1,97 $\pm$ 0,12	1,5 $\pm$ 0,11 $p_1 = 0,0184$	1,72 $\pm$ 0,08 $p_1 = 0,1388$, $p_2 = 0,1639$	1,33 $\pm$ 0,09 $p_1 = 0,0018$, $p_3 = 0,0089$
NLR	2,06 $\pm$ 0,19	5,57 $\pm$ 1,27 $p_1 = 0,0054$	4,21 $\pm$ 0,38 $p_1 = 0,0034$, $p_2 = 0,7540$	6,42 $\pm$ 0,74 $p_1 = 0,0019$, $p_3 = 0,0169$

Примечание: p_1 — данные статистически значимо отличаются от аналогичных в контрольной группе;

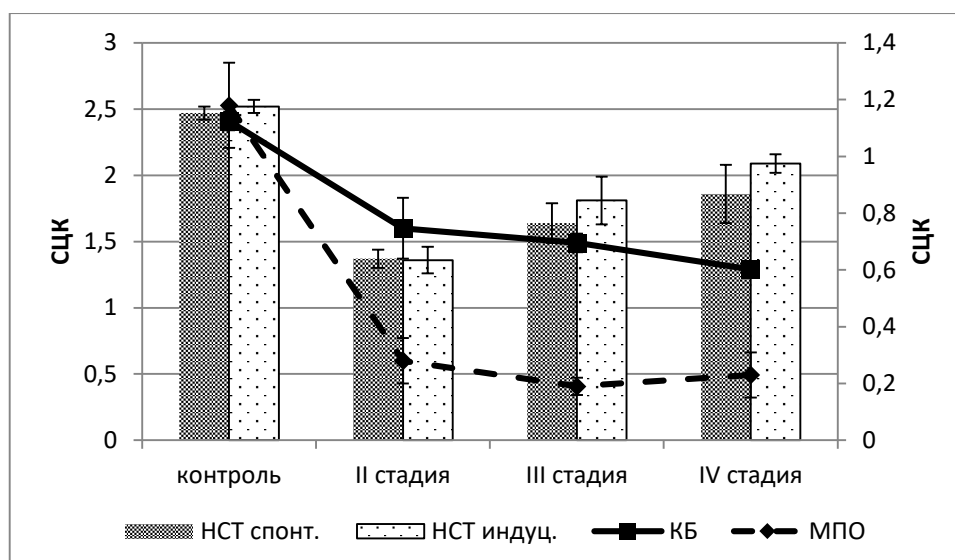
p_2 — данные статистически значимо отличаются от аналогичных при КРР II стадии;

p_3 — данные статистически значимо отличаются от аналогичных при КРР III стадии.

Результаты оценки цитохимического статуса Нф больных КРР представлены на рисунке. Уровень КБ, активность МПО, спонтанного и активированного тестов НСТ были значимо снижены в Нф больных с КРР по сравнению с контролем.

Обсуждение. Согласно данным литературы, увеличение количества периферических Нф и NLR связано с плохими клиническими исходами при КРР [8,9]. При этом Нф у больных КРР имеют значимо сниженные показатели кислородзависимой и кислороднезависимой бактерицидности. Возможно, усиленная продукция таких неполноценных Нф может объясняться влиянием опухоли на нейтрофилогенез.

Заключение. Снижение показателей активности МПО, уровня КБ и активности в НСТ-тесте на фоне значимо повышенного общего количества Нф может быть использовано в качестве дополнительного диагностического маркера при подозрении на КРР.



Изменение активности периферических нейтрофилов при прогрессировании КРР

Список литературы

1. Granofszky N., Lang M., Khare V. et al. Identification of PMN-released mutagenic factors in a co-culture model for colitis-associated cancer // *Carcinogenesis*. 2018. Vol. 39(2). P. 146–157. doi: 10.1093/carcin/bgx118.
2. Sprenger R., Sagmeister M., Offner F. Acute ulcerative colitis during successful interferon/ribavirin treatment for chronic hepatitis // *Gut*. 2005. Vol. 54(3). P. 438–439.
3. Ключникова О. А. Функциональная активность нейтрофилов периферической крови и воспалительная реакция в слизистой оболочке у больных язвенным колитом : тезисы докладов X итоговой науч. конф. молодых ученых и студентов. Ставрополь, 2002. С. 204.
4. Jemal A., Ward E. M., Johnson C. J. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2014, Featuring Survival // *J. Natl. Cancer Inst.* 2017. Vol. 109. P. 1–22. doi: 10.1093/jnci/djx030.
5. De Vries N. L., Swets M., Vahrmeijer A. L. et al. The immunogenicity of colorectal cancer in relation to tumor development and treatment // *Int J Mol Sci*. 2016. Vol. 17(7). P. 1030. doi:10.3390/ijms17071030.
6. Герасимов И. Г., Калуцкая О. А. Кинетика реакции восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами крови человека // *Цитология*. 2000. Т. 42, № 2. С. 160–165.
7. Медицинская лабораторная диагностика: программы и алгоритмы : руководство для врачей / под ред. А. И. Карпищенко. 3-е изд., перераб. и доп. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2014. 696 с.
8. Rashtak S., Ruan X., Druliner B. R. et al. Peripheral Neutrophil to Lymphocyte Ratio Improves Prognostication in Colon Cancer // *Clin Colorectal Cancer*. 2017. Vol. 16(2). P. 115–123. doi: 10.1016/j.clcc.2017.01.008.
9. Li Z., Zhao R., Cui Y., Zhou Y., Wu X. The dynamic change of neutrophil to lymphocyte ratio can predict clinical outcome in stage I-III colon cancer // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8. P. 9453. doi: 10.1038/s41598-018-27896-y.

ЦИФРОВОЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И БЕЛКОВ С СИСТЕМОЙ GEOMX

GEOMX SYSTEM — DIGITAL SPATIAL PROFILING OF GENE AND PROTEIN EXPRESSION

А. Е. Алексеева

ООО «БиоВитрум», Санкт-Петербург, Россия

A. E. Alekseeva

“BioVitrum” Ltd., Saint Petersburg, Russia

e-mail: alena.alekseeva@biovitrum.ru

Система цифрового пространственного профилирования GeoMx — уникальная разработка 2019 года. Система генерирует изображение образца с разрешением в одну клетку и данные с профилем экспрессии для десятков и тысяч мишеней РНК и белков в выбранных участках. Основные преимущества технологии: высокая мультиплексность, минимальное количество образца, четырехцветная визуализация для определения морфологического контента, возможность повторного анализа слайдов при работе с белками, динамический диапазон — 6 log, настраиваемая разрешающая способность — выбор участка интереса от 600 микрон до единичной клетки, высокая пропускная способность — до 20 срезов в день, количественный подсчет мишеней.

Ключевые слова: анализ экспрессии генов и белков, пространственное профилирование

GeoMx Digital Spatial Profiler is unique technology of 2019. The machine generates sample image with one cell resolution and data of thousand RNA and protein targets in chose regions. Main advantages: high multiplex, small sample amount, 4 colors morphology content visualization, possibility of re-analysis protein slides, dynamic range 6 log, region of interest from 60 micron to 1 cell, high throughput to 20 slides per day, quantitative target counting.

Key words: gene expression, protein expression, spatial profiling

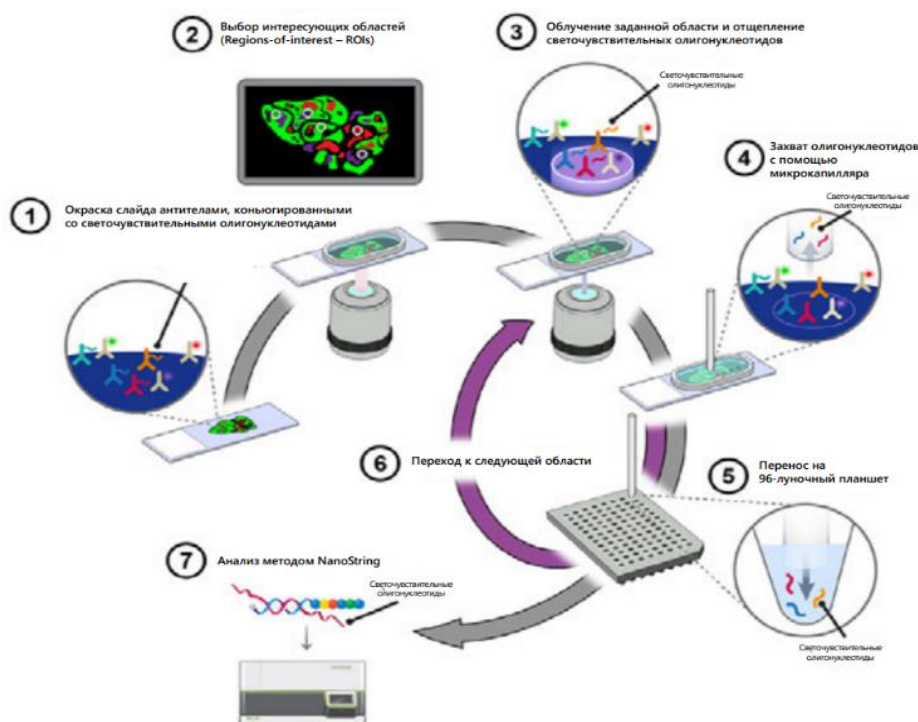
Ввиду растущего интереса к гетерогенности опухолей и редких клеточных подгрупп (например, циркулирующих опухолевых клеток) высокочувствительный метод, позволяющий профилировать несколько клеток или даже отдельные клетки с высоким уровнем мультиплексирования, вызывает все больший интерес. Штрихкодирование ДНК было разработано и применено к растворимым белкам. Тем не менее применение технологии к отдельным клеткам или клеточным суспензиям было ограничено из-за сложностей обнаружения и амплификации штрих-кода в клеточной микросреде. Эти ограничения были первоначально превзойдены развитием светоопосредованного клеточного штрихкодирования (LCMB). Агасти и соавторы разработали метод протеомного профилирования на основе антител, который позволял обнаруживать белки в суспензиях живых клеток с помощью антител, конъюгированных с уникальными олигомерами ДНК, через линкер, расщепляемый под воздействием ультрафиолета. Эксперименты продемонстрировали линейную корреляцию олигонуклеотидов, отделившихся от антитела против HER2, к количественной оценке клеток SK-BR3, 3T3 и MDA-MB-231 на основе проточной цитофлуориметрии. Было показано

обнаружение отдельных клеток SK-BR3 в экспериментах с разведением и обнаружением EGFR, EpCAM и HER2/neu при мультиплексном окрашивании линий клеток рака молочной железы.

В то время LMCB был значительным прогрессом, метод был полуколичественным, и амплификация с помощью ПЦР освобожденных олигонуклеотидов ограничивала мультиплексирование до пяти мишеней и приводила к сдвигам. Метод ПЦР для анализа освобожденных олигонуклеотидов был впоследствии заменен методом NanoString. Детектирование олигонуклеотидов системой nCounter устранило необходимость проведения амплификации и увеличило количество одновременно анализируемых мишеней. Эксперименты по белковому профилированию продемонстрировали обнаружение до 90 белков в свежих и замороженных биопсийных образцах. Дальнейшая валидация показала сравнимые результаты с окрашиванием конъюгированными и неконъюгированными антителами, воспроизводимость, идентичность окрашивания против индивидуальных маркеров и окрашиванием коктейлем против 60 аналитов высокую корреляцию с уровнем экспрессии 6 маркеров (CD44, HER2, EGFR, CA19-9, CK7, MUC1), полученных методом проточной цитофлуориметрии. Метод конъюгации антител был впоследствии адаптирован компанией NanoString, которая разработала специализированный прибор для визуализации образцов ткани и отбора проб с выбранных пользователем участков для последующего анализа на приборах nCounter и SPRINT — система цифрового пространственного профилирования **GeoMx**

Весь протокол состоит из нескольких шагов (описан протокол при анализе экспрессии белков):

- 1) окраска слайда антителами, конъюгированными с олигонуклеотидами через линкер, расщепляемый под воздействием ультрафиолета;
- 2) выбор интересующих областей интереса (Regions of Interests – ROI): геометрически выбранная область, фенотипически выбранная область, единичная / единичные клетки;
- 3) облучение заданной области и отщепление олигонуклеотидов;
- 4) захват олигонуклеотидов с помощью микрокапилляра;
- 5) перенос олигонуклеотидов в 96-луночный планшет;
- 6) анализ методом NanoString или NGS.



Система цифрового пространственного профилирования может работать как со свежими тканями, так и зафиксированными тканями, заключенными в парафин (FFPE). Химическая и техническая сложность платформы GeoMx предполагает необходимость надежной проверки ее технических характеристик, чувствительности и воспроизводимости. Исследования показали, что технология имеет больший динамический диапазон, чем ИГХ, обладает высокой воспроизводимостью и хорошо коррелирует с методами «золотого стандарта». Более подробно обо всей технической валидации и возможностях системы — в исследовании «New tools for pathology: a user's review of a highly multiplexed method for in situ analysis of protein and RNA expression in tissue» J. Decalf, M. L. Albert, J. Ziai.

Система позволяет анализировать большое число маркеров при небольшом количестве материала. Так, в исследованиях 2018 года сотрудниками Netherlands Cancer Institute производилась оценка экспрессии белков биопсийного материала меланомы для понимания иммунного статуса и оценки потенциального ответа на терапию. Данные показали, что инфильтрация иммунными клетками коррелирует с ответом на терапию. Группа из MD Anderson Cancer Center также занималась поиском маркеров при меланоме, которые бы показали ответ на терапию ниволумабом (nivolumab) или комбинации ниволумаба (nivolumab) и ипилимумаба (ipilimumab). Технология позволила группе количественно измерить экспрессию белков, в частности, в инфильтрующей опухоли иммунных клетках до и вовремя лечения в образцах тонкоигольной биопсии. Благодаря технологии было выявлено, что наличие популяций иммунных клеток и их активационный статус могут прогнозировать клинический ответ на терапию

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *TH*, *RHOX2B* И *DCX* МЕТОДОМ ЦИФРОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕЙРОБЛАСТОМОЙ

*В. В. Бриллиантова, Д. В. Шевцов, Т. В. Шаманская, С. Р. Варфоломеева,
Д. Ю. Качанов, Е. В. Райкина, А. Е. Друй*

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», Россия, Москва

e-mail: info@fnkc.ru

Ключевые слова: нейробластома, минимальная остаточная болезнь, ПЦР с детекцией в режиме реального времени, цифровая капельная ПЦР

Введение. Нейробластома — эмбриональная опухоль, которая является одним из наиболее частых злокачественных новообразований в раннем детстве. Определение минимальной остаточной болезни (МОБ) в группе пациентов высокого риска по результатам многих исследований позволяет выделить группу больных с плохим ответом на терапию. Для мониторинга МОБ существуют различные методики, однако самой востребованной является ПЦР с детекцией в режиме реального времени, основанная на определении в биологических средах (костный мозг, периферическая кровь) молекул, экспрессирующихся клетками нейробластомы и в норме не встречающихся в указанных субстратах. По результатам исследований Европейской группы по изучению нейробластомы SIOPEX, предложено три маркера для мониторинга МОБ при нейробластоме: ген тирозингидроксилазы (*tyrosinehydroxylase* — *TH*), ген даблкортина (*doublecortin* — *DCX*), ген *RHOX2B*. Большинство авторов, занимающихся определением МОБ при нейробластоме, используют метод ПЦР с детекцией в режиме реального времени. В лаборатории молекулярной биологии НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева была отработана система, основанная на методике цифровой капельной ПЦР, позволяющая оценивать количественно МОБ при нейробластоме даже при минимальном поражении костного мозга.

Материалы и методы. Были проанализированы образцы костного мозга из четырех точек подвздошных костей и периферической венозной крови 13 пациентов, отнесенных к группе высокого риска и имеющих инициальное поражение костного мозга опухолевыми клетками. Все пациенты находились на лечении в отделении клинической онкологии НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева в период с марта 2015 года по март 2016 года. Из биологических образцов выделяли РНК методом экстракции по Хомчинскому (набор «Рибо-золь D», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Из полученной РНК ставили обратную транскрипцию (реактивы «реверта-L», ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Полученную кДНК добавляли в объеме 10 мкл к 15 мкл смеси на ПЦР, состоящей из H₂O, 10x ПЦР-буфера, 10мМ смеси dNTP, MgCl₂ (ООО «Центр медицинской генетики», Россия), полимеразы, модифицированной термостабильными антителами TaqF (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), праймеров, зондов на гены-мишени (*TH*, *DCX*, *RHOX2B*) и контрольного гена *GAPDH* (ЗАО «Синтол», Россия). Реакция ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводилась в приборах RotorGene 6000 производства Corbett Research. Анализ результата проводился в программе RotorGene 6000 Analysis Software. Реакция цифровой капельной ПЦР проводилась на приборе QX200 (Bio-Rad).

Результаты. В результате проведенного исследования показана корреляция значений экспрессии генов-мишеней (*TH*, *DCX*, *PHOX2B*), посчитанных с помощью метода $\Delta\Delta C_t$ относительно контрольного гена *GAPDH*, и количеством копий, пересчитанных с помощью калибраторов для этих генов. При анализе образцов пациентов с нейробластомой из группы высокого риска с инициальным поражением костного мозга было показано, что в динамике экспрессия генов-мишеней в образцах костного мозга в процессе лечения меняется, что позволяет с высокой чувствительностью оценивать степень санации костного мозга от опухолевых клеток. У всех пациентов инициально было детектировано поражение костного мозга опухолевыми клетками, при этом у трех пациентов поражение костного мозга определялось только с помощью цПЦР. После второго блока химиотерапии МОБ выявлялся у большинства пациентов только методом цПЦР.

Выводы. Анализ МОБ при нейробластоме с помощью комбинации двух методик — ПЦР с детекцией в режиме реального времени и цифровой капельной ПЦР — дает возможность оценить количественно степень поражения костного мозга опухолевыми клетками даже в минимальном их количестве и проследить изменения МОБ в динамике при лечении пациента, что затруднительно сделать при использовании только методики ПЦР-РВ.

Список литературы

1. Yanez Y., Grau E., Oltra S. et al. Minimal disease detection in peripheral blood and bone marrow from patients with non-metastatic neuroblastoma // J. Cancer Res Clin Oncol. 2011. Vol. 137. P. 1263–1272. doi:10.1007/s00432-011-0997-x.
2. Stutterheim J., Gerritsen A., Zappeij-Kannegieter L. et al. PHOX2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma // J. Clin Oncol. 2008, Nov. 20. Vol. 26(33). P. 5443–5449. doi:10.1200/JCO.2007.13.6531.
3. Yáñez Y., Hervás D., Grau E. et al. TH and DCX mRNAs in peripheral blood and bone marrow predict outcome in metastatic neuroblastoma patients // J Cancer Res Clin Oncol. 2016, Mar. Vol. 142(3). P. 573–580. doi: 10.1007/s00432-015-2054-7.
4. Torres-Vega E., Durán-Moreno M., Sánchez Del Pino M. et al. Immunoproteomic studies on paediatric opsoclonus-myoclonus associated with neuroblastoma // J Neuroimmunol. 2016, Aug 15. Vol. 297. P. 98–102. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.05.015.

SPATA18 КАК НОВЫЙ ПРЕДИКТИВНЫЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

SPATA18 AS A NEW PREDICTIVE AND PROGNOSTIC MARKER IN BREAST CANCER

*Т. С. Геращенко¹, Е. В. Денисов^{1,2}, Н. М. Новиков^{1,2}, Л. А. Таширева¹, Н. В. Крахмаль³,
М. В. Завьялова^{1,3}, В. М. Перельмутер¹*

¹ Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

² Томский государственный университет, Томск, Россия

³ Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Томск, Россия

*T. S. Gerashchenko^{1,2}, E. V. Denisov^{1,2}, N. M. Novikov^{1,2}, L. A. Tashireva¹, N. V. Krakhmal³,
M. V. Zavyalova^{1,3}, V. M. Perelmuter¹*

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the RAS, Tomsk, Russia

² Tomsk State University, Tomsk, Russia

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Проведен поиск молекулярных маркеров, определяющих вклад внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы в эффективность химиотерапии и опухолевую прогрессию. Показано, что экспрессия *SPATA18* на концах опухолевых структур по типу «ракет» связана с высокой частотой гематогенного метастазирования и с отсутствием объективного ответа на неоадьювантную химиотерапию.

Ключевые слова: рак молочной железы, внутриопухолевая морфологическая гетерогенность, экспрессионное профилирование, метастазирование, устойчивость к химиотерапии

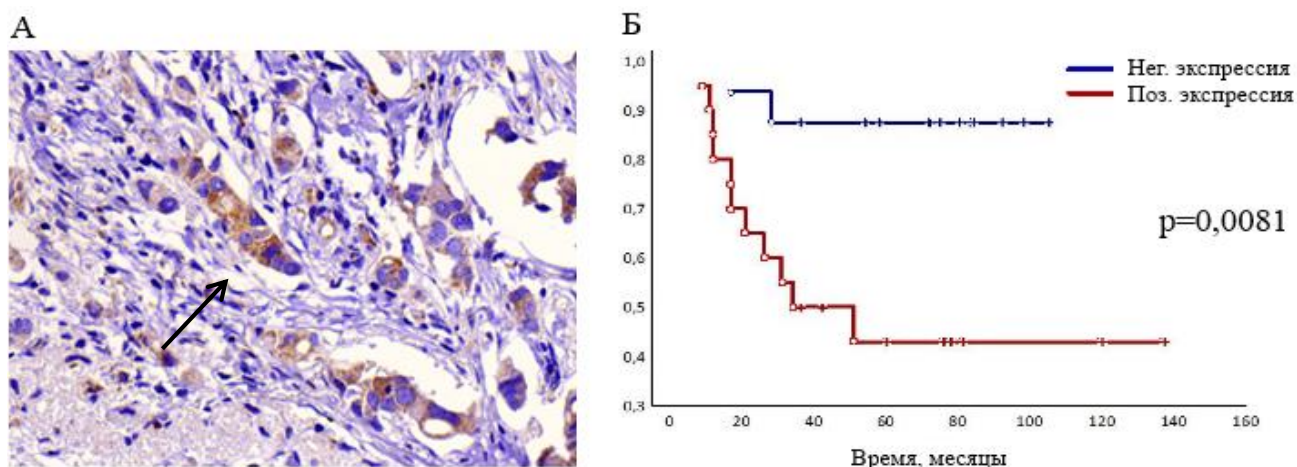
In this study, we used clinically relevant intratumoral morphological heterogeneity in breast cancer as a model for identifying molecular markers of chemotherapy resistance and disease progression. It was shown that expression of *SPATA18* at the tips of “torpedo-like” morphological structures is associated with high frequency of distant metastasis, poor metastasis-free survival, and chemoresistance.

Keywords: breast cancer, intratumor morphological heterogeneity, gene expression microarrays, metastasis, chemoresistance

Внутриопухолевая гетерогенность является одной из основных характеристик злокачественных новообразований. Рак молочной железы (РМЖ) не является исключением. Для данного заболевания описана генетическая, эпигенетическая и фенотипическая гетерогенность опухолевой ткани. Инвазивная карцинома неспецифического типа, наиболее часто встречающийся гистологический тип РМЖ, демонстрирует значительное морфологическое разнообразие, проявляющееся в наличии пяти типов опухолевых структур: альвеолярных, тубулярных, трабекулярных, солидных и дискретных. Данные структуры отличаются друг от друга не только пространственной организацией, но и экспрессионным

профилем, главным образом благодаря генам, вовлеченным в эпителиально-мезенхимальный переход [1]. Наличие тех или иных структур ассоциировано с прогрессией РМЖ и эффективностью химиотерапии. Так, опухоли с альвеолярными или трабекулярными структурами характеризуются повышенным потенциалом лимфогенного и гематогенного метастазирования и устойчивостью к неоадьювантной химиотерапии [2]. Таким образом, полученные данные указывают на то, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность является привлекательной моделью для изучения молекулярных механизмов химиорезистентности и метастазирования РМЖ, а также платформой для идентификации новых терапевтических мишеней.

Настоящее исследование было направлено на поиск возможных молекулярных «игроков», вовлеченных во вклад трабекулярных структур в устойчивость к неоадьювантной химиотерапии (НАХТ) и гематогенное метастазирование. Используя собственные данные экспрессионного профилирования различных морфологических структур (GSE80759), были выбраны гены, дифференциально экспрессирующиеся между трабекулярными структурами и другими морфологическими группами опухолевых клеток. Одним из таких генов был *SPATA18*, в значительной степени гипозэкспрессирующийся в трабекулярных структурах. Согласно ресурсу Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com>) низкая экспрессия *SPATA18* в опухолевой ткани ассоциирована с плохой безрецидивной выживаемостью больных РМЖ. Собственный иммуногистохимический анализ 80 опухолей молочной железы показал значительную ассоциацию экспрессии *SPATA18* с эффективностью НАХТ и гематогенным метастазированием. Так, цитоплазматическая экспрессия *SPATA18* в клетках мезенхимального типа по периферии морфологических структур ассоциирована с отсутствием объективного ответа на НАХТ ($p < 0,05$). Экспрессия *SPATA18* на концах опухолевых структур по типу «ракет» (рисунок, А), являющихся частным проявлением трабекулярных и солидных структур, связана с высокой частотой гематогенного метастазирования по сравнению со случаями, в которых экспрессия отсутствовала (55,0 % против 12,5 %, соответственно, $p = 0,0096$).



А – экспрессия белка *SPATA18* на концах опухолевых структур по типу «ракет» опухолевой ткани молочной железы; Б – безметастатическая выживаемость больных РМЖ с экспрессией *SPATA18* на концах «ракет»

Безметастатическая выживаемость также снижена для случаев с экспрессией *SPATA18* на концах «ракет» (Log-rang test, $p = 0,0081$, рисунок, Б). Согласно собственным данным, трабекулярные структуры демонстрируют выраженный инвазивный фенотип благодаря экспрессии большого спектра генов мезенхимального профиля и особенностям морфологического строения [1]. Вполне вероятно, что *SPATA18*, который, согласно литературным данным, регулирует энергетический баланс в клетке посредством контроля

функционирования митохондрий [3], может быть также вовлечен в клеточную миграцию. Известно, что потеря митохондриальной ДНК индуцирует перепрограммирование клетки, подобное тому, что наблюдается при эпителиально-мезенхимальном переходе, что приводит к приобретению инвазивного фенотипа и снижению чувствительности к антрациклинам и таксанам [4].

Таким образом, гетерогенная экспрессия белка SPATA18 в опухолевой ткани молочной железы ассоциирована с устойчивостью к НАХТ и высокой частотой отдаленного метастазирования. Вероятно, что вклад трабекулярных структур в эффективность химиотерапии и опухолевую прогрессию обусловлен активностью белка SPATA18.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №19-75-30016).

Список литературы

1. Denisov E. V., Skryabin N. A., Gerashchenko T. S. et al. Clinically relevant morphological structures in breast cancer represent transcriptionally distinct tumor cell populations with varied degrees of epithelial-mesenchymal transition and CD44+CD24- stemness // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8. P. 61163–61180.
2. Gerashchenko T. S., Zavyalova M. V., Denisov E. V. et al. Intratumoral Morphological Heterogeneity of Breast Cancer As an Indicator of the Metastatic Potential and Tumor Chemosensitivity // *Acta Naturae*. 2017. Vol. 9 (1). P. 56–67.
3. Gu X., Nylander E., Coates P. J., Nylan K. Oxidation Reduction is a Key Process for Successful Treatment of Psoriasis by Narrow-band UVB Phototherapy // *Acta Dermato-Venereologica*. 2015. Vol. 95 (2). P. 140–146.
4. Guha M., Srinivasan S, Ruthe G. et al. Mitochondrial retrograde signaling induces epithelial-mesenchymal transition and generates breast cancer stem cells // *Oncogene*. 2014. Vol. 33(45). P. 5238–5250.

НАСЛЕДСТВЕННЫЙ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОК ТУВИНСКОЙ НАЦИОНАЛЬНОСТИ, АССОЦИИРОВАННЫЙ С МУТАЦИЯМИ ГЕНОВ *BRCA1/2*

GERMLINE MUTATIONS OF THE *BRCA1/2* GENE IN THE TUVINIAN BREAST CANCER PATIENTS

П. А. Гervas, А. А. Иванова, Н. В. Чердынцева

НИИ Онкологии,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

P. A. Gervas, A. A. Ivanova, N. V. Cherdyntseva

Cancer Research Institute,
Tomsk National Research Medical Center, RAS, Tomsk, Russia

e-mail: pgervas@yandex.ru

Для населения России славянского происхождения была выявлена founder мутация 5382insC, которая составляет до 90 % всех мутаций гена *BRCA1* у пациенток с диагнозом РМЖ. На сегодняшний день не найдено наследственных мутаций *BRCA1/2* генов у коренных народов России, принадлежащих к монголоидной расе. В исследование было включено 88 пациенток с диагнозом РМЖ в возрасте до 49 лет монголоидного происхождения (хакасы, алтайцы, эвенки, буряты, тувинцы, якуты), у 26 выявлены признаки наследственного РМЖ. Подготовка библиотек проводилась с использованием набора Hereditary Cancer Solution™ (SOPHiA GENETICS) с целью обогащения 27 генов. Секвенирование выполнялось на платформе NextSeq500 (Illumina, США). Впервые выявлены высокопатогенные мутации генов *BRCA1/2* у тувинок с наследственным раком молочной железы в анамнезе.

Ключевые слова: рак молочной железы, мутации, *BRCA1/2*

In Russians, who are descended primarily from Slavic ancestors (newcomers), a strong founder effect was observed for the *BRCA1* 5382insC allele, which accounted for up to 90 % of all known BC-associated mutations in this population. To date, there are no reports on inherited gene mutations associated with breast cancer among Mongoloid indigenous people in Russia. This study aimed to identify the mutations that are related to the occurrence of hereditary breast cancer in the six Mongoloid indigenous groups in Russia (88 patients): South Siberia (Khakas), West Siberia (Altaians), East Siberia (Evenks, Buryats, Tyvans) and Far East Russia (Yakuts). Genomic DNA isolated from blood samples was used to prepare libraries using a capture –based target enrichment kit Hereditary Cancer Solution™ (SOPHiA GENETICS, Switzerland). Next generation sequencing (NGS) was performed on an Illumina NextSeq500 System (Illumina, USA). We identified a highly pathogenic germline mutation in the *BRCA1/2* gene among Tuvinian Mongol breast cancer patients. To the best of our knowledge, this report is the first to describe highly pathogenic germline variants in the *BRCA1/2* gene, in Tuvinian patients with breast cancer.

Key words: breast cancer, mutations, *BRCA1/2*

Введение. В настоящее время к числу РМЖ-ассоциированных генов относят *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *NBS1*, *p53*, *ATM* и др., наследственные мутации в которых драматически

повышают вероятность развития заболевания до 85–100 %. Для населения России славянского происхождения была выявлена founder мутация 5382insC, которая составляет до 90 % всех мутаций гена *BRCA1* у пациенток РМЖ, проживающих в достаточно отдаленных друг от друга регионах России [1, 2]. Для монголоидного населения Российской Федерации (буряты, якуты, алтайцы, тувинцы, хакасы и др.) мутации генов, обуславливающие риск развития наследственных форм РМЖ, остаются неизученными [3]. Данное исследование было направлено на выявление мутаций генов, связанных с возникновением наследственного РМЖ у коренных народов России: Южной Сибири (хакасы), Западной Сибири (алтайцы), Восточной Сибири (эвенки, буряты, тувинцы) и Дальнем Востоке России (якуты).

Материалы и методы. В исследование было включено 88 пациенток с диагнозом РМЖ в возрасте до 49 лет монголоидного происхождения (хакасы, алтайцы, эвенки, буряты, тувинцы, якуты), у 26 выявлены признаки наследственного РМЖ.

Образцы крови собирали в пробирки, содержащие ЭДТА. Геномную ДНК выделяли методом фенол/хлороформной экстракции. Качество ДНК оценивали с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit® (ThermoFisher Scientific, США). Целостность ДНК (DIN) проверяли с использованием системы Agilent 2200 TapeStation. Методом рт-ПЦР оценивали частоту встречаемости мутаций генов *BRCA1/2* (*BRCA1* 5382insC, 185delAG, 4153delAG, T300G, 3819delGTAAA, 3875delGTCT, 2080delA и *BRCA2* 6174delT). Подготовка библиотек проводилась с использованием набора Hereditary Cancer Solution™ (SOPHiA GENETICS), с целью обогащения 27 генов (*ATM*, *APC*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *FAM175A*, *MLH1*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PIK3CA*, *PMS2*, *PMS2CL*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53* и *XRCC2*). Секвенирование выполнялось на платформе NextSeq500 (Illumina, США). Анализ результатов был выполнен с использованием программного обеспечения SOPHiA AI® (SOPHiA GENETICS, Швейцария).

Результаты. Мутация 3819delGTAAA гена *BRCA1* была впервые обнаружена у одной из 88 пациенток монголоидного происхождения (тувинка 34 лет). Анализ данных NGS 26 неродственных пациенток с признаками наследственного РМЖ монголоидного происхождения выявил молекулярно-генетические нарушения в генах *BRCA2*, *MUTYH*, *MLH1*, *NBN*, *ATM*, *APC*. Для генов *MLH1*, *NBN*, *ATM*, *APC* выявлены замены с неизученной значимостью (unknown significance). В генах *BRCA2* и *MUTYH* найдены клинически значимые нарушения (highly или likely pathogenic). Впервые был найден у шести неродственных тувинок с диагнозом РМЖ Indel гена *BRCA2* (rs483353122, c.8208_8209insAG, p.Leu2737Serfs*2). Этот вариант не был ранее описан в 1000G, ExAC, SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster. В dbSNP, ENIGMA rs483353122 гена *BRCA2* классифицирована как высокопатогенная мутация сдвига рамки считывания.

Выводы. Впервые выявлены высокопатогенные мутации генов *BRCA1/2* у тувинок. Полученные данные требуют изучения частоты встречаемости описанных аллельных вариантов генов *BRCA1/2* на расширенной выборке пациенток с наследственными формами РМЖ, а также здоровых добровольцах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-29-09046.

Список литературы

1. Имянитов Е. Н., Соколенко А. П., Берлев И. В. и др. Носительство мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у здоровых женщин и мужчин: ДНК-тестирование, диагностические мероприятия и профилактика рака // Вопросы онкологии. 2017. № 63 (2). С. 190–198.
2. Любченко Л. Н., Батенева Е. И., Воротников И. К. и др. Наследственный рак молочной железы: генетическая и клиническая гетерогенность, молекулярная диагностика,

хирургическая профилактика в группах риска // Успехи молекулярной онкологии. 2014. № 2. С. 16–25.

3. *Чердынцева Н. В., Писарева Л. Ф., Панферова Е. В. и др.* Этнические аспекты наследственного рака молочной железы в регионе Сибири // Вестн. РАМН. 2014. № 69 (11–12). С. 72–79.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА NGS ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ГЛИОМ ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

USIG NGS METHOD TO IDENTIFY MOLECULAR PROFILING LOW GRADE AND HIGHT GRADE GLIOMAS IN CLINIC PRACTICE

*Т. В. Григорьева, Е. Н. Тельшева, Е. И. Новикова, Е. Г. Шайхаев,
Н. Н. Новицкая, Г. П. Снигирева*

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава РФ, Москва, Россия

*T. V. Grigorieva, E. N. Telysheva, E. I. Novikova, E. G. Shaikhaev,
N. N. Novitskaya, G. P. Snigireva*

FSBI “Russian Research Center of Roentgenoradiology” of the Ministry of Healthcare, Moscow, Russian Federation

Глиомы представляют собой гетерогенную группу внутримозговых неоплазий и имеют крайне разнообразную клиническую картину, не всегда адекватно предсказываемую на основании их гистологической принадлежности. Несмотря на то что классическая классификация опухолей головного мозга доказала свою состоятельность в нейроонкологической практике, все большее признание получила молекулярно-генетическая классификация, дающая надежную прогностическую информацию. Изучение генетических изменений в опухолях ЦНС имеет большое значение для назначения персонализированного лечения больным. Секвенирование нового поколения (NGS) является современным, эффективным и доступным методом, позволяющим одновременно детектировать различные типы генетических изменений, происходящих во взрослых и детских неоплазиях ЦНС.

Ключевые слова: молекулярно-генетические маркеры, глиома, центральная нервная система, NGS

Diffuse gliomas have highly variable clinical behavior that is not adequately predicted on the basis of histologic class. Although classic histology-based grading schemes have proven valuable in neuro-oncology practice, it has been increasingly recognized that molecular genetics-based classification scheme provide robust prognostic information. Identification of genetic changes in CNS tumors is important for the appropriate clinical management of patients. Method of next-generation sequencing (NGS) is modern, effective, rapid, cost-effective and it allows to simultaneously detect the various types of genetic alterations characteristic for adult and pediatric CNS tumor, that can be applied to small brain biopsies.

Keywords: molecular-genetic markers, glioma, central nervous system, NGS

Глиальные опухоли представляют собой гетерогенную группу неоплазий, которые составляют большинство первичных опухолей центральной нервной системы (ЦНС) и включают целый спектр опухолей различных по клеточному составу, уровню клеточной дифференциации, генетическому статусу, локализации, злокачественности и ответу на терапию.

До недавнего времени классификация опухолей центральной нервной системы опиралась на их гистологическую принадлежность к тому или другому типу клеток и уровню их дифференциации. Однако данные последних десятилетий пролили свет на генетическую основу опухолеобразования как для часто встречаемых неоплазий, так и для редких форм. Так, в 2014 году перед Всемирной организацией здравоохранения встал вопрос о систематизации накопленных данных о генетических нарушениях с целью объединить их с общепризнанной гистологической классификацией опухолей головного мозга. В 2016 году была принята «интегрированная» классификация опухолей ЦНС, основанная на генетических и фенотипических характеристиках клеток опухоли. Такой подход позволяет выйти на новый уровень объективности в дифференциальной диагностике неоплазий головного мозга благодаря более аккуратному разделению опухолей на разные типы и стадии. В свою очередь, это позволило врачам проводить дифференциальную диагностику заболевания и его прогноз, а также персонифицировать проводимое лечение с учетом генетических маркеров.

За последнее десятилетие было обнаружено множество генетических и эпигенетических изменений, вовлеченных в патогенез опухолей головного мозга. Оказалось, что не только для разных гистологических типов опухоли характерен свой профиль таких изменений, но и внутри каждого из них выделяют генетические подтипы. Например, мутации в генах *IDH1* и *IDH2*, характерные для большинства глиом низкой степени злокачественности (ГНЗ) у взрослых пациентов, ассоциированы с благоприятным прогнозом. ГНЗ, олигодендроглиомы, в частности, имеющие одновременно мутацию в гене *IDH* и коделецию 1p/19q, демонстрируют лучший ответ на лучевую терапию и химиотерапию, а также ассоциированы с большей выживаемостью по сравнению с глиомами без данных генетических изменений. Почти все ГНЗ, несущие мутации в *IDH*, но без коделеции 1p/19q имеют нарушения в гене *TP53* и / или в гене *ATRX*. Мутации в генах *TP53* и *ATRX*, свойственные астроцитомам, являются благоприятными генетическими факторами прогноза. Для большинства ГНЗ с диким типом гена *IDH* характерны молекулярные изменения в генах *PTEN*, *EGFR*, *NF1*, *TP53*, *PIK3CA*, *pTERT*.

Для глиом высокой степени (ГВЗ) у детей ключевым событием является мутация в гене *H3F3A*, а также мутации в гене *TP53*, перестройки в гене *ATRX*, амплификация гена *PDGFRA* и потеря 2q и 4p. При ГНЗ, например при спорадической пилоцитатарной астроцитоме у детей, часто наблюдается абберантная активация протоонкогена *BRAF*, приводящая к слиянию с геном *KIAA1549* или с геном *FAM131B* в качестве партнеров с образованием химерного протеина, обладающего постоянной киназной активностью, что приводит гиперактивации МАРК-каскада. Отмечено, что наличие мутации *KIAA1549/BRAF* имеет позитивное прогностическое значение для опухолей всех локализаций независимо от возраста пациента. Данные о генетических нарушениях в опухолевом геноме получены с использованием технологии секвенирования нового поколения (NGS) при проведении крупных мультицентровых исследований.

Для применения в клинической практике необходимо создание таргетных панелей, включающих гены, нарушения в которых обладают известной диагностической или прогностической значимостью и способны выступать в качестве мишеней для таргетной терапии.

Целью представленного исследования было изучение спектра молекулярных изменений в генах, участвующих в патогенезе опухолей головного мозга (астроцитом, олигодендроглиом, анапластических астроцитом и олигодендроглиом, глиобластом), влияющих на результаты лечения больных.

В докладе будут представлены результаты секвенирования с применением метода NGS 80 образцов ДНК опухолей ЦНС у взрослых и детей с помощью таргетной панели QIAseq Custom LGG panel, включающей 27 генов («Qiagen», США), и коммерческой панели SeqCap EZ Human Oncology Panel («Roche», Швейцария), включающей 981 ген. Будут обсуждаться достоинства и недостатки работы с большими и малыми панелями для NGS и возможность их использования в повседневной клинической практике.

**АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ВАСКУЛОЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО
ФАКТОРА РОСТА (VEGFA -634G/C) С ЭФФЕКТОМ ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ
ЯИЧНИКОВ**

**ASSOCIATION OF POLYMORPHISM OF THE VASCULAR ENDOTHELIAL
GROWTH FACTOR GENE (VEGFA -634G/C) WITH EFFECT OF CHEMOTHERAPY
IN OVARIAN CANCER**

Д. Р. Долгова, Т. В. Абакумова, И. Р. Мягдиева, И. О. Колодий

Ульяновский государственный университет, Ульяновск, Россия

D. R. Dolgova, T. V. Abakumova, I. R. Myagdieva, I. O. Kolodiy

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

e-mail: dolgova.dinara@yandex.ru

Исследован сывороточный уровень *VEGF* и полиморфизм гена *VEGFA* в регионе G634C у 87 больных раком яичников и 60 здоровых женщин. Установлена ассоциация минорной гомозиготы — 634 CC гена *VEGFA* с риском возникновения рака яичников ($p = 0,032$). Наличие аллели 634C способствует неблагоприятному течению рака яичников, с повышением риска рецидивов после платиносодержащей химиотерапии.

Ключевые слова: рак яичников, васкулоэндотелиальный фактор роста, полиморфизм гена *VEGFA* -G634C, химиотерапия

The level of serum *VEGF* and the polymorphism of the gene *VEGFA* G634C were studied in 87 patients with OC and 60 healthy donors. We have established the association of minor homozygote — 634 CC of *VEGFA* gene with the risk of ovarian cancer ($p = 0,032$). The presence of allele 634C contributes to the adverse course of ovarian cancer, with an increased risk of recurrence after platinum-containing chemotherapy.

Key words: ovarian cancer, vascular endothelial growth factor, polymorphism of *VEGFA* -G634C gene, chemotherapy

Согласно данным раковых регистров, в России с 2007 по 2017 год наблюдается повышение заболеваемости раком яичников (РЯ) на 4,8 %, в среднем каждый год выявляется 13–14 тысяч новых случаев. РЯ занимает 7 место в структуре смертности онкологических заболеваний у женщин. Одной из причин низкой пятилетней выживаемости больных с III–IV стадией аденокарциномы яичника является лекарственная резистентность, возникающая после применения стандартных платиносодержащих схем химиотерапии. С целью повышения эффективности и индивидуализации химиотерапии препаратами платины необходим поиск чувствительных биомаркеров, включенных в сигнальные пути канцерогенеза при РЯ. Неоангиогенез в опухоли, как один из ключевых факторов метастазирования при РЯ, включается при активации HIF1-сигналинга посредством ряда транскрипционных факторов — белков семейства *VEGF*, *FGF*, *PDGF*, *TGF-β* и др. К множественным проопухолевым функциям васкулоэндотелиального фактора роста (*VEGF*) относятся стимуляция ангиогенеза, повышение пролиферативного потенциала и выживания злокачественных клеток путем

подавления апоптоза, индукция матриксных металлопротеиназ, в частности MMP-9, обеспечение «иммунного ускользания» [Ferrara N., 2004]. Доказана прямая корреляция между степенью васкуляризации и риском метастазирования при карциноме молочной железы, рака легкого, простаты, шейки матки. Все это указывает на важное значение VEGF для опухолевого роста и необходимость изучения его экспрессионного потенциала как предиктора химиорезистентности. Ген *VEGF* расположен на коротком плече хромосомы 6 (6p21.3) и состоит из восьми экзонов и семи интронов, в которых выявлено более 30 полиморфных участка, связанных с однонуклеотидными заменами (SNP). Ряд полиморфных участков гена ассоциированы с различной экспрессией VEGF и, соответственно, с количеством белка. Известно, что -2578C/C, -634 C/-генотипы соответствуют высокому уровню продукции белка, а аллель +936T коррелирует с низким содержанием VEGF в плазме крови [Krupnova E. V., 2015].

Целью исследования явилось изучение полиморфизма гена *VEGFA* -634G/C (rs2010693) как фактора, влияющего на эффективность химиотерапии распространенного рака яичников.

Материалы и методы исследования. В исследование были включены 87 больных с верифицированным РЯ на III–IV клинических стадиях по FIGO. В контрольную группу составили практически здоровые женщины без онкологической патологии ($n = 60$). Пациентки РЯ, получавшие платиносодержащие схемы химиотерапии, были разделены на группы: 1 — платиночувствительные, 2 — платинорезистентные (рецидив заболевания в течение года после завершения стандартной ХТ). Геномную ДНК испытуемых выделяли из ЭДТА-стабилизированной крови с использованием набора «Проба-Рapid-Генетика» (ООО «ДНК-технология», Россия). Исследование полиморфизма -634G/C гена *VEGFA* (rs2010693) проводили на амплификаторе CFX96 (BioRad, США) методом аллель-специфической ПЦР-РВ (наборы «SNP-скрин», ЗАО «Синтол», Москва). Частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов, а также соответствие распределения наблюдаемых частот генотипов теоретически ожидаемым по равновесию Харди — Вайнберга проверяли по критерию χ^2 . Для оценки относительного риска развития заболевания / события вычисляли значение OR в исследованиях «случай-контроль». Оценку сывороточного уровня VEGF проводили методом ИФА (набор eBioscience, США) до начала ХТ у первичных больных РЯ.

Результаты исследования. Нами установлено, что аллельный вариант *VEGFA* -634CC более распространен у пациентов РЯ, чем в контроле. У носителей генотипов *VEGFA* -634CC риск возникновения заболевания составляет 2,82 ($p = 0,032$). Сывороточный уровень VEGF также был статистически значимо выше в группе больных с распространенным РЯ, причем в девять раз выше у больных на III клинической стадии, чем у здоровых женщин ($p = 0,003$). При анализе уровня VEGF в сыворотке первичных больных в зависимости от эффекта стандартной ХТ было показано, что у платинорезистентных пациенток выявлялся более высокий уровень белка, чем у платиночувствительных. Также важной отличительной особенностью между группами являлась достоверно выраженное преобладание гетерозиготного (GC) и минорного генотипов (CC) гена *VEGFA*.

Известно, что замена в промоторном регионе -634G/C гена *VEGFA* способствует повышению транскрипционной активности и аллель -634C связана с гиперэкспрессией *VEGFA* [Шевченко А. В., 2012]. Таким образом, установленная ассоциация полиморфизма -634G/C с повышенной экспрессией VEGF в крови может вносить вклад в активацию опухолевого неоангиогенеза при метастазировании рака яичников.

Полученные данные демонстрируют, что минорный генотип -634CC и аллель C в промоторном регионе гена *VEGFA* являются высокорисковыми для возникновения РЯ, а также генетически детерминируют агрессивный ангиогенный фенотип при прогрессировании РЯ. Изучение функциональных полиморфизмов гена *VEGFA* при РЯ может являться ценным инструментом при прогнозе заболевания.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-3196.2018.7).

Уровень VEGF в сыворотке и частота обнаружения аллельных вариантов гена VEGFA G -634C у больных РЯ и контроле

Фактор / генотип / аллели	Больные РЯ <i>n</i> = 87	Контроль <i>n</i> = 70	OR (95 % CI)	Больные РЯ <i>n</i> = 65		OR (95 % CI)
				1-я группа	2-я группа	
VEGF, нг/мл	III ст 909,7±163,9 IV ст 394,2±143,9	107,7±26,9		456,71± 64,514	360,39± 59,510	
VEGFA G- 634C						
GG, %	48,3	63,8	0,53 (0,28–1,01)	41,2	69,4	0,31 (0,12–0,82)
GC, %	27,6	26,1	1,08 (0,53–2,20)	35,3	19,4	2,26 (0,76–6,68)
CC, %	24,1	10,1	2,82 (1,12–7,09)	23,5	11,1	2,46 (0,67–9,10)
Аллель G	62,1	76,8	0,49 (0,30–0,81)	58,8	79,2	0,38 (0,18–0,79)
Аллель C	37,9	23,2	2,02 (1,23–3,34)	41,2	20,8	2,66 (1,26–5,61)

Курсивом выделены данные, статистически отличающиеся от контрольных значений

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ, РАСПОЛОЖЕННЫЕ ВНЕ HLA ЛОКУСА, ВЛИЯЮТ НА ИСХОД ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СИСТЕМЫ КРОВЕТВОРЕНИЯ

Г. А. Ефимов, Д. С. Романюк, М. Ю. Дроков, А. А. Хмелевская., Н. А. Быкова, Д. Б. Малько

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

В отличие от многих солидных опухолей, злокачественные заболевания системы кроветворения имеют незначительное число мутаций, что делает применение чейкпойнт блокаторов и других иммунотерапевтических подходов малоэффективным. В то же время трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) успешно применяется в онкогематологии. Алло-ТГСК является формой иммунотерапии, поскольку вместе со стволовыми клетками пересаживаются зрелые лимфоциты, обеспечивающие элиминацию злокачественного клона за счет распознавания аллоантигенов. Тот же механизм вызывает реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Для избежания чрезмерного аллореактивного ответа производится подбор донора по аллелям генов главного комплекса гистосовместимости — наиболее полиморфному локусу человеческого генома. Известно, что количество HLA-несовпадений между донором и реципиентом влияет на вероятность развития РТПХ.

Одновременно существуют и другие полиморфизмы, расположенные вне HLA локуса. В частности, полиморфизмы в иммунорегуляторных генах могут модулировать развитие иммунного ответа. Ранее было показано, что генотип AA полиморфизма rs231775 в гене *CTLA4* связан с более высоким риском развития острой РТПХ, снижением общей и безрецидивной выживаемости. По нашим данным, этот генотип статистически достоверно не повышает вероятности РТПХ, а снижает вероятность рецидива ($p = 0,01$) и приводит к более высокой безрецидивной выживаемости ($p = 0,03$) у пациентов, перенесших неродственную HLA-совместимую трансплантацию.

Другой класс генетических полиморфизмов, которые могут предопределять исход алло-ТГСК, составляют минорные антигены гистосовместимости (МАГ) — несинонимичные полиморфизмы, кодирующие антигенные пептиды, представляемые в МНС. Они могут располагаться в любых белок-кодирующих генах. С использованием публично доступных геномных данных и с помощью полноэкзомного секвенирования восьми пар донор-реципиент нами было показано, что родственные пары донор-реципиент имеют 116 ± 26 , а неродственные — 65 ± 15 потенциально иммуногенных несовпадающих МАГ. При этом более 70 % из них кодируются частыми полиморфизмами, что делает МАГ перспективными мишенями для иммунотерапии.

Ранее было проанализировано влияние двух МАГ на исход трансплантации и показано, что генетические несовпадения между донором и реципиентом по антигенам HA-1 и HA-8 HA-1 увеличивают частоту острой РТПХ. Для изучения клинической значимости более широкого спектра МАГ нами был разработан метод быстрого генотипирования 48 различных МАГ. Были генотипированы 870 здоровых волонтеров, что позволило выявить наиболее перспективные для иммунотерапии полиморфизмы в Российской популяции. Кроме того, было генотипировано 40 пар донор-реципиент. В настоящий момент проводится анализ клинических данных для выявления наиболее иммуногенных МАГ.

Определение иммуногенных несоответствий, кодируемых геномными полиморфизмами, в парах донор-реципиент может быть использовано для прогнозирования исхода трансплантации, а также для подбора мишеней для иммунотерапии.

ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ В ПРОГРЕССИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

MEANING STEMNESS GENE EXPRESSION IN THE PROGRESSION OF BREAST CANCER

*М. К. Ибрагимова^{1,2}, М. М. Цыганов^{1,2}, И. В. Дерюшева¹, П. В. Казанцева¹,
Е. М. Слонимская^{1,3}, Н. В. Литвяков^{1,2}*

¹НИИ онкологии Томский НИМЦ, Томск, Россия

²НИ Томский государственный университет, Томск, Россия

³ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

При исследовании опухоли молочной железы 62 больных до и после лечения неoadъювантной химиотерапией показана гиперэкспрессия в резидуальной опухоли 14 из 16 генов стволовости у больных с развившимися впоследствии метастазами. Было показано, что при гиперэкспрессии в остаточной резидуальной опухоли трех из изучаемых генов *OCT3*, *LAT* и *LMNB2* у 69 % больных зарегистрировано возникновение гематогенных метастазов. При гипоекспрессии хотя бы одного из этих генов пятилетняя безметастатическая выживаемость составляет 94 % (34/36). Получена модель прогнозирования возникновения гематогенного метастазирования на основе анализа экспрессии трех генов стволовости. При изучении значения амплификаций генов стволовости для активности опухолевых стволовых клеток было показано, что эпителиальные нестволовые опухолевые клетки больной с амплификациями генов стволовости экспрессируют гены стволовости на уровне опухолевых стволовых клеток и способны образовывать опухолевые стволовые клетки.

In a study of a mammary gland tumor in 62 patients before treatment and after neoadjuvant chemotherapy, overexpression of a residual tumor in 14 of 16 stemness genes in patients with subsequently developed metastases was shown. It was shown that with overexpression of three of the studied *OCT3*, *LAT* and *LMNB2* genes in residual residual tumor in 69 % of patients, hematogenous metastases were detected. With hypoeexpression of at least one of these genes, the 5-year non-metastatic survival rate is 94 % (34/36). A model was obtained for predicting the occurrence of hematogenous metastasis based on the analysis of the expression of 16 stemness genes.

Согласно результатам предыдущих исследований, было показано, что при проведении неoadъювантной химиотерапии (НХТ) под влиянием химиопрепаратов происходит клональная эволюция опухоли, при которой происходит изменение опухолевых клонов (ОК) — полное / частичное исчезновение или появление новых клонов. Новые клоны, образованные под действием НХТ, содержат амплификации в следующих локусах: 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 19p, 18chr. При этом выявлено, что появление в остаточной резидуальной опухоли в процессе НХТ любых двух и более амплификаций этих регионов приводит к 100 % гематогенному метастазированию. У всех остальных больных с элиминацией ОК, отсутствием действия химиотерапии на клоны, или у больных с появлением делеционных клонов не было гематогенных метастазов в пятилетний период наблюдения (по методу Каплана — Майера, $p = 0,00001$ Log-rank test). На основании этих данных и данных литературы нами была высказана рабочая гипотеза о том, что клоны, несущие амплификации в вышеуказанных локусах, являются потенциальными метастатическими клонами. Возможно,

в процессе клональной эволюции опухоли соматическими опухолевыми клетками, благодаря гиперэкспрессии (например, за счет амплификации локусов) генов (которые связывают с индукцией стволовых клеток), приобретает способность к обратному переходу в опухолевые стволовые клетки — осуществление стволового перехода. Предполагается, что только такие опухолевые клетки могут образовывать метастазы.

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности НХТ и безметастатической выживаемости больных РМЖ на основе изучения наличия амплификационных клонов в первичной опухоли больных и оценке экспрессии генов стволовости.

Материал и методы. В исследование включены 62 больных с морфологически верифицированным диагнозом РМЖ IIA–IIIB (T1-4N0-3M0), возраст 26–68 лет (средний возраст $47,43 \pm 0,78$ лет). Материалом для исследования служили парные образцы биопсийного материала до лечения для каждого из пациентов. Была выделена ДНК и РНК из исследуемого материала при помощи наборов QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany) и RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany) соответственно. Наличие амплификаций определялось в вышеуказанных регионах с использованием микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, USA). Экспрессию генов стволовости оценивали при помощи метода обратнотранскриптной ПЦР в режиме реального времени (qPCR) с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan и с использованием экспрессионного микроматричного анализа на платформе GeneChip (Affymetrix, USA).

Результаты. Установлено, что у больных без метастазов до лечения гиперэкспрессированы пять генов: *OCT3*; *BMI1*; *LMNB2*; *TGFb1* и *FLT3*; у больных с метастазами до лечения гиперэкспрессированы семь генов: *OCT3*; *BMI1*; *LMNB2*; *TGFb1*; *TERT*; *SNAI2*; *TGFbR1*. После проведения НХТ в остаточной резидуальной опухоли больных без гематогенных метастазов частота гиперэкспрессированных генов не меняется. У больных с метастазами после НХТ в остаточной резидуальной опухоли гиперэкспрессированы 14 из 16 изученных генов — кроме *KLF1* и *SMAD2*. При это было показано, что при гиперэкспрессии в остаточной резидуальной опухоли трех генов *OCT3*, *LAT* и *LMNB2* у 69 % больных (11/16) зарегистрировано возникновение гематогенных метастазов. При гипозэкспрессии хотя бы одного из этих генов пятилетняя безметастатическая выживаемость составляет 94 % (34/36) (рис. 1).

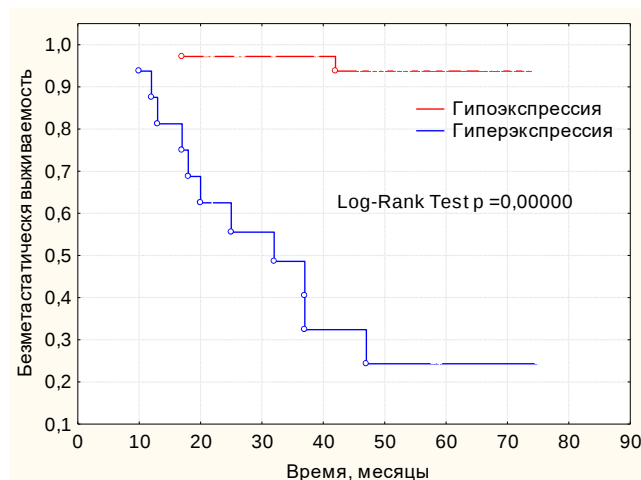


Рис. 1. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ при гипо- и гиперэкспрессии генов *OCT3*, *LAT* и *LMNB2* (Log-Rank Test $p = 0,00000$)

Следующим этапом работы было изучение значения амплификаций генов стволовости для активности опухолевых стволовых клеток. Исследовали экспрессию генов стволовости в ЕрCam+ клетках, полученных из опухоли молочной железы больной St с амплификациями генов стволовости (3q, 6q, 8q, 9q, 10q22.1 (амплифицированы следующие гены: *SOX2*, *MYC*,

KLF4, *NOTCH1*, *NODAL*)), и больной Тi без амплификаций генов стволовости. Повышенный уровень экспрессии 10/16 изученных генов стволовости (*SOX2*, *OCT3*, *MYC*, *TGFBR1*, *KLF4*, *TGFB1*, *LAT*, *SMAD2*, *LNMB2*, *VIM*) наблюдался и в ЕрCam⁺ опухолевых клеток, выделенных из опухоли пациентки St по сравнению с ЕрCam⁺ опухолевыми клетками от пациентки Ti.

В специализированной среде Human EpiCult-C после обработки субпопуляций опухолевых клеток ИЛ-6 количество клеток после третьего пассажа не увеличилось в популяции ЕрCam⁺ клеток, полученных из опухоли молочной железы больной Ti, однако прирост ЕрCam⁺ клеток опухоли молочной железы больной St был иным — увеличение клеточной массы более чем в три раза наблюдалось уже после первого пассажа, после третьего пассажа наблюдался резкий прирост массы клеток более чем в 300 раз.

Заключительным этапом работы была оценка активности опухолевых стволовых клеток *in vitro* — образование первичных маммосфер в культуре в специализированной среде MammoCult. Так, не наблюдалось образования маммосфер из популяции ЕрCam⁺ клеток от больной Ti. Добавление ИЛ-6 в культуру ЕрCam⁺ клеток третьего пассажа от больной Ti также не вызывало образование маммосфер, наблюдалось лишь увеличение клеточной массы более чем в 2,5 раза. При этом колониеобразование из ЕрCam⁺ клеток третьего пассажа от больной St в среде MammoCult не наблюдалось. Через 10 суток после добавления ИЛ-6 были выявлены маммосферы (рис. 2).

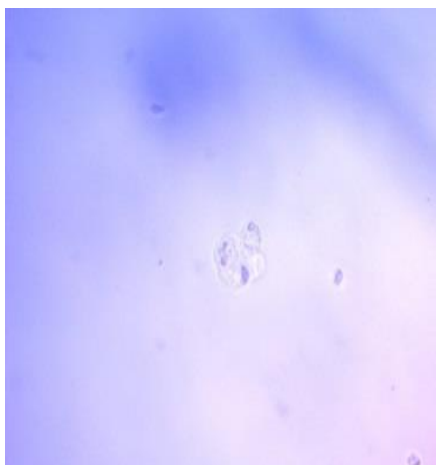


Рис. 2. Маммосферы в ЕрCam⁺CD44-культуре, полученной из опухоли молочной железы больной St

Заключение

1. Установлено, что у больных с развившимися впоследствии метастазами после проведения НХТ количество гиперэкспрессированных генов стволовости увеличилось в два раза. Это свидетельствует о важной роли активации экспрессии генов стволовости для метастазирования опухолей.

2. На основе анализа экспрессии генов стволовости *OCT3*, *LAT* и *LMNB2* в остаточной резидуальной опухоли разработан новый прогностический фактор с диагностической точностью прогноза 82 %.

3. Эпителиальные нестволовые опухолевые клетки больной с амплификациями генов стволовости экспрессируют гены стволовости на уровне опухолевых стволовых клеток и способны образовывать опухолевые стволовые клетки.

Работа поддержана грантом РНФ 17-15-01203.

ВЫЯВЛЕНИЕ НОВООБРАЗОВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ В ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ С ПОМОЩЬЮ КОМБИНИРОВАННОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛАССИФИКАТОРА

DETECTION OF CERVICAL LESIONS IN CYTOLOGICAL PREPARATIONS BY A COMBINED MOLECULAR CLASSIFIER

*М. К. Иванов^{1,2}, С. Е. Титов^{1,2}, В. В. Дзюбенко¹, С. А. Глушков¹, С. Э. Красильников³,
А. С. Мансурова³, Ю. А. Ланцухай⁴, И. Э. Вахтурова⁴, И. Д. Нущик⁵, Т. С. Присяжная^{6,8},
Н. А. Назмиева^{6,7}, А. В. Малек^{6,7}*

¹АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

²ФГБУ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

³ГБУ здравоохранения Новосибирской области «Новосибирский областной онкологический диспансер», Новосибирск, Россия

⁴Некоммерческая организация фонд развития и оказания специализированной медицинской помощи «Медсанчасть-168», Новосибирск, Россия

⁵ООО «Клиника Екатерининская», Краснодар, Россия

⁶ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Петрова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

⁷ООО «Онко-система», Москва, Россия

⁸Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

*М. К. Ivanov^{1,2}, S. E. Titov^{1,2}, V. V. Dzyubenko¹, S. A. Glushkov¹, S. E. Krasilnikov³, A. S. Mansurova³, Yu. A. Lancuhaj⁴, I. E. Vahturova⁴, I. D. Nushchik⁵, T. S. Prisyazhnaya^{6,8},
N. A. Nazmиеva^{6,7}, A. V. Malek^{6,7}*

¹АО “Vector-Best”, Novosibirsk, Russia

²Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, Russia

³Novosibirsk Regional Oncology Dispensary, Novosibirsk, Russia

⁴“Medsanchast-168”, Novosibirsk, Russia

⁵LLC “Clinic Ekaterininskaya”, Krasnodar, Russia

⁶Prof. N. N. Petrov Research Institute of Oncology, Saint Petersburg, Russia

⁷“Oncosystem” Ltd., Moscow, Russia

⁸North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

e-mail: ivanovmk@vector-best.ru

Разработан и апробирован метод выявления тяжелых неоплазий и рака шейки матки в материале цитологических препаратов. Метод основан на комбинированном классификаторе, использующем данные полуквантитативного ОТ-ПЦР анализа панели из 14 клеточных молекулярных биомаркеров, — 8 микроРНК и 6 мРНК. Анализ может быть выполнен параллельно с ВПЧ-тестированием. В качестве референсного метода использовали гистологическое заключение. Показано, что молекулярное профилирование позволяет выявлять новообразования шейки матки с высокой точностью безотносительно наличия и

концентрации ДНК вируса папилломы человека. Для разнородных маркеров, включенных в классификатор, наблюдались сочетанные изменения содержания при повышении тяжести неоплазии. В то же время доля дискордантных результатов между молекулярной классификацией и гистологическим заключением критически зависела от медицинского учреждения, в котором был забран материал и сделано заключение.

Ключевые слова: цервикальная эпителиальная неоплазия, рак шейки матки, цитологические препараты, микроРНК, молекулярные маркеры, папилломавирус человека

A method for detection of cervical high-grade neoplasia and cancer in cytology preparations was developed and validated. The method is based on combined classifier using semiquantitative RT-PCR data on the panel of 14 cellular molecular biomarkers – 8 microRNAs and 6 mRNAs. The assay may be performed in parallel with the HPV testing. Histology report was used as a reference method. The molecular profiling was shown to detect cervical lesions with high accuracy irrespective of presence and concentration of human papillomavirus DNA. For concentrations of heterogeneous markers included into the classifier, simultaneous changes were observed at increasing degree of the lesion severity. At the same time, the proportion of discordant results between the molecular classification and the pathology report depended critically on the clinical setting, from which the sample was obtained and where the report was made.

Keywords: cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer, cytology preparations, microRNA, molecular biomarkers, human papillomavirus

Рак шейки матки (РШМ) — одна из лидирующих причин женской онкологической смертности во всем мире. Смертность от РШМ может быть существенно снижена, поскольку заболевание развивается медленно (10–15 и более лет), ранняя диагностика возможна на стадии предраковых новообразований, а при своевременном (на стадии тяжелой неоплазии) хирургическом вмешательстве прогноз, как правило, хороший. Действующие программы, направленные на профилактику РШМ, предполагают в качестве основного метода первичного скрининга цитологическое исследование цервикального мазка. Однако для такого исследования характерна высокая частота ошибок, связанных с техническими ограничениями и человеческим фактором. Диагностическая чувствительность однократного цитологического анализа в отношении тяжелых неоплазий варьирует от <40 % до не более чем 65–70 %.

Выявление вируса папилломы человека высокого онкогенного риска (ВПЧ ВКР) в цервикальных препаратах (ВПЧ-тестирование) обладает более высокой чувствительностью в отношении цервикальных неоплазий, однако положительная предсказательная ценность его результата, даже с учетом вирусной нагрузки, низка — у большинства зараженных инфекция является транзиторной и разрешается без клинических проявлений. Отрицательная предсказательная ценность ВПЧ-тестирования также не достигает 100 %, поскольку цервикальные неоплазии и РШМ могут быть ВПЧ-негативными. В дополнение к этому гистологически подтвержденные тяжелые цервикальные неоплазии представляют собой неоднородную группу, включающую новообразования, значительно отличающиеся в отношении риска дальнейшей злокачественной трансформации, и для существенной их доли хирургическое вмешательство может быть неоправданным.

В исследованиях последних двух десятилетий выявлен ряд клеточных молекулярных маркеров, изменение содержания которых коррелирует с повышением тяжести цервикальных неоплазий и риском злокачественной трансформации. К ним могут быть отнесены: уровни метилирования промоторов некоторых генов; наличие интегрированных копий ДНК ВПЧ в геноме эпителиоцитов; изменение содержания ряда клеточных мРНК, белков и микроРНК; изменение копийности гена *hTERT* и т. д. Анализ содержания этих маркеров в перспективе может существенно повысить диагностическую и прогностическую ценность цервикального скрининга. В этой связи во всем мире ведутся работы по созданию и валидации диагностических решений на основе их анализа, приемлемых с точки зрения стоимости, трудозатрат и пропускной способности.

Нами разработан метод, основанный исключительно на использовании реагентов производства АО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия) и пригодный для анализа тех же клинических образцов, которые используются для ВПЧ-тестирования и цитологического анализа (окрашивание на стеклах, содержимое виал для жидкостной цитологии, цервикальные мазки). Метод предполагает выделение ДНК и РНК из клинических проб с последующей оценкой содержания ряда онкогенных и онкосупрессорных клеточных микроРНК и мРНК с помощью ПЦР с обратной транскрипцией и детекцией в реальном времени. В качестве маркеров на основании анализа литературы и первичных экспериментов на ограниченных выборках были отобраны 8 микроРНК (miR-20a, -21, -34a, -96, -145, -196b, -375, -1246) и мРНК шести генов (*ECM1*, *CDKN2A*, *TSP4*, *Ki-67*, *TOP2A*, *CD82*). Оценка риска наличия тяжелой неоплазии и РШМ осуществляется с помощью комбинированного классификатора, предварительно обученного на выборке из >200 цитологических препаратов с известными гистологическими заключениями.

Апробация метода была осуществлена на более чем 2000 клинических образцах, полученных из четырех медицинских учреждений Новосибирска, Москвы, Санкт-Петербурга и Краснодара. Клинический материал включал цитологические мазки, полученные от пациенток с нормальным состоянием цервикального эпителия (NILM по классификации Bethesda) и диспластическими изменениями разной степени (от L-SIL до инвазивного рака). В качестве референсного метода использовали гистологическое заключение. Параллельно во всех образцах проводили выявление, количественную оценку и определение генотипа ВПЧ ВКР. Была показана достоверная корреляция уровней риска, оцениваемых с помощью предложенной методики, с гистологическим заключением о тяжести неоплазии, а также с уровнем метилирования промотора гена *MAL* и гена *miR-124* в эпителиоцитах, оцененным с помощью метил-чувствительного ПЦР-анализа после бисульфитной модификации ДНК. При этом для разнородных маркеров, включенных в классификатор, оказались характерны сочетанные изменения при повышении тяжести неоплазии. В то же время доля дискордантных результатов между молекулярной классификацией и гистологическим заключением критически (отличие в разы) зависела от медицинского учреждения, в котором был забран материал и сделано заключение.

Разрабатываемый метод характеризовался значительно более высокой положительной предсказательной ценностью по сравнению с ВПЧ-тестированием и более высокой общей точностью по сравнению с цитологическим анализом. Определяемый с помощью классификатора показатель не коррелировал с вирусной нагрузкой ВПЧ ВКР и позволял выявлять тяжелую неоплазию и при отсутствии выявления ДНК ВПЧ. У пациенток после лечения наблюдались показатели экспрессии мРНК цервикального эпителия, соответствующие цитологической норме, но сохранялась дерегуляция экспрессии маркерных микроРНК, характерная для тяжелых неоплазий и рака шейки матки. В ходе апробации была показана возможность применения методики на архивных цитологических препаратах (окрашенный материал на стеклах), хранившихся до трех лет.

Важно отметить, что в некоторых случаях были выявлены сочетанные изменения содержания ряда разнородных молекулярных маркеров, характерные для злокачественной трансформации, но соответствующие цитологической и гистологической норме, и наоборот. Эти результаты подтверждают недавние литературные данные о различном потенциале злокачественности новообразований, объединенных одним цитологическим или гистологическим заключением.

Таким образом, результаты исследования показывают, что молекулярно-диагностические тесты на основе мРНК- и микроРНК-профилирования могут быть интегрированы в существующие алгоритмы ведения пациентов по поводу профилактики РШМ и использованы для повышения точности и прогностической значимости ранней диагностики интраэпителиальных цервикальных неоплазий.

ЭКЗОСОМАЛЬНЫЕ МИКРОРНК В РЕГУЛЯЦИИ ГОРМОНАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕЙ

EXOSOMAL MICRORNA IN THE REGULATION OF TUMOR HORMONAL DEPENDENCY

М. А. Красильников, Ю. Ю. Щеголев, А. М. Щербаков, М. В. Гудкова

Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

M. A. Krasil'nikov, Y. Y. Shchegolev, A. M. Scherbakov, M. V. Gudkova

Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the
Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Эффективность гормональной терапии злокачественных новообразований во многом ограничена развитием резистентности опухолей к гормональным препаратам, вызванной подавлением гормонального аппарата клетки и / или компенсаторной активацией митогенных сигнальных путей. Существенно меньше известно о роли межклеточных взаимодействий, в частности экзосом, в развитии и распространении резистентности.

Целью настоящей работы явилось изучение роли экзосом и экзосомальных микроРНК в развитии гормональной резистентности клеток рака молочной железы. В экспериментах на эстрогензависимых клетках рака молочной железы MCF-7 и тамоксифен-резистентной сублинии MCF-7/T получены прямые доказательства распространения резистентности от резистентных к чувствительным клеткам с участием экзосом. Развитие экзосом-индуцированной резистентности сопровождается подавлением активности рецептора эстрогенов и одновременной активацией PI3K/Akt сигналинга. Анализ состава экзосомальных микроРНК выявил повышенное содержание в экзосомах резистентных клеток miR-181, непосредственно участвующей в активации PI3K сигналинга. Мы показали, что трансфекция miR-181 в родительские клетки MCF-7 приводит к развитию частичной резистентности к тамоксифену, что свидетельствует об участии экзосомальной miR-181 в формировании резистентного фенотипа опухолевых клеток

The efficiency of hormonal therapy is limited by the progression of tumor resistance to hormonal drugs associated with the inhibition of hormonal machinery and / or compensatory activation of mitogenic signaling pathways. Significantly less is known about the role of cell-to-cell interactions and exosomes in the hormone resistance development.

The main goal of the present work is the study of role of exosomes and exosomal microRNA in the development of hormonal resistance of breast cancer cell. In the experiments with the estrogen-dependent breast cancer cells MCF-7 and tamoxifen-resistant subline MCF-7/T we have got direct evidence of hormone resistance transfer from resistant cells to sensitive cells and demonstrated that exosomes are directly involved in development of acquired resistance. The progression of exosome-induced resistance was accompanied with the inhibition of estrogen receptor signaling and simultaneous activation of PI3K/Akt pathway. The analysis of exosomal microRNA showed that exosomes from the resistant cells were enriched with the miR-181 which is one of the activators of PI3K/Akt signaling. Mir-181 transfection was found to induce the partial tamoxifen resistance of

MCF-7 cells demonstrating the direct involvement of mir-181 in the formation of the resistant phenotype of cancer cells.

Гормональная терапия относится к одному из наиболее распространенных видов лечения гормонозависимых злокачественных новообразований, в первую очередь опухолей репродуктивной системы: рака молочной железы, яичника, эндометрия, опухолей предстательной железы. Несмотря на безусловную эффективность гормональной терапии, ее применение ограничено развитием резистентности опухолей к гормонам, которая может носить врожденный характер либо развиваться по мере гормональной терапии. Как правило, развитие гормональной резистентности вызвано либо необратимым блоком гормональной сигнализации (подавлением активности или синтеза специфических внутриклеточных рецепторов гормонов), либо активацией регулирующих рост сигнальных путей, идущих в обход гормонозависимого сигналинга.

Существенно меньше известно о роли межклеточных взаимодействий, в частности экзосом, в развитии гормональной резистентности опухолей. Экзосомы представляют собой продуцируемые клетками образования размером 30–100 нм, содержащие часть цитоплазмы клеток, окруженную фрагментом плазматической мембраны. Интерес исследователей к экзосомам существенно возрос после того, как была обнаружена способность экзосом инкорпорироваться и переносить свое содержимое в клетки-реципиенты, доставляя в последние биологические молекулы самого широкого спектра действия, в том числе факторы роста, цитокины, рецепторы, биоактивные липиды и различные виды РНК. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области является изучение экзосомальных микроРНК и их значения в развитии резистентности злокачественных опухолей.

На сегодняшний день убедительно продемонстрировано участие микроРНК в развитии гормональной резистентности опухолей. Это, прежде всего, микроРНК, участвующие в негативной регуляции рецептора эстрогенов (miR-342, Let7b/Let-7i, miR-1280); микроРНК, мишенью которых являются белки-коактиваторы / корепрессоры рецептора эстрогенов (miR-17-5p, miR-10, miR-451). Среди белков-онкосупрессоров особое место занимает PTEN, являющийся мишенью для целого ряда микроРНК, ассоциированных с гормональной резистентностью (miR-101, miR-181). Показано, что как минимум некоторые из этих микроРНК могут переноситься экзосомами, что свидетельствует об их потенциальном значении в межклеточном распространении гормональной резистентности.

В настоящей работе в экспериментах на эстрогензависимых клетках рака молочной железы MCF-7 и тамоксифен-резистентной сублинии MCF-7/T получены прямые доказательства распространения резистентности от резистентных к чувствительным клеткам и продемонстрировано непосредственное участие экзосом в развитии приобретенной резистентности. Мы показали, что регулярное добавление (в течение 10 сут.) к клеткам MCF-7 экзосом, полученных от резистентных клеток MCF-7/T, приводит к развитию частичной резистентности клеток MCF-7 к тамоксифену. В то же время экзосомы, полученные от родительских клеток MCF-7, не обладают такой активностью, и их добавление не приводит к изменению гормональной чувствительности клеток. Обнаружено, что как в исходной резистентной сублинии MCF-7T, так и в сублинии, полученной после культивирования клеток MCF-7 с экзосомами резистентных клеток, наблюдаются общие изменения внутриклеточного сигналинга: существенное снижение активности ERalpha с одновременной активацией PI3K/Akt-сигналинга и ключевых транскрипционных факторов AP-1 и NF-kB.

Сравнительный анализ состава микроРНК экзосом выявил более 450 микроРНК, гиперэкспрессированных в экзосомах резистентных клеток. При последующем биоинформатическом анализе были идентифицированы 2 микроРНК, miR-101 и miR-181, непосредственно участвующие в активации PI3K сигналинга — преимущественно через подавление экспрессии фосфатазы PTEN.

На заключительной стадии экспериментов исследовалось влияние miR-181 на уровень гормональной чувствительности клеток. Мы обнаружили, что трансфекция miR-181 в родительские клетки MCF-7 приводит к стимуляции эстрогеннезависимого роста клеток и

частичной резистентности к тамоксифену, развивающегося на фоне активации PI3K/Akt сигналинга. В целом полученные данные свидетельствуют о непосредственном участии miR-181 в формировании резистентного фенотипа опухолевых клеток и позволяют рассматривать miR-181 как одну из потенциальных мишеней при направленной терапии эстрогеннезависимых форм рака молочной железы.

Работа поддержана РФФИ, проект № 18-29-09016.

ПЦР — МАГИЯ, ИСКУССТВО ИЛИ ТЕХНОЛОГИЯ?

PCR — MAGIC, ART, OR TECHNOLOGY?

О. Н. Михайлова, Е. Подвальный

ООО «БиоФармЭксперт», Санкт-Петербург, Россия

O. N. Mikhailova, E. Podvalni

BioPharmExpert LLC., St Petersburg, Russia

e-mail: pcr@biopharmexpert.com

Для получения **достоверных и воспроизводимых** результатов ПЦР независимо от амплификатора, оператора и лаборатории необходимо регулярно проводить **динамическую многоканальную калибровку** термоблока. Полученные в процессе калибровки данные позволяют **стандартизовать** процесс ПЦР и получать **воспроизводимые и достоверные результаты** независимо от того, **кто, где и на каком приборе** проводит анализ ПЦР.

Ключевые слова: калибровка ПЦР амплификатора, стандартизация ПЦР

To obtain **reproducible and reliable** results regardless of the PCR cycler, operator and laboratory, it is necessary to regularly conduct a **dynamic multi-channel calibration** of the thermoblock. The data obtained during the calibration process allows to **standardize** the PCR process and to obtain **reproducible and reliable** results regardless of **who, where** and on **which device** performs the PCR analysis.

Keywords: PCR Calibration, PCR Standardization

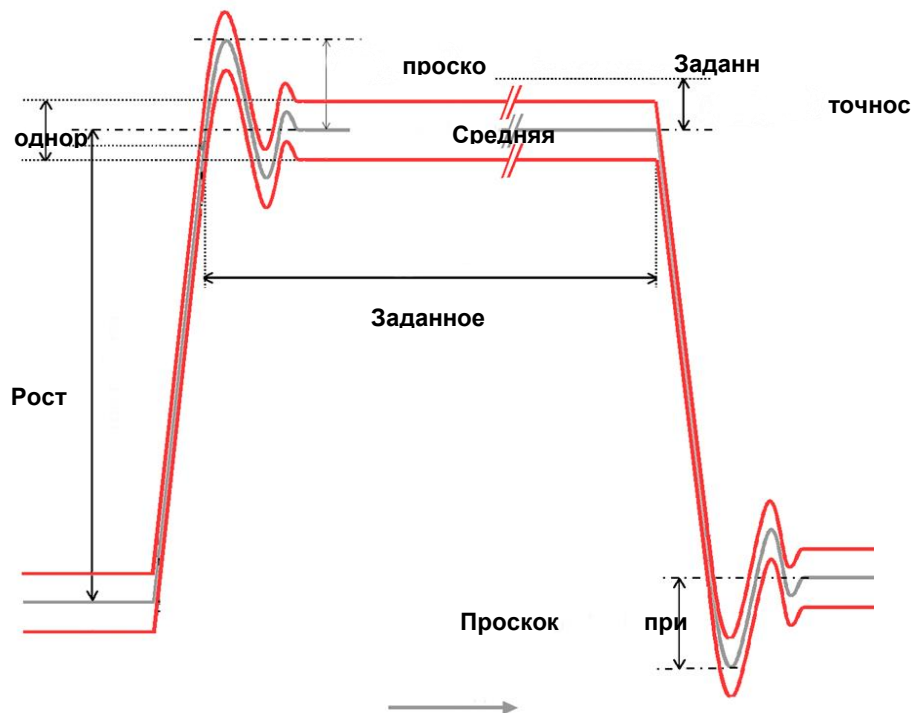
В настоящее время кПЦР является наиболее распространенным методом молекулярной диагностики благодаря своей универсальности, специфичности и чувствительности. Подавляющее большинство лабораторий в погоне за высокими технологиями приобретают дорогостоящее современное оборудование, предполагая, что это и есть гарантия получения достоверных результатов анализов. Однако это приводит к тому, что результаты, полученные на таком оборудовании, заведомо не подвергаются какому-либо сомнению и критическому осмыслению. И в этом кроется существенная опасность: любой результат воспринимается как 100 % достоверный.

Однако нередко один и тот же образец, проанализированный в разных лабораториях, дает абсолютно разные результаты, причем не только количественные, но и качественные. Другими словами, лаборатории выдают ложноотрицательные или ложноположительные результаты.

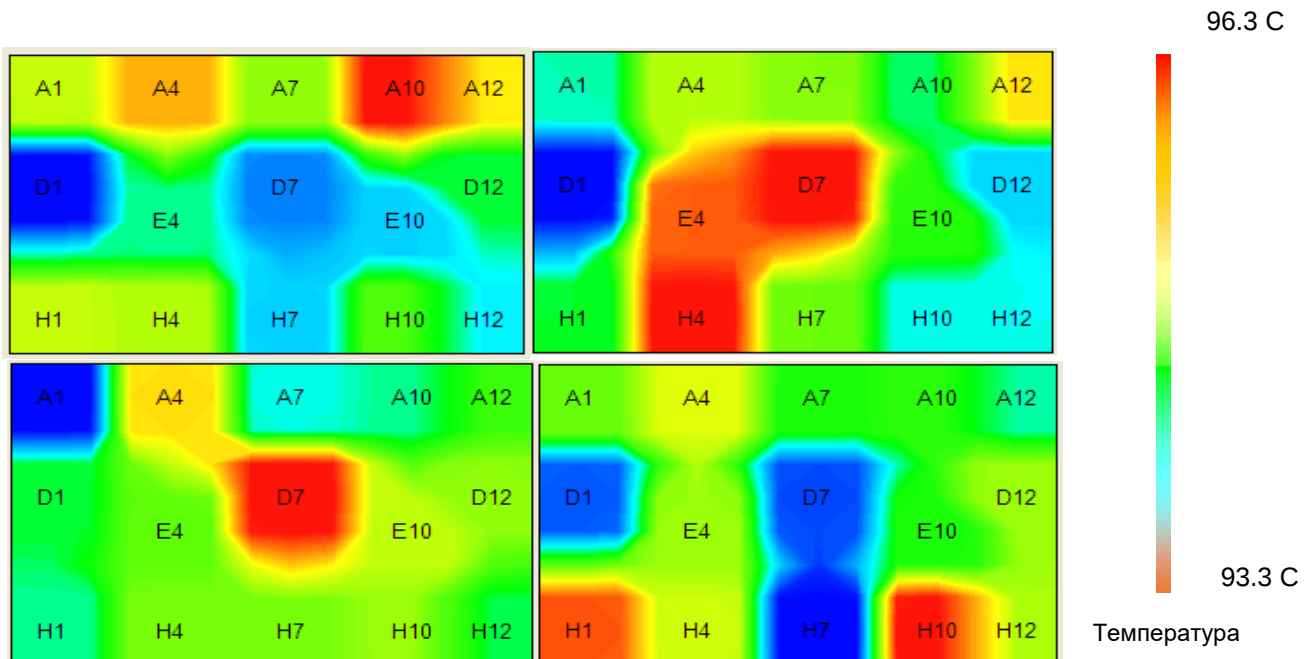
Для понимания причин такого большого разброса результатов необходимо вспомнить основной принцип метода ПЦР — циклическое нагревание и охлаждение пробы, где точность температуры чрезвычайно критична. Даже небольшие отклонения от заданных значений — порядка 1°C — приводят к получению недостоверного результата.

При работе амплификатора мы видим только одну температуру — среднюю по термоблоку, хотя температурный профиль в реальном времени намного сложнее и включает в себя:

- неоднородность температуры по термоблоку;
- проскоки во время нагрева и охлаждения — отклонение может достигать 5–8°C и длиться до 15–20 с.;
- отклонение от заданной температуры.



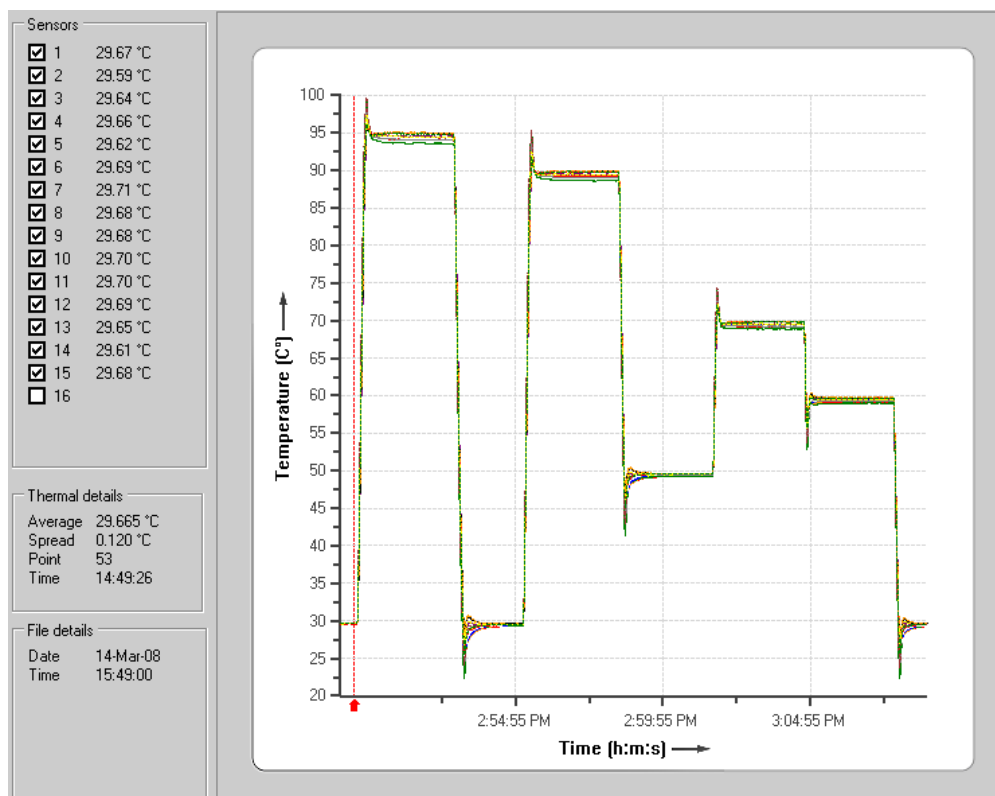
Конструкционные различия разных моделей амплификаторов, а также различия в режимах эксплуатации, приводят к значительному расхождению заданной температуры и реальной. Каждый прибор обладает своим уникальным распределением горячих и холодных зон по термоблоку.



Для решения этой проблемы необходима стандартизация метода.

Компания БиоФармЭксперт предлагает уникальную многоканальную динамическую калибровку термоблоков амплификаторов в лаборатории клиента без прерывания рабочего процесса, представляя в России технологию CYCLERtest (Нидерланды).

Технология запатентована и на протяжении многих лет успешно используется по всему миру, в том числе Европе и США, для калибровки термоциклеров во всех диагностических и исследовательских лабораториях. Лаборатории, имеющие аккредитацию по ИСО 17025 или 15189, а также аккредитованные по другим международным стандартам, обязаны проводить калибровку. Однако и остальные лаборатории, которые заботятся о своей репутации и качестве выдаваемых результатов, также регулярно калибруют свои амплификаторы с помощью технологии CYCLERtest – как минимум, раз в год.



После калибровки пользователь получает детализированный отчет по состоянию амплификатора в динамическом режиме, на котором виден реальный температурный профиль на всех участках нагрева / охлаждения.

Полученные в процессе калибровки данные позволяют:

- стандартизировать процесс ПЦР;
- создавать лабораторные СОПы с привязкой к реальной температуре;
- получать **воспроизводимые и достоверные результаты** независимо от того, **кто, где и на каком приборе** проводит процесс ПЦР.

Таким образом, даже для формального соответствия международным стандартам качества, лаборатории необходимо калибровать ПЦР-амплификаторы минимум раз в год, а для получения достоверных результатов иногда и чаще, в зависимости от режима использования прибора, вида анализов и других параметров.

**АНАЛИЗ МИКРО-РНК ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧНЫХ ЭКЗОСОМ — НОВЫЙ МЕТОД
ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ЭФФЕКТА ТЕРАПИИ РАКА
ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**PROSTATE-SPECIFIC EXOSOMES MICRORNA ANALYSIS AS A NEW METHOD FOR
DIAGNOSTICS AND MONITORING OF PROSTATE CANCER THERAPY EFFECT**

*Н. С. Никифорова^{1,2}, Р. Б. Самсонов^{1,2}, А. К. Носов¹,
Н. А. Назмиева¹, В. В. Шаройко³, А. В. Малек^{1,2}*

¹ ФГБОУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ООО «Онко-система», Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*N. S. Nikiforova^{1,2}, R. B. Samsonov^{1,2}, A. K. Nosov¹,
N. A. Nazmиеva¹, V. V. Sharoyko³, A. V. Malek^{1,2}*

¹ Prof. N. N. Petrov Research Institute of Oncology, Saint Petersburg, Russia

² “Oncosystem” Ltd., Moscow, Russia

³ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Saint-Petersburg State University”, Saint Petersburg, Russia

Разработан метод диагностики рака предстательной железы, который содержит две составляющие: выделение простат-специфических экзосом осаждением биотинилированными антителами против простат-специфического мембранного антигена на магнитных частицах со стрептавидином и последующий анализ экзосомальных микроРНК полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией в режиме реального времени. При выделении специфических экзосом продемонстрирована возможность замены антител на аптамеры

Ключевые слова: рак предстательной железы, экзосомы, аптамеры, микроРНК, молекулярные маркеры

A method for diagnosing prostate cancer has been developed. The method contains two components: the prostate-specific exosomes isolation by precipitation with biotinylated antibodies against prostate-specific membrane antigen on magnetic particles with streptavidin and the subsequent exosomal microRNA analysis by real-time polymerase chain reaction. The possibility of replacing antibodies with aptamers during the isolation specific exosomes has been demonstrated.

Keywords: prostate cancer, exosomes, aptamers, miRNA, molecular markers

Заболеваемость и смертность от рака предстательной железы (РПЖ) с каждым годом растет. В нашей стране РПЖ в структуре онкологической заболеваемости переместился с 4 на 2 место и составил 14 % от всех злокачественных новообразований у мужчин, что сопоставимо с аналогичными показателями в странах западной Европы и США, но смертность от РПЖ в России выше, чем в большинстве развитых стран, и составляет 8 % от общей онкологической

смертности. Основной причиной высокой смертности является поздняя диагностика, неэффективность методов скрининга и недостаточная мотивация населения к проведению профилактических обследований.

Сейчас основной диагностический подход — определение в крови уровня простатического специфического антигена (ПСА). Если уровень высок, требуются биопсия, УЗИ, магнитно-резонансное сканирование (MRI) ПЖ. ПСА — протеаза химотрипсिनотипа, вырабатываемая как нормальными, так и опухолевыми клетками выводных протоков предстательной железы (ПЖ). В норме небольшое количество ПСА поступает в эякулят и секрет ПЖ и очень незначительное количество попадает в кровь. Повышение уровня ПСА в плазме наблюдается в случае любых патологических процессов в ПЖ, включая воспаление и доброкачественную гиперплазию — часто встречающихся заболеваний. Этот факт определяет низкую специфичность ПСА-теста: 20–40 % ($AUC = 0,55–0,70$) [1]. Также начальные этапы развития РПЖ или рост опухоли с низкой степенью дифференцировки клеток могут вовсе не сопровождаться повышением ПСА плазмы, что компрометирует чувствительность теста.

Одним из альтернативных методов ранней неинвазивной диагностики РПЖ считается тест-система, основанная на количественном анализе РСА3 — РНК-продукта антигена РПЖ. Опубликованные статьи показали, что РСА3 экспрессируется только в ткани ПЖ человека и избыточно экспрессируется у пациентов с РПЖ. Из-за ограниченного профиля экспрессии уровень РСА3 считался перспективным биомаркером РПЖ. РСА3 относится к некодирующим РНК и гиперэкспрессируется в тканях злокачественных опухолей ПЖ, а РНК-продукт этого гена присутствует в моче и эякуляте. В связи с этим количественный анализ РНК РСА3 в моче стал использоваться для неинвазивной диагностики РПЖ. Так как число клеток в моче невелико, то для увеличения их количества проводится пальцевое ректальное исследование (ПРИ) с последующим массажем ПЖ, что усложняет процедуру сбора биоматериала. Более того, результаты исследования [2] показали, что тест-система, основанная на РСА3, обладает ложноположительным показателем в 25 %. Ряд новых зарубежных тест-систем (например, STNLM3, 4Kscore Test и др.), основанных на комбинациях молекулярных маркеров свободного и общего ПСА, РСА3, hK2, MSMB или MIC1, имеет ряд недостатков. Таким образом, существует острая необходимость в разработке новых стратегий диагностики РПЖ на ранних стадиях.

Новой и перспективной стратегией ранней диагностики онкологических заболеваний представляется разработка методов «жидкостной биопсии» на основе детекции мультимолекулярных маркеров онкологических заболеваний. Судя по динамике роста числа публикаций, особый интерес исследователей фокусируется на разработке методик выделения и анализа циркулирующих внеклеточных нано-везикул. Такие везикулы «отражают» биохимический состав клеток-продуцентов и, соответственно, их состав приобретает характерные черты в ходе / в результате неопластической трансформации клеток [3]. Нормальная плазма содержит огромное количество различных везикулярных образований, среди которых выделяют экзосомы, имеющие размер 50–130 нм и концентрацию $10^{10}–10^{12}$ /мл (в зависимости от метода измерения). Основная популяция экзосом плазмы — это везикулы, секретируемые клетками крови и эндотелием. Экзосомы, попадающие в плазму из клеток определенных тканей, составляют незначительную фракцию, а их количество определяется относительной массой и секреторной активностью ткани. Эмпирически можно предполагать, что экзосомы, секретируемые клетками ПЖ, составляют лишь сотые доли процента от общего пула экзосом плазмы. Но именно эта минорная фракция циркулирующих везикул имеет огромный диагностический потенциал, что определяет активность исследований с целью разработки теоретических основ и методов изоляции этих везикул [4].

Очевидно, что белковый состав мембран экзосом, секретируемых клетками ПЖ, имеет сходства с мембраной этих клеток. В основе методов выделения простат-специфичных экзосом (ПСЭ) лежат различные технологии связывания простат-специфичных белковых маркеров. В ряде работ показано, что таким маркером может служить простат-специфичный мембранный антиген (ПСМА). ПСМА экспрессируется в нормальных, доброкачественных и

злокачественных тканях РПЖ, включая интраэпителиальную неоплазию и метастатические образцы [5]. С целью выделения ПСЭ, экзосомальный ПСМА может быть связан с помощью специфических антител [3] или аптамеров [6]. Затем может быть применена любая из описанных технологий последующего выделения ПСМА-позитивных экзосом из общей популяции нановезикул: с помощью спин-колонок, латексных или магнитных частиц, микрофлюидных чипов и др.

Цель нашего исследования — разработка метода ранней диагностики и мониторинга эффективности лечения РПЖ с помощью выделения ПСЭ и последующего анализа экзосомальных микроРНК. Диагностический потенциал этих молекул в составе экзосом был показан в наших ранних исследованиях [4, 7]. В рамках работы были протестированы различные антитела к ПСМА и методики связывания ПСМА-позитивных экзосом. Разработана технология выделения экзосом с помощью биотинилированных антител к ПСМА и модифицированных стрептавидином магнитных частиц. Для оценки эффективности методики были использованы биологические образцы, полученные от доноров мужчин и женщин и пациентов с разным статусом заболевания РПЖ. Также проведены эксперименты и получены предварительные результаты, демонстрирующие возможность использования аптамеров (синтетических нуклеиновых кислот) как альтернативной технологии связывания ПСМА и ПСМА-позитивных экзосом. В исследовании использованы такие методы, как дот-блоттинг и проточная цитометрия.

Профиль экзосомальных микроРНК был оценен с помощью ОТ-качественной ПЦР различными подходами «широкого профилирования» и индивидуального анализа «маркерных» молекул. Для ряда микроРНК показана специфичность представленности в ПСМА-позитивных экзосомах, выделенных из плазмы мужчин и женщин, здоровых доноров и пациентов с РПЖ. На основе разработанной технологии планируется создание и последующая клиническая валидация метода ранней диагностики РПЖ, предикции эффекта различных вариантов радиотерапии и мониторинга эффекта лечения заболевания.

Список литературы

1. *Batra J. S., Girdhani S., Hlatky L. A Quest to Identify Prostate Cancer Circulating Biomarkers with a Bench-to-Bedside Potential // Journal of biomarkers. 2014. Vol. 2014. P. 321680.*
2. *Wu-Jin X., Xiu-Li Y., Jin-Hong J. et al. Prostate cancer antigen 3 as a biomarker in the urine for prostate cancer diagnosis: A meta-analysis // Journal of cancer research and therapeutics. 2014. Vol. 10(7). P. 218–221.*
3. *Малек А. В., Самсонов Р. Б., Къези А. Перспективы разработки методов диагностики и мониторинга онкологических заболеваний на основе анализа экзосом, секретируемых опухолевыми клетками // Российский биотерапевтический журнал. 2015. № 14(4). С. 9–18.*
4. *Padda R. S., Deng F. K., Brett S. I. et al. Nanoscale flow cytometry to distinguish subpopulations of prostate extracellular vesicles in patient plasma // The Prostate. 2019. Vol. 79(6). P. 592–603.*
5. *Huqe M. C., Philippi C., Roth D. et al. Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) on Biopsies Is an Independent Risk Stratifier of Prostate Cancer Patients at Time of Initial Diagnosis // Front. Oncol. 2018.*
6. *Lupold S. E. Aptamers and apple pies: a mini-review of PSMA aptamers and lessons from Donald S. Coffey // Am. j. of clin. and exp. urology. 2018. Vol. 6(2). P. 78–86.*
7. *Samsonov R., Shtam T., Burdakov V. et al. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic // The Prostate. 2016. Vol. 76(1). P. 68–79.*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКА ЯИЧНИКОВ

MOLECULAR GENETIC DIAGNOSIS OF HEREDITARY BREAST AND OVARIAN CANCER

*Е. И. Новикова, Г. П. Снигирева, Е. Н. Тельшева, Н. Н. Новицкая,
Е. Г. Шайхаев, Е. Д. Хазинс, Т. В. Григорьева*

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава РФ, Москва, Россия

*E. I. Novikova, G. P. Snigireva, E. N. Telysheva, N. N. Novitskaya,
E. G. Shaikhaev, E. D. Khazins, T. V. Grigorieva*

FBSI «Russian Research Center of Roentgenoradiology» Ministry of Health, Moscow, Russian Federation

e-mail: e.novikova.ncrr@mail.ru

Целью исследования являлась оценка спектра и частоты наследственных мутаций у больных раком молочной железы и раком яичников. На первом этапе обследования всем пациентам проводилось ДНК-тестирование на наличие распространенных в российской популяции наследственных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* методом ПЦР в реальном времени. На втором этапе обследования было проведено исследование методом секвенирования «нового поколения» (NGS) с использованием панели «TruSight Cancer» («Illumina»). Данным методом были обследованы пациенты из группы повышенного риска, у которых на первом этапе обследования не были обнаружены мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Использование метода NGS позволило значительно повысить эффективность выявления наследственного характера заболевания у больных раком молочной железы и раком яичников, доказав наличие широкого спектра и высокой частоты редких патогенных мутаций как в генах *BRCA1* и *BRCA2*, так и в других генах предрасположенности.

Ключевые слова: наследственные мутации, рак молочной железы, рак яичников, NGS

The aim of the study was to assess the spectrum and frequency of hereditary mutations in patients with breast and ovarian cancer. At the first stage of the study, all patients underwent DNA testing for the presence of common in the Russian population hereditary mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes using real-time PCR. At the second stage of the study, a «new generation» sequencing method (NGS) was applied using the «TruSight Cancer» panel («Illumina»). This method examined patients from the high-risk group without mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes, which were determined at the first stage of the study. The use of the NGS method has significantly increased the efficiency of detecting the hereditary nature of the disease in patients with breast and ovarian cancer, proving the presence of a wide spectrum and a high frequency of rare pathogenic mutations both in the *BRCA1* and *BRCA2* genes, and in other predisposition genes.

Keywords: hereditary mutations, breast cancer, ovarian cancer, NGS

Среди факторов, предрасполагающих к развитию рака молочной железы (РМЖ) и рака яичников (РЯ), ведущую роль отводят гормональному и генетическому. По отношению к

генетическому фактору выделяют спорадический (ненаследственный) и наследственный рак, который составляет 5–10 % всех случаев заболевания РМЖ [1] и 10–17 % всех случаев заболевания РЯ [2] и характеризуется наличием мутаций в генах, вовлеченных в процесс репарации, регуляцию клеточного цикла, апоптоз, дифференцировку клеток (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *STK11*, *PTEN*, *ATM*, *CHEK2*, *BRIP1*, *PALB2* и др.). Установление наследственного характера заболевания у онкологических больных необходимо для выбора адекватной тактики лечения, а также профилактики развития второго РМЖ и РЯ.

Подавляющее число случаев наследственного РМЖ и РЯ связаны с мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*, которые кодируют белки, играющие ключевую роль в поддержании целостности генома [3]. Поэтому в настоящее время в России для выявления наследственного характера заболевания большинство лабораторий используют стандартные диагностические панели, с помощью которых методом ПЦР можно быстро и относительно недорого выявлять наиболее распространенные в российской популяции мутации в генах предрасположенности *BRCA1* и *BRCA2*, однако это может приводить к некоторому числу ложноотрицательных результатов из-за наличия редких генетических повреждений в данных генах. Кроме того, использование таких панелей не позволяет проводить оценку мутационного статуса других генов предрасположенности.

Целью исследования являлась оценка спектра и частоты наследственных мутаций у больных РМЖ и РЯ.

Настоящая работа основана на анализе результатов молекулярно-генетического обследования 4671 пациента с диагнозом РМЖ и / или РЯ: 4131 больных РМЖ, 231 — РЯ, 309 — с первично-множественными новообразованиями (РМЖ и / или РЯ). Все пациенты проходили обследование и лечение в ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России с 2010 по 2018 годы и подписали информированное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования.

С учетом рекомендаций Национальной онкологической сети США (National Comprehensive Cancer Network, NCCN) среди больных РМЖ была выделена группа повышенного риска — с клиническими признаками наследственного заболевания (КПНЗ), которые включали: молодой возраст манифестации заболевания (до 50 лет); трижды негативный РМЖ, диагностированный в возрасте до 60 лет; онкологически отягощенный семейный анамнез (наличие по крайней мере одного родственника первой или второй степени родства с диагнозом РМЖ, установленном в возрасте до 50 лет, либо наличие по крайней мере одного родственника первой или второй степени родства с диагнозом РЯ, установленном в любом возрасте, либо наличие по крайней мере двух родственников первой и / или второй степени родства с диагнозом РМЖ, рак предстательной железы и / или рак желудка, установленный в любом возрасте). В данную группу вошли 897 человек.

На первом этапе обследования всем пациентам проводилось ДНК-тестирование на наличие распространенных в российской популяции наследственных мутаций в генах предрасположенности *BRCA1* и *BRCA2* (185delAG, 4153delA, 5382insC, 3819delGTTAA, 3875delGTCT, 300T>G, 2080delA (*BRCA1*) и 6174delT (*BRCA2*)) методом ПЦР в реальном времени.

Методом ПЦР в группе больных РМЖ у 3,1 % пациентов были выявлены мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, входящие в стандартные диагностические панели. Частота данных мутаций в группе пациентов с КПНЗ, в которую вошли 897 человек, оказалась в 4,6 раза выше и составила 14,3 %. Частота распространенных в российской популяции наследственных мутаций в группах больных РЯ и пациентов с первично-множественными новообразованиями (РМЖ и / или РЯ) составила 12,1 и 13,3 % соответственно. В спектре выявленных изменений преобладала мутация 5382insC. Ее частота в общей группе больных РМЖ составила 2,3 %, а в группе пациентов с КПНЗ — 10,7 %, т. е. она встретилась у каждого девятого пациента из группы повышенного риска. Частота мутации 5382insC в группах больных РЯ и пациентов с первично-множественными новообразованиями (РМЖ и / или РЯ) составила 8,7 и 10 % соответственно. Доля данного варианта среди выявленных мутаций в обследованных группах

составила от 71,4 до 75,6 %. Частота остальных мутаций была по крайней мере на порядок ниже.

На втором этапе обследования было проведено исследование методом секвенирования «нового поколения» (NGS) с использованием панели «TruSight Cancer» («Illumina»), которая позволяет проанализировать кодирующие области 94 генов, повреждения которых ассоциированы с повышенным риском развития онкологических заболеваний. Данным методом были обследованы 234 больных РМЖ с КПНЗ, 64 больных РЯ и 56 пациентов с первично-множественными новообразованиями (РМЖ и / или РЯ), у которых на первом этапе обследования не были обнаружены мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, входящие в стандартные диагностические панели.

В результате молекулярно-генетического исследования методом NGS у 12,4 % больных РМЖ, у 14,1 % больных РЯ и у 19,6 % пациентов с первично-множественными новообразованиями (РМЖ и / или РЯ) были обнаружены редкие гетерозиготные патогенные варианты в генах *BRCA1* и *BRCA2*. С наибольшей частотой в обследуемых группах встретились мутация с.3607C>T в гене *BRCA1*, которая была найдена у трех больных. Дважды встретились мутации с.4689C>G, с.5224C>T, с.1510delC, с.4165_4166delAG, с.5152+1G>T в гене *BRCA1*, с.1301_1304delAAAG, с.9089_9090insA и с.3283C>T — в гене *BRCA2*.

Методом NGS у 13,7 % больных РМЖ, у 14 % больных РЯ и у 16,1 % пациентов с первично-множественными новообразованиями (РМЖ и / или РЯ) выявлены патогенные варианты в генах *CHEK2*, *ATM*, *PALB2*, *BRIP1*, *BLM*, *NBN*, *MUTYH*, *ERCC2*, *ERCC3*, *FANCM*, *FANCC*, *PTCH1*, *MITF*, *NF1*, *HOXB13*, *FLCN*, *WRN* и *TP53*.

Таким образом, использование метода NGS позволило значительно повысить эффективность выявления наследственного характера заболевания у больных РМЖ и РЯ, доказав наличие широкого спектра и высокой частоты редких патогенных мутаций как в генах *BRCA1* и *BRCA2*, так и в других генах предрасположенности к развитию онкологических заболеваний.

Список литературы

1. *Имянитов Е. Н.*, Наследственный рак молочной железы // Практическая Онкология. 2010. Т.11. С. 258–266.
2. *Любченко Л. Н., Батенева Е. И., Абрамов И. С. и др.* Наследственный рак молочной железы и яичников // Злокачественные опухоли. 2013. № 2. С. 53–61.
3. *Gudmundsdottir K., Ashworth A.* The roles of *BRCA1* and *BRCA2* and associated proteins in the maintenance of genomic stability // Oncogene. 2006. Vol. 25, № 43. P. 5864–5874.

**АМПЛИФИКАЦИИ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ — НОВЫЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ
МАРКЕРЫ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ С РАННЕЙ ФОРМОЙ РАКА
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**AMPLIFICATION OF STEM GENES IS A NEW POTENTIAL MARKERS FOR
METASTASIS IN PATIENTS WITH AN EARLY FORM OF BREAST CANCER**

*А. М. Певзнер, М. М. Цыганов, М. К. Ибрагимова,
Е. М. Слонимская, Н. В. Литвяков*

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский
медицинский центр РАН, Томск, Россия

*A. M. Pevzner, M. M. Tsyganov, M. K. Ibragimova,
E. M. Slonimskaya, N. V. Litvyakov*

Research Institute of Oncology, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy
of Sciences, Tomsk, Russia

e-mail: alin.pevzner@gmail.com

Несмотря на то что сегодня существуют различные, в том числе и многофакторные модели прогноза у пациентов ранним раком молочной железы, практически все они могут лишь с небольшой и относительной точностью прогнозировать исход заболевания данных больных. Согласно нашим предыдущим исследованиям, наличие амплификаций локусов генов стволовости (3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 10q21.3, 13q, 16p, 19p) может приводить к их эктопической экспрессии и это сопряжено с повышенной активностью опухолевых стволовых клеток у этих больных. Это приводит к высокой агрессивности опухоли и развитию метастатической болезни. Целью работы явилась оценка прогностической значимости наличие амплификаций локусов генов стволовости и их экспрессии у больных ранним раком молочной железы.

Ключевые слова: ранний рак молочной железы; метастазирование; стволовость; хромосомные абберации

Despite the fact that today there are various, including multifactorial models of prognosis in patients with early breast cancer, almost all of them can only predict the outcome of the disease of these patients with small and relative accuracy. According to our previous studies, the presence of amplifications of loci of stem genes (3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 10q21.3, 13q, 16p, 19p) can lead to their ectopic expression and this is associated with an increased activity of tumor stem cells in these patients. This leads to a high aggressiveness of the tumor and the development of metastatic disease. The aim of the work was to study the prognostic significance of stem gene amplifications in the T1NxM0 mammary tumor.

Keywords: early breast cancer; metastasis; stem; chromosome aberrations

Выявляемость пациенток с I–II стадиями рака молочной железы с 1993 по 2013 годы выросла на 10 % (с 57,6 до 66,7 %). На данный момент основным методом лечения таких больных является органосохраняющая операция, обеспечивающая высокое качество жизни.

Несмотря на это частота рецидивирования больных с I стадией РМЖ (T1a, T1b и T1c) достигает 22 %, а пятилетняя безрецидивная и общая выживаемость в общей популяции составляет 84,3 и 93,4 % соответственно. Интересно, что, несмотря на высокие показатели выживаемости, только опухоли размером T1a имеют благоприятный исход, а T1b и T1c являются более агрессивными, что ухудшает прогноз заболевания. Таким образом, выявление маркеров рецидивирования на ранних стадиях заболевания является необходимым для улучшения прогноза заболевания и определения необходимости проведения неoadъювантной / адъювантной химиотерапии.

Материалы и методы. В исследование были включены 18 больных раком молочной железы I стадии с гистологически верифицированным диагнозом. В качестве исследуемого материала, были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³) и архивный материал формалин-фиксированные парафиновые блоки. ДНК выделяли из всех исследуемых образцов. Микроматричный анализ был использован для изучения CNA-генетического ландшафта опухоли и определения наличия в опухоли амплификаций в локусах генов стволости: 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 18chr, 19p (*TERT*, *LIFR*, *OCT3*, *SOX4*, *NOTCH4*, *BMP6*, *FZD9*, *FZD1*, *WNT2*, *SMO*, *SNAI2*, *MYC*, *MOB3B*, *ALDH1A1*, *TGFBR1*, *KLF4*, *NOTCH1*, *KLF6*, *VIM*, *BMI1*, *ZEB1*, *ITGB1*, *NANOG*, *FLT3*, *SMAD9*, *KLF5*, *ZIC2*, *SOX1*, *LAT*, *SMAD2*, *SMAD4*, *LMNB2*, *INSR*, *KLF1*, *KLF2*, *TGFB1*). Оценивали их связь с метастазированием.

Результаты. 12 пациентам неoadъювантная химиотерапия (НХТ) не проводилась. У пяти этих больных не было гематогенных метастазов и у семи пациентов были гематогенные метастазы. Анализ CNA-генетического ландшафта опухолей показал, что у пяти пациентов в группе без метастазов не было в опухоли двух и более амплификаций хромосомных регионов 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 18chr, 19p, в которых локализованы гены стволости. Шесть из семи больных с метастазами имели две и более амплификации. Исключением стала пациентка Е., у которой наблюдался метастаз в кости через три года, несмотря на то, что имелась всего одна амплификация генов стволости.

Остальную группу больных ($n = 6$) составили пациенты с НХТ. У всех этих пациентов обнаружены в опухоли 2 и более амплификации хромосомных регионов. Важно отметить, что в процессе НХТ наблюдалось уменьшение или полная элиминация клонов. Все пациенты имеют 100%-ю пятилетнюю безметастатическую выживаемость.

Заключение. Таким образом, было показано, что только в опухоли больных с метастазами наблюдаются 2 и более амплификации изучаемых хромосомных регионов, это подтверждает и дает основания полагать, что амплификации локусов генов стволости являются новыми потенциальными маркерами метастазирования и их наличие, даже на ранней стадии, приводит к метастазированию.

Работа поддержана грантом РФФ № 17-15-01203 «Метастатические клоны опухоли молочной железы».

ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА — ТРИГГЕРНЫЙ ФАКТОР РАЗВИТИЯ ОПУХОЛИ

HUMAN PAPILLOMAVIRUS — TRIGGER FACTOR FOR TUMOR DEVELOPMENT

Н. Г. Плехова, В. И. Апанасевич, Е. А. Подолянчук, Н. В. Накцова

Центральная научно-исследовательская лаборатория, Новосибирск, Россия
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,
Владивосток, Россия

Доказано, что рак шейки матки развивается в результате приобретенной половым путем инфекции онкогенными типами вируса папилломы человека (ВПЧ), роль которых в качестве этиологического фактора формирования рака молочной железы изучается. В биопсийных образцах ткани злокачественных и доброкачественных опухолей молочной железы и ткани без признаков патологии, прилежащих к опухолям, с использованием количественного ПЦР-анализа и иммуногистохимического метода исследовано наличие ДНК и белков ВПЧ. В биопсийных образцах доброкачественных новообразований не обнаружено вирусной ДНК, тогда как иммуногистохимическое изучение выявило позитивную реакцию вирусного антигена в этих же образцах. Также отмечались морфологические изменения эпителия протоков и появление койлоцитов. Таким образом, полученные данные указывают на необходимость обследования женщин на наличие ВПЧ не только при обнаружении неопластических поражений цервикса, но и при формировании новообразований в молочной железе.

It has been proven that cervical cancer develops as a result of a sexually acquired infection with oncogenic types of human papillomavirus (HPV), whose role as an etiological factor in the formation of breast cancer is being studied. In biopsy specimens of malignant and benign breast and tissue tumors without signs of pathology adjacent to the tumors, the presence of DNA and HPV proteins was studied using quantitative PCR analysis and immunohistochemical method. In biopsy samples of benign neoplasms, no viral DNA was detected, whereas immunohistochemical studies revealed a positive viral antigen reaction in the same samples. Also, morphological changes in the epithelium of the ducts and the appearance of coilocytes were noted. Thus, the data obtained indicate that it is necessary to examine women for the presence of HPV, not only when cervix neoplastic lesions are detected, but when neoplasms are formed in the breast.

Инфекция, вызванная вирусом папилломы человека (ВПЧ), является наиболее распространенной среди заболеваний половых путей. ВПЧ проникает и размножается чаще всего в плоском эпителии, преимущественно в клетках камбиального слоя, и доказано, что причиной цервикального злокачественного новообразования (ЗНО) является персистирующая папилломавирусная инфекция [1]. Известно около 120 типов ВПЧ, которые делятся на группы с высокой (типы 16, 18, 31, 33 и 35), средней и низкой (типы 6, 11, 42, 43, 44) степенями онкогенного риска. Последние способствуют развитию доброкачественных опухолей и кондилом, тогда как первые две инициируют формирование интраэпителиальных неоплазий. Если на данный момент уже доказано участие ВПЧ в развитии ЗНО цервикса, то остается под вопросом отношение этого вируса к этиологическому фактору формирования рака молочной железы.

ВПЧ не имеют оболочки, содержат двухцепочечную кольцевую ДНК, которая включает три сегмента: ранние, поздние и геномные регионы. Ранняя область, кодирующая белки E1, E2, E4–E8, образует половину генома ВПЧ, которая функционирует на разных этапах. Область, кодирующая E1 и E2, принимает участие в регуляции репликации ДНК: E2 в транскрипции (E2), а E5, E6 и E7 в клеточной трансформации. Поздняя область (L) с L1 и L2 формирует 40 % генома и кодирует структурные белки вируса, остальную часть составляет регуляторная область. Высокоонкогенные ВПЧ (HR-HPV) имеют регион генома, кодирующий белки E6 и E7, связанные с трансформацией инфицированных клеток, что приводит к нестабильности их генома, результатом которой является малигнизация. Первое доказательство роли ВПЧ в развитии рака молочной железы было предоставлено с помощью ПЦР и показано наличие ДНК ВПЧ 16 типа в 29,4 % образцах рака молочной железы. Впоследствии также сообщалось о присутствии ВПЧ в образцах с раком молочной железы и наличие койлоцитоподобных клеток в эпителии протоков [2]. С другой стороны, также было показано отсутствие ВПЧ в тканях ЗНО молочной железы [1] и роль этого вируса как этиологического фактора развития пролиферативных процессов в молочной железе остается спорным.

Цель настоящего исследования заключалась в сравнении распространенности ВПЧ в доброкачественных и злокачественных опухолях молочной железы, а также в прилегающих к ним нормальных тканях, для изучения возможной связи между инфицированием и развитием опухолей.

Материалы и методы. Изучено 20 образцов с морфологически установленным диагнозом рак молочной железы, включая карциному и нормальные ткани молочной железы, прилегающие к опухолям, и 60 образцов с доброкачественной опухолью молочной железы. Образцы были получены от пациенток с подтвержденным диагнозом, без ограничений по возрасту, на базе ГБУЗ Приморского краевого онкологического диспансера Владивостока в период с 2016 по 2018 годы. Критерии исключения составили пациенты с анамнезом рака других органов, метастазирующего, и наличие неoadъювантных методов терапии. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (протокол № 68 от 12.10.2016).

Выделение ДНК из трех гистологических срезов парафиновых образцов, толщиной 4-микрона, проводили с использованием набора реагентов (Extra-DNA, ГеноТехнология, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве позитивного контроля использовали клетки HeLa, инфицированные ВПЧ 16 и 18 типа, заключенные в парафин, и отрицательного – парафиновый блок без образцов. Также проводили выделение ДНК из замороженных образцов биопсийного материала (2x2 мм), извлеченных из опухоли, прилежащей к ней нормальной области тканей и содержимого молочных желез с помощью набора для реагентов ДНК-экстракт AmpliSens («ДНК-сорб-С-М», Россия).

Для выявления ВПЧ в биологическом материале использовали набор реагентов для суммарного количественного определения ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 типов) ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL» (ООО «Интерлабсервис», Россия) для пятиканального и более приборов фирмы. Амплификацию с детекцией в режиме «реального времени» проводили на термоциклере Rotor-Gene 6000 (Австралия). Принцип тестирования основывался на одновременной амплификации участков ДНК выявляемых генотипов ВПЧ и ДНК β -глобинового гена человека с гибридизационно-флуоресцентной детекцией ($500-10^5$ клеток/реакцию). Концентрация ДНК ВПЧ рассчитывалась как соотношение количества копий ВПЧ на количество клеток образца.

Иммуногистохимический анализ проводился на гистологических срезах, предварительно срезы депарафинированных с демаскировкой антигена в 0,01 М цитратно-натриевом Рн = 6,0. Для определения антигена ВПЧ в образцах использовали моноклональные антитела к белкам E6 ВПЧ Anti-HPV16 E6 + HPV18 E6 [1:200, клон С1Р5] и капсульному белку L1 Anti-HPV [1:200; включающие клон BPV-1/1Н8, специфичный для HPV-1, 6, 11 и клон

CAMVIR для HPV-16, 18 и 31] (Abcam, США). В качестве контроля использовали изотипы IgG и IgG1 соответственно.

Статистический анализ. Критерий χ^2 были использованы для изучения отклонения различий в переменных, с использованием программы для социальных наук (SPSS) 16.0 для Windows (SPSS Inc., Чикаго, Иллинойс, США). Значимыми принимались различия при достоверности P менее 0,05.

Результаты. Средний возраст групп пациентов с диагнозом злокачественная и доброкачественная опухоль молочной железы составил 57,1 и 42,5 ($P < 0,001$) соответственно. Из 60 пациенток с доброкачественной опухолью у 32 был диагностирован внутрипротоковый папилломатоз, у 20 — фиброаденома, у 5 — склерозирующий аденоз и у 3 — непролиферативный фиброаденоматоз. В группе с раком молочной железы 15 пациенток имели инвазивную протоковую карциному, у трех была карцинома протоков *in situ* и у 2 — инвазивная дольковая карцинома, при положительной частоте экспрессии рецепторов ER, PR и Her2 72,2, 69,5 и 86,6 % случаев соответственно.

Исследование с помощью ПЦР в режиме «реального времени» образцов нормальной и ткани доброкачественной опухоли показало отсутствие ВПЧ высокого канцерогенного типа. Для каждого образца применялся внутренний контроль качества — ДНК β -глобинового гена, который используется в качестве эндогенного внутреннего контроля и позволяет оценивать все этапы ПЦР для каждого образца, а также адекватность взятия материала и его хранения. Количество клеток соответственно этому тесту присутствовало в достаточном количестве (более 500), что ПЦР диагностика папилломавирусной инфекции образцов прошла корректно и полученные результаты можно считать достоверными. Из вышеизложенного следует, что количественное определение ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 типов в образцах методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией не выявило наличия данного вируса в тканях при доброкачественных опухолях молочной железы. Тогда как, при исследовании отделяемого молочной железы (17 образцов), наблюдалась положительная реакция на ВПЧ в двух образцах. Так, определено 3 lg копий реакций ВПЧ 45 типа на 10^5 клеток образца при диагнозе внутрипротоковый папилломатоз левосторонний и 4 lg копий реакций ВПЧ 16 типа на 10^5 клеток образца при диагнозе непролиферативный аденоматоз левосторонний, что соответствовало риску развития дисплазии. Один (инвазивная карцинома) из 20 образцов биопсии при раке молочной железы был положительным для ДНК ВПЧ 16 типа. Во всех нормальных тканях, прилегающих к опухолям, ДНК ВПЧ не обнаружена.

С другой стороны, иммуногистохимический анализ показал, что при подтвержденном внутрипротоковом папилломатозе выявлялась позитивная реакция на белок Е6 ВПЧ 16 и 18 типа в $46,2 \pm 3,6$ % образцах опухолевой ткани, а в окружающей — в $23,1 \pm 1,8$ %. Причем наличие капсульного белка L1 в опухоли в 100,0 %, а в окружающей ткани в $53,8 \pm 13,8$ %. Необходимо также отметить присутствие в $61,6 \pm 13,4$ % образцов тканей измененных эпителиоцитов с различной степенью изменения ядра и перинуклеарной вакуолизацией — койлоцитов, которые относятся к цитологическим признакам наличия папилломовирусной инфекции. При гистологическом диагнозе фиброаденома белок Е6 ВПЧ 16 и 18 типа обнаружен в одном образце, а в окружающей опухоль ткани в двух.

Несмотря на то что генетическое исследование не показало наличия вирусной ДНК в биопсийных образцах доброкачественного новообразования, иммуногистохимическое изучение выявило присутствие вирусного антигена. Определение протеинов позволило обнаружить продуктивную стадию жизненного цикла ВПЧ, при которой наблюдаются морфологические изменения эпителия и появление койлоцитов. Предполагаем, что данные результаты ПЦР исследования были получены в связи с низким количеством эпителиоцитов, где преимущественно локализовался вирусный антиген, относительно остальных клеток биопсийного материала. Для более достоверного исследования необходимо использовать лазерную микродиссекцию, с помощью которой можно с высокой точностью выделять определенные фрагменты ткани и, таким образом, обеспечить достаточное количество

стартового материала для последующего молекулярного анализа. В целом эти данные указывают на необходимость обследования женщин на наличие ВПЧ не только при обнаружении неопластических поражений цервикса, но и при формировании новообразований в молочной железе.

Список литературы

1. *Tulay P., Serakinci N.* The role of human papillomaviruses in cancer progression // J. Cancer Metasta Treat. 2016. Vol. 2. P. 201–213.
2. *Salman N., Davies G., Majidy F., Shakir F., Akinrinade H., Perumal D.* Association of High Risk Human Papillomavirus and Breast cancer: A UK based Study // Scientific Reports. 2017. Vol. 7. P. 43591–43598.

KIM-1 (KIDNEY INJURY MOLECULE-1) КАК УРИНОЛОГИЧЕСКИЙ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЙ МАРКЕР ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА

KIM-1 (KIDNEY INJURY MOLECULE-1) AS URINARY TUMOR –ASSOCIATED MARKER OF RENAL CELL CARCINOMA

*Н. С. Сергеева¹, К. Ю. Канукоев¹, М. П. Солохина¹, Н. В. Маршутина¹, Г. Г. Пуцман¹,
К. М. Ньюшко¹, Б. Я. Алексеев²*

¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П. А. Герцена —
филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии»

Минздрава РФ, Россия, Москва

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава РФ,
Россия, Москва

*N. S. Sergeeva¹, K. Ju. Kanukoev¹, M. P. Solohina¹, N. V. Marshutina¹, G. G. Putsman¹, K. M.
Njushko¹, B. Ya. Alekseev²*

¹Moscow P. A. Hertsen Research Oncological Institute — branch of the FGBS «National medical
research centre of radiology» Ministry of Health, Russia, Moscow

²FGBS «National medical research centre of radiology» Ministry of Health, Russia Moscow

e-mail: prognoz.06@mail.ru

Исследован уровень KIM-1 в моче у 15 больных почечно-клеточным раком (ПКР) и у 39 доноров. Уровни KIM-1 у первичных больных составили 3598 ± 256 пг/мл, у доноров — 907 ± 135 пг/мл. KIM-1 продемонстрировал стадиязависимость: при I стадии опухолевого процесса его средний уровень был равен 2535 ± 217 пг/мл, а при II–IV — 4812 ± 239 пг/мл ($p < 0,05$).

Концентрации KIM-1, нормированные на уровни креатинина, не достоверно зависели от стадии заболевания. Уровни KIM-1 и креатинина коррелировали только у доноров ($r = 0,655$).

Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки KIM-1 как уринологического опухолеассоциированного маркера ПКР.

Ключевые слова: KIM-1, уринологический маркер, почечно-клеточный рак

The level of KIM-1 in urine was investigated in 15 patients with renal cell carcinoma (RCC) and in 39 donors. The levels of KIM-1 in primary patients were 3598 ± 256 pg/ml, in donors — 907 ± 135 pg / ml. KIM-1 demonstrated dependence on stage: at stage I of the tumor process, its average level was 2535 ± 217 pg/ml, and at stage II–IV — 4812 ± 239 pg/ml ($p < 0,05$).

Concentrations of KIM-1 normalized to urinary creatinine were not reliably dependent on the stage of the disease. The levels of KIM-1 and creatinine correlated only in donors ($r = 0,655$).

The data obtained indicate the promise of further development of KIM-1 as a tumor-associated marker of RCC.

Keywords: KIM-1, urinary marker, renal cell carcinoma

В течение многих лет ведутся поиски высокочувствительных и специфических серологических опухолеассоциированных маркеров (ОМ) в аспекте неинвазивных методов уточняющей диагностики, лабораторного сопровождения терапии и последующего мониторинга больных почечно-клеточным раком (ПКР).

На рубеже прошлого века был изучен ряд серологических ОМ (РЭА, СА125, СА 15-3, васкулоэндотелиальный фактор роста (ВЭФР), опухолеассоциированный ингибитор трипсина (ТАТИ), β -ХГЧ, ИЛ-6, опухолеассоциированная пируваткиназа М2 типа (Tu М2-РК) и др.). Тем не менее ни один из этих маркеров не нашел широкого применения в клинике онкоурологии вследствие низкой либо чувствительности, либо специфичности, либо длительного времени полувыведения (Tu М2-РК).

Ряд публикаций последних лет свидетельствуют о перспективности высококонсервативного трансмембранного белка КИМ-1, позиционирующегося как маркер токсического или ишемического повреждения почечных канальцев. В ряде работ исследована роль КИМ-1 в патогенезе развития ПКР и его метастазировании. В нескольких публикациях представлены данные об исследовании КИМ-1 в сыворотке и моче больных ПКР, которые свидетельствуют о перспективности разработки КИМ-1 как ОМ.

Цель — оценить уровни КИМ-1 в моче больных ПКР и доноров в сопоставлении с некоторыми характеристиками опухолевого процесса.

Материалы и методы. Объектом исследования была средняя порция утренней мочи 15 больных ПКР (13 первичных и 2 с рецидивом) и 39 доноров. Средний возраст больных ПКР — 56 лет (32–70 лет), доноров — 44 года (23–70 лет). Уровень креатинина (Crea) в моче измеряли с помощью колориметрического теста на анализаторе Beckman Coulter AU 680.

Из 15 больных ПКР в соответствии с обследованием и патоморфологическим заключением после операции 8 имели I стадию опухолевого процесса, 1 — II, 5 — III, 1 — IV стадии и 2 — рецидив ПКР. Уровни КИМ-1 исследовали с помощью тест-набора ENZO Life Scientific КИМ-1 ELISA (США).

Результаты. Основные полученные результаты сведены в таблицу.

Уровни КИМ-1 и Crea в моче доноров и больных ПКР

Контингент	n	КИМ-1(пг/мл)		Crea(мг/л)		КИМ-1/Crea (нг/мг)	
		$\bar{x} \pm m^*$	Me**	$\bar{x} \pm m$	Me	$\bar{x} \pm m$	Me
Доноры	39	907 $\pm$ 135	773	1012 $\pm$ 98	978	0,90 $\pm$ 0,12	0,88
Больные ПКР	15	3598 $\pm$ 256	3004	1305 $\pm$ 192	1187	2,00 $\pm$ 0,54	1,63
– I ст.	8	2535 $\pm$ 217	2500	1202 $\pm$ 304	1038	2,10 $\pm$ 0,34	1,75
– II–IV ст. и с рецидивом	7	4812 $\pm$ 239	4000	1407 $\pm$ 256	1500	3,42 $\pm$ 1,02	1,63

* $\bar{x}$ — средняя по группе величина, m — ошибка среднего;

** Me — медиана.

Очевидно, что уровни КИМ-1 у доноров достоверно ниже, чем у больных ПКР. Достоверность подтверждается и непересечением 95 % доверительных интервалов (ДИ). Медианы КИМ-1 в этих двух группах были близки к средним значениям. Сходная ситуация была характерна и для уровней КИМ-1, нормированных по концентрации Crea в моче.

КИМ-1 проявил свойство стадиязависимости: его уровни при I стадии опухолевого процесса оказались достоверно ниже, чем при II–IV. Причем в соответствии с ошибкой среднего и 95 % ДИ, не пересекающихся в подгруппах I и II–IV стадиях опухолевого процесса, не исключено, что с помощью этого маркера можно будет с приемлемой достоверностью различать начальные и распространенные формы ПКР.

Что касается уровней КИМ-1, нормированных на Crea, различия в них между стадиями опухолевого процесса оказались недостоверными. Тогда мы оценили коэффициент корреляции между КИМ-1 и Crea у доноров и больных ПКР. Установлено наличие умеренной

корреляции ($r = 0,655$) между этими параметрами у доноров и ее ослабление при развитии опухолевого процесса ($r_{\text{Ict}} = 0,129$, $r_{\text{II-IVct}} = -0,004$). Эти данные ставят под сомнение необходимость нормировать KIM-1 на Crea.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшей разработки KIM-1 как уринологического опухолеассоциированного маркера ПКР.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТИ
ТЕРАПИИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПОЧКИ, СВЯЗЬ
С ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА *VHL***

**MOLECULAR MARKERS FOR PROGNOSIS AND EFFICACY OF TREATMENT OF
RENAL CELL CARCINOMA, ASSOCIATION
WITH *VHL* GENE EXPRESSION**

*Л. В. Спирина^{1,2}, И. В. Кондакова¹, З. А. Юрмазов¹, Е. А. Усынин¹, Е. М. Слонимская^{1,2},
Н. А. Лушникова¹, Д. В. Поднебеснова²*

¹ НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Томск, Россия

² Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

*L. V. Spirina^{1,2}, I. V. Kondakova¹, Z. A. Yurmazov¹, E. A. Usynin¹, E. M. Slonimskaya^{1,2},
N. A. Lushnikova¹, D. V. Podnebesnova²*

¹ Cancer Research Institute, TNIMC, Tomsk, Russian Federation

² Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

e-mail: SpirinaLVL@mail.ru

Белок фон Хиппель-Линдау (*VHL*) связан с развитием и прогрессированием рака почки. Отмечено повышение экспрессии *VHL* у пациентов с диссеминированной формой заболевания по сравнению с локализованной при равномерном распределении пониженного (менее 1,0) и повышенного (более 1,0) уровней мРНК этого гена среди больных раком почки вне зависимости от распространенности процесса. Повышенный уровень экспрессии *VHL* сопровождался ростом уровня мРНК *CAIX*, *VEGFR2* и киназы *4EBP1*. Представленные данные свидетельствуют о значимости молекулярно-биологических параметров опухоли в онкогенезе рака почки.

Ключевые слова: *VHL*, рак почки, NF-κBp65, NF-κBp50, HIF-1, HIF-2, VEGF, *CAIX*, *VEGFR2*, компоненты АКТ/m-TOR сигнального пути

Von Hippel-Lindau (*VHL*) protein is associated with the development and progression of kidney cancer. An increase in *VHL* expression was found in patients with the disseminated form of the disease compared with the localized one. This fact was combined with a uniform distribution of decreased (less than 1.0) and increased (more than 1.0) *VHL* mRNA levels in renal cancer patients, depending on the extent of the process. The growth of *VHL* expression was accompanied by an increase in the level of NF-κB p65 mRNA, as well as enhance in PDK1, AKT expression. The revealed data indicate the importance of molecular biological parameters in oncogenesis.

Keywords: *VHL*, kidney cancer, NF-κBp65, NF-κBp50, HIF-1, HIF-2, VEGF, *CAIX*, *VEGFR2*, AKT / m-TOR signaling pathway

Введение. Рак почки представляет собой гетерогенную группу опухолей, из которых более 80 % приходится на светлоклеточный почечно-клеточный тип, связанный с мутациями

и функциональной неполноценностью белка фон Хиппель-Линдау (VHL), сопровождающейся увеличением содержания ядерного фактора HIF-1, гиперэкспрессией сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF).

При этом накоплены данные о роли ряда молекулярных маркеров в развитии других значимых процессов онкогенеза, а именно процессов программированной клеточной гибели, иммунного воспаления. Мутантная форма белка VHL оказывает влияние на развитие резистентности к NF-κB-опосредованному апоптозу, а также связана с блокированием процессов клеточной цитотоксичности и явлением ухода от иммунного надзора. Однако ассоциации уровня его мРНК с процессами метастазирования опухоли и комплексом изучаемых молекулярных параметров, определяющих опухолевую прогрессию не выявлено. Цель исследования заключалась в определении экспрессии гена *VHL* в ткани рака почки и связи его с уровнем мРНК транскрипционных, ростовых факторов VEGF, CAIX, VEGFR2, а также компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути у пациентов с локализованным и диссеминированным раком почки.

Материалы и методы исследования. В исследование было включено 39 пациентов со светлоклеточным почечноклеточным раком. В зависимости от распространенности заболевания сформировано две группы больных. Стадия заболевания T1-2N0M0 была диагностирована у 20 пациентов, что соответствовало локализованному раку почки, 19 имели диссеминированный процесс — T1-3N0-1M1 (II группа).

Материалом для исследования являлись образцы опухолевой и неизменной ткани почки, находящиеся на расстоянии не менее 1 см от границы опухолей, которые после забора замораживались и хранились при температуре 80 °С.

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany).

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Уровень экспрессии генов оценивали при помощи количественной обратно-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с использованием красителя SYBR Green на амплификаторе iCycler (Bio-Rad, USA).

Результаты и их обсуждение. При изучении связи уровня экспрессии VHL и распространенности заболевания были выделены группы пациентов: с пониженной экспрессией VHL, менее 1,0 УЕ ($n = 14$), и повышенной — более 1,0 УЕ ($n = 25$) относительно нормальной ткани. Следует отметить, что значимых различий по распределению уровня экспрессии VHL в изучаемых группах выявлено не было.

При этом выявлено, что повышенная экспрессия VHL связана с развитием отдаленных метастазов. Зафиксировано возрастание уровня мРНК данного показателя в 32,0 раза при диссеминированной форме заболевания по сравнению с локализованным раком. Поскольку уровень экспрессии VHL в ткани рака почки снижен. Представленные данные могут свидетельствовать о значимости VHL в развитии отдаленных метастазов заболевания.

Ранее нами были показаны значительные изменения в экспрессии транскрипционных, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути в ткани рака почки в зависимости от наличия отдаленных метастазов заболевания. Отмечено, что в случае экспрессии VHL более 1,0 УЕ у пациентов с отдаленными метастазами происходило увеличение уровня мРНК VEGFR2 в 25,8 раза по сравнению с больными, имеющими локализованный процесс. Вероятно, мутация VHL и, как следствие, появление нефункционального белка, сопровождается увеличением уровня мРНК и ассоциируется с появлением отдаленных метастазов. В свою очередь, повышенный уровень экспрессии VHL (более 1,0) у больных с диссеминированным раком почки сопровождался ростом экспрессии CAIX, VEGFR2 и 4EBP1 в 4,0, 32,0 и 5,0 раза, соответственно, по сравнению с пациентами со сниженной экспрессией показателя VHL (менее 1,0) (см. таблицу). Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение экспрессии ростовых факторов-мишеней HIF-1, к которым относят CAIX и VEGF, сопровождается активацией АКТ/m-TOR сигнального пути. Кроме того, именно повышенные уровни VHL ассоциированы с выраженными изменениями

экспрессии молекулярных показателей у пациентов с диссеминированной формой заболевания.

Экспрессия ядерных факторов HIF-1, HIF-1, NF-κBp50 и NF-κBp65, ростовых факторов и компонентов АКТ/m-TOR сигнального пути в ткани опухоли в зависимости от уровня экспрессии VHL, Me(Q1; Q3)

Показатель, УЕ	Локализованный рак		Диссеминированный рак	
	Пониженная экспрессия VHL (менее 1,0)	Повышенная экспрессия VHL (более 1,0)	Пониженная экспрессия VHL (менее 1,0)	Повышенная экспрессия VHL (более 1,0)
HIF-1	2,01 (0,03; 4,0)	0,5 (0,26; 1,25)	0,02 (0,0; 0,58)	0,5 (0,06; 2,53)
HIF-2	17,0 (2,0; 32,0)	0,31 (0,08; 0,75)	0,05 (0,00; 8,0)	1,0 (0,05; 8,0)
NF-κB p50	8,06 (0,13; 16,0)	0,13 (0,07; 0,64)	0,03 (0,01; 4,08)	2,68 (0,06; 16,0)
NF-κB p65	1,0 (0,0; 2,0)	1,46 (0,46; 17,0)	1,0 (0,01; 2,83)	2,0 (0,26; 12,7)
VEGF	5,66 (0,03; 12,0)	0,02 (0,01; 0,07)	0,13 (0,00; 1,03)	1,59 (0,25; 14,0)
CAIX	16,02 (0,04; 32,0)	0,5 (0,0; 1,5)	0,01 (0,0; 0,01)	0,04 (0,02; 1,0)*
VEGFR2	14,0 (0,13; 28,0)	0,31 (0,1; 0,5)	0,25 (0,01; 0,32)	8,0 (0,5; 12,0)*, #
PDK1	2,09 (0,19; 4,0)	5,0 (1,25; 18,5)	0,13 (0,03; 4,0)	1,87 (0,03; 8,0)
АКТ	8,01 (0,03; 16,0)	3,0 (1,03; 10,0)	0,25 (0,13; 7,88)	4,94 (1,78; 13,2)
c-RAF	0,18 (0,03; 0,33)	2,27 (0,14; 16,0)	2,0 (0,0; 32,0)	1,39 (0,08; 6,46)
GSK-3β	1,0 (0,03; 2,0)	2,25 (0,31; 4,8)	4,0 (2,0; 11,3)	6,16 (0,64; 27,0)
m-TOR	0,56 (0,13; 1,0)	1,12 (0,14; 9,0)	0,72 (0,06; 1,0)	1,04 (0,22; 13,6)
70S 6 киназа	16,2 (0,5; 12,0)	0,75 (0,5; 1,5)	0,58 (0,13; 16,0)	1,19 (0,36; 4,41)
4EBP1	0,19 (0,06; 0,33)	0,83 (0,44; 1,0)	0,5 (0,36; 0,5)	1,0 (0,1; 11,6)

Примечание: * — значимость различий по сравнению с пациентами с пониженной экспрессией, имеющих диссеминированный рак почки, $p < 0,05$; # — значимость различий по сравнению с пациентами с локализованным и диссеминированным раком почки с повышенной экспрессией VHL, $p < 0,05$.

Заклучение. Таким образом, метастазирование рака почки протекает на фоне повышения экспрессии гена VHL и оказывает влияние на прогрессирование заболевания. При этом повышенные уровни экспрессии VHL ассоциированы с ростом мРНК CAIX, VEGFR2 и ингибитора транскрипции 4EBP1. Представленные данные свидетельствуют о наличии сложных механизмов опухолевой прогрессии при раке почки, включающих в себя активацию процессов неоангиогенеза, воспалительных реакций и др., что, несомненно, требует дальнейшего изучения.

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ПРОТЕОМНЫЕ МАРКЕРЫ В СОСТАВЕ ЭКЗОСОМ
КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

**EPIGENETIC AND PROTEOMIC MARKERS IN EXOSOMES FROM BREAST CANCER
PATIENTS BLOOD**

*С. Н. Тамкович^{1,2}, О. С. Тутанов¹, А. К. Сомов¹, К. В. Проскура^{1,3}, Н. В. Юнусова⁴,
А. Е. Григорьева¹, В. Е. Войццкий³, Е. И. Рябчикова^{1,2}, Ю. П. Центалович⁵, В. В. Власов^{1,2},
П. П. Лактионов^{1,6}*

¹ ФГБУ науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Россия, Новосибирск

² Новосибирский государственный университет, Россия, Новосибирск

³ Новосибирский областной клинический онкологический диспансер, Россия, Новосибирск

⁴ Институт онкологии Томского НИМЦ, Россия, Томск

⁵ ФГБУ науки Институт «Международный томографический центр» СО РАН, Россия,
Новосибирск

⁶ Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр им. акад.
Е. Н. Мешалкина, Россия, Новосибирск

*S. N. Tamkovich^{1,2}, O. S. Tutanov¹, A. K. Somov¹, K. V. Proskura^{1,3}, N. V. Yunusova⁴,
A. E. Grigor'eva¹, V. E. Voytsitskiy³, E. I. Ryabchikova^{1,2}, Y. P. Tsentlovich⁵, V. V. Vlassov^{1,2},
P. P. Laktionov^{1,6}*

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB of the Russian Academy of
Sciences, Russia, Novosibirsk

² Novosibirsk State University, Russia, Novosibirsk

³ Novosibirsk Regional Oncological Dispensary, Russia, Novosibirsk

⁴ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of
Science, Russia, Tomsk

⁵ Institute "International Tomographic Center" Russia, Novosibirsk

⁶ Novosibirsk Research Institute of Circulation Pathology of Academician E.N. Meshalkin, Russia,
Novosibirsk

e-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru

Экзосомы — микровезикулы, секретируемые клетками во внеклеточное пространство и попадающие в биологические жидкости, являются на сегодняшний день перспективным источником материала для неинвазивной диагностики злокачественных заболеваний. Экзосомы содержат микроРНК и белки родительских клеток, а анализ их содержимого позволяет выявить нарушения молекулярного метаболизма в этих клетках.

Целью работы является оценка диагностического потенциала экзосом, циркулирующих в плазме и ассоциированных с форменными элементами крови (ФЭК) больных раком молочной железы (РМЖ) путем измерения экспрессии опухолеассоциированных микроРНК и сравнительного анализа протеома везикул.

Препараты экзосом из плазмы и элюатов с поверхности ФЭК здоровых женщин (ЗЖ, $n = 28$) и больных РМЖ ($n = 28$, T1-2N0M0) получали путем последовательной ультрафильтрации и ультрацентрифугирования, характеризовали при помощи трансмиссионной электронной микроскопии и проточной цитофлуориметрии, используя антитела против CD9, CD24, CD63, CD81 (Abcam, BD). Концентрацию белка в экзосомах определяли при помощи NanoOrange Protein Quantitation kit, микроРНК — при помощи количественной ПЦР наборами Invitrogen. Для получения протеомных карт экзосом использовали метод 2D-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

По данным ТЭМ, полученные препараты содержат экзосомы размером 30–100 нм. При помощи анализатора частиц Malvern NS300 было показано, что экзосомы плазмы ЗЖ имели размер 96 ± 16 нм, суммарные экзосомы крови (везикулы плазмы + везикулы, ассоциированные с ФЭК) — 130 ± 5 нм, у больных РМЖ — 127 ± 7 и 129 ± 12 нм соответственно. Проточной цитофлуориметрией идентифицированы субпопуляции везикул: $CD24/CD9 > CD9/CD81 > CD9/CD63 = CD24/CD63$, что подтверждает их экзосомальную природу и вклад эндотелиальных и гемопоэтических клеток в генерацию пула экзосом в крови. Показано, что экзосомы плазмы и экзосомы, ассоциированные с ФЭК, отличаются по экспрессии поверхностных тетраспанинов не более чем на 10 %, в норме и при патологии отличия не превышают 12 %. Доля ассоциированных с ФЭК везикул составляет 2/3 от общего числа.

Наибольшей диагностической значимостью обладают микроРНК в составе экзосом, ассоциированных с клетками эритроцитарной фракции: панель let-7a, miR-103 и miR-191 позволяет дискриминировать РМЖ с чувствительностью 71 % и специфичностью 89 %.

Сравнительный анализ протеомных карт экзосомальных белков ЗЖ и больных РМЖ позволил установить значимые различия в уровне экспрессии и наборе белков, наиболее выраженные в суммарной фракции экзосом.

Таким образом, ассоциированные с ФЭК экзосомы могут служить источником молекулярных маркеров РМЖ, а идентификация дифференциально экспрессированных белков позволит получать фракции экзосом, обогащенных опухолеспецифическими экзосомами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-415-540012.

МУТАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ПАТОГЕНЕЗ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

MUTATIONAL PROFILE OF GENES INVOLVED IN THE PATHOGENESIS OF COLORECTAL CANCER

*Е. Н. Тельешева, Е. И. Новикова, Е. Г. Шайхаев, Т. В. Григорьева,
Н. Н. Новицкая, Г. П. Снигирева*

ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава РФ, Москва, Россия

*E. N. Telysheva, E. I. Novikova, E. G. Shaikhaev, T. V. Grigorieva,
N. N. Novitskaya, G. P. Snigireva*

FSBI "Russian Research Center of Roentgenoradiology" of the Ministry of Healthcare, Moscow, Russian Federation

В нашем исследовании мы использовали метод NGS для поиска соматических мутаций в генах, связанных с патогенезом колоректального рака. Проведенный анализ 46 образцов опухолевой ткани позволил выявить мутации, приводящие к структурным и функциональным изменениям кодируемых белков, в 17 из 25 генов, вовлеченных в патогенез данного заболевания. Самыми частыми изменениями были мутации в генах *APC* (56,5 %), *TP53* (50 %), *FBXW7* (15 %) и *SMAD4* (9 %). Сочетание мутаций в трех ключевых генах, отвечающих за патогенез КРР (*KRAS*, *APC* и *TP53*), которые выявлены у 33 % больных, является наиболее неблагоприятным фактором прогноза и свидетельствует об агрессивности опухолевого процесса. Определение комбинаций мутаций в опухоли каждого конкретного пациента может предоставить ценную информацию о возможных вариантах лечения для него. Секвенирование нового поколения поможет обеспечить быстрый, доступный и осуществимый способ надежно идентифицировать мутации для дальнейшего улучшения результатов лечения пациентов в ближайшем будущем.

Ключевые слова: молекулярно-генетические маркеры, колоректальный рак, NGS

In this study, we used NGS method to identify the somatic mutations in genes associated with the pathogenesis of colorectal cancer. The analysis of 46 tumor tissue samples allowed to identify mutations leading to structural and functional changes in the encoded proteins in 17 out of 25 genes involved in pathogenesis of this disease. The most frequent alterations were mutations in the *APC* (56 %), *TP53* (50 %), *FBXW7* (15 %) and *SMAD4* (9 %) genes. Combination of mutations in the key genes (*APC*, *TP53*, *KRAS*) is a negative prognostic factor and indicates the aggressiveness of the tumor process. These combinations occurred in 33 % of investigated patients. Identification of mutation combinations in tumor sample of an individual patient can provide valuable information for the treatment options. NGS may be a rapid, affordable, and feasible method for mutation identification which will improve the patient treatment outcome in the future.

Keywords: molecular-genetic markers, colorectal cancer, NGS

Накопление широкого спектра разнообразных мутаций в специфических генах, приводящих к нарушению регуляции сигнальных путей, ответственных за ключевые процессы клетки, является важным фактором патогенеза колоректального рака, определяя высокую

пластичность клеток опухоли и их устойчивость к лекарственным препаратам и лучевой терапии.

В нашем исследовании мы проанализировали с использованием метода секвенирования нового поколения (NGS) 46 образцов опухолевых тканей колоректального рака для выявления новых возможных онкомаркеров, которые могли бы быть использованы как дополнительные маркеры диагностики, эффективности лечения и прогноза течения заболевания.

Пробоподготовку библиотек проводили с использованием наборов GeneRead DNASeq Targeted Panel v2 Human Colorectal Cancer (“Qiagen”, США). Запуски библиотек проводились на приборе MiSeq (“Illumina”). Для всех образцов ДНК опухолевой ткани глубина прочтения ампликонов составляла не менее $\times 100$. Все варианты, описанные в данном исследовании, были с частотой прочтения равной или большей 10 % от всех прочтений конкретного участка. Было проанализировано 25 генов, участвующих в молекулярном патогенезе КРР. Всего было выявлено 130 соматических вариантов.

Самое большое количество соматических мутаций выявлено в генах *APC* (56 % пациентов) и *TP53* (50 % пациентов). Реже встретились мутации в генах *FBXW7* (15 % пациентов), *BRAF* (9 % пациентов) и *SMAD4* (9 % пациентов). Мутации в генах *SMAD2*, *DMD* и *PIK3CA* встретились в 6,5 % случаев. По две-три мутации (4 %) было обнаружено в генах *ATM*, *CTNNB1*, *DCC* и *TCF7L2* и одна мутация (2 %) — в гене *MLH1*.

Мутации в генах *KRAS*, *APC* и *TP53* являются ключевыми генетическими изменениями при КРР. Сочетание трех мутаций в генах *KRAS*, *APC* и *TP53* было выявлено у 15 больных (33 %). Сочетание двух мутаций в генах *KRAS* и *APC* выявлено у 11 больных (24 %), а в генах *KRAS* и *TP53* — у 8 больных (17,4 %).

В нашем исследовании у 67 % пациентов, у которых были выявлены мутации в трех ключевых генах (*KRAS*, *APC* и *TP53*), было отмечено прогрессирование заболевания, 53 % больных умерли в период наблюдения. В группе пациентов, у которых не были выявлены мутации в генах *APC* и *TP53*, а имелась лишь мутация в гене *KRAS*, 75 % больных имели I и II стадию заболевания. Большинство больных из этой группы (75 %) были живы в течение всего периода наблюдения.

Таким образом, из приведенных выше данных хорошо видно, что сочетание трех мутаций в ключевых генах, отвечающих за патогенез КРР (*KRAS*, *APC* и *TP53*), которое выявлено у 33 % больных, является наиболее неблагоприятным фактором прогноза и свидетельствует о более высокой агрессивности опухолевого процесса.

Таким образом, анализ 46 образцов опухолевой ткани с применением метода NGS позволил выявить молекулярно-генетические нарушения, характерные для патогенеза КРР. В 17 из 25 проанализированных генов были выявлены мутации, приводящие к изменению структуры и функции белков (онкогенов или опухолевых супрессоров). Самыми частыми мутациями были мутации в генах *APC* (56,5 %), *TP53* (50 %), *FBXW7* (15 %) и *SMAD4* (9 %).

Полученные нами данные, а также данные литературы, свидетельствуют о том, что эффективное лечение большинства злокачественных новообразований, в том числе и КРР, требует отслеживания больше чем одной мишени и сочетания нескольких методов лечения. Определение мутационного профиля каждой конкретной опухоли, как сделали мы в нашем исследовании, может оказаться крайне важным для онкологических больных, давая возможность использовать комбинацию таргетных препаратов с учетом комплекса обнаруженных изменений. Секвенирование нового поколения может помочь обеспечить нам быстрый, доступный и осуществимый способ надежно идентифицировать мутации для дальнейшего улучшения лечения пациентов в ближайшем будущем.

ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ СИНДРОМОВ МЕТОДОМ NGS. ОПЫТ КОММЕРЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

А. А. Тихонов¹, А. А. Афанасьев^{1,2}

¹ Генетическая лаборатория «Розалинд», Москва, Россия

² Биоинформатическая компания «iBinom», Москва, Россия

e-mail: antikhonov.mail@gmail.com

Мотивация и цели. Общепринятый подход к диагностике наследственных опухолевых синдромов основывается на поиске мутаций в ряде генов, связанных с конкретным синдромом, у пациентов с отягощенным личным и семейным онкологическим анамнезом.

Такой подход увеличивает фармакоэкономическую эффективность тестирования, однако по ряду причин пропускает большое количество носителей синдромов:

- не все люди с отягощенным анамнезом получают направления на тестирование;
- фенотип определенного синдрома может быть связан с существенно большим количеством генов, чем считалось ранее, в том числе и с генами других опухолевых синдромов;

- вследствие неполной пенетрантности большинства синдромов у многих носителей патогенных мутаций отсутствует соответствующий анамнез.

Анализ расширенной панели генов, связанных с распространенными опухолевыми синдромами, без предварительного отбора по анамнезу позволяет повысить выявляемость носительства патогенных вариантов.

Методы. Провели секвенирование кодирующих последовательностей и прилежащих интронных участков 42 генов на платформе MiSeq. Интерпретацию вариантов проводили согласно рекомендациям Scherloc и ACMG. Патогенные и вероятно патогенные варианты подтверждали секвенированием по Сэнгеру. На основе результатов тестирования и анализа онкологического анамнеза были составлены рекомендации по диагностике и профилактике рака.

Результаты. Исследовали 87 человек. У 14 человек онкологический анамнез подходил под критерии NCCN для направления на генетическое тестирование. Всего было обнаружено 10 патогенных и вероятно-патогенных вариантов и 6 вариантов факторов риска развития рака. У пяти пациентов с анамнезом, подходящим под критерии направления на ДНК-диагностику, обнаружены патогенные варианты. При этом у одного испытуемого с релевантным анамнезом был выявлен патогенный вариант в гене, связанным с другим опухолевым синдромом. Патогенные и вероятно патогенные варианты были выявлены у четырех пациентов без релевантного семейного анамнеза.

Заключение. В исследовании опухолевые синдромы были выявлены у пяти пациентов, у которых синдром не был бы обнаружен в рамках общепринятого подхода к диагностике. Выявление синдромов у пациентов без релевантного анамнеза требует обсуждения подходов к репортированию результатов.

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД К НАЗНАЧЕНИЮ ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

PERSONALIZED APPROACH TO CHEMOTHERAPY IN PATIENTS WITH NON- SMALL CELL LUNG CANCER

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

Научно-исследовательский институт онкологии,
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

*M. M. Tsyganov, E. O. Rodionov, I. V. Derjusheva, A. M. Pevzner,
M. K. Ibragimova, S. V. Miller, S. A. Tuzikov, N. V. Litvjakov*

Cancer Research Institute,
Tomsk National Research Medical Center, RAS, Tomsk, Russia

e-mail: TsyganovMM@yandex.ru

Персонализированная химиотерапия, основанная на определении молекулярных биомаркеров химиочувствительности, является новым способом лечения пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Анализ экспрессии таких генов химиочувствительности, как *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TUBB3*, *TYMS* и *ABCC5* в послеоперационный период и персонализированный подход к назначению адъювантной химиотерапии позволил увеличить показатели безрецидивной выживаемости у больных почти на 30 %, по сравнению с контрольной группой (log-rank test, $p = 0,04$).

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, гены химиочувствительности, химиорезистентность, персонализированная медицина

Personalized chemotherapy based on the determination of molecular biomarkers of chemosensitivity is a new way of treating patients with NSCLC. Expression analysis of such chemosensitivity genes as *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TUBB3*, *TYMS* and *ABCC5* in the postoperative period and a personalized approach to the administration of adjuvant chemotherapy increased the rates of relapse-free survival in patients by almost 30 % compared with the control group (log-rank test, $p = 0.04$).

Keyword: non-small cell lung cancer, chemosensitivity genes, chemoresistance, personalized medicine

Применение цитостатических препаратов в предоперационном периоде у больных немелкоклеточным раком легкого обусловлено стремлением к уменьшению объема первичной опухоли, определением чувствительности к проводимой химиотерапии, что позволяет адекватно планировать лечение в адъювантном режиме, а достижение полной и выраженной частичной регрессии способствует улучшению отдаленных результатов лечения. Однако значимое уменьшение размеров опухоли в ответ на проводимое лечение наблюдается далеко не всегда. В настоящее время отсутствие подхода к выбору схемы химиотерапии для каждого конкретного больного рассматривается как одна из основных причин ее

неэффективности. Вопреки огромным усилиям, направленным на разработку новых схем химиотерапии, терапевтические результаты остаются неудовлетворительными. Однако накоплено достаточное количество информации относительно связи эффекта химиотерапии с уровнем экспрессии некоторых молекул, в частности генов химиочувствительности (например, *TOP2A*, *TUBB3*, *BRCA1*, *RRM1*, *TOP1* и др.), определяющих чувствительность опухоли к определенным химиопрепаратам, что дает возможность планировать лечение конкретного больного.

Цель работы — улучшение результатов комбинированного лечения немелкоклеточного рака легкого с использованием персонализированной химиотерапии.

Материал и методы. В исследование были включены 40 больных немелкоклеточным раком легкого с морфологически верифицированным диагнозом IIА–IIВ стадии, центральной или периферической локализации, в возрасте 41–74 лет. Больные в неоадьювантном режиме получали два курса химиотерапии. После пациентам проводилась операция в объеме пневмонэктомии или лобэктомии. Далее адьювантная химиотерапия (АХТ). Для исследования были использованы биопсийные образцы опухоли и нормальной ткани (~5–7 мм³) взятые до лечения, а также операционные после НХТ (~30 мм³). РНК и ДНК выделяли из парных биопсийных и операционных образцов. Концентрацию и чистоту выделения оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Целостность РНК и ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA). Уровень экспрессии генов химиочувствительности *BRCA1*, *RRM1*, *ERCC1*, *TOP1*, *TOP2α*, *TUBB3* и *TYMS* оценивали при помощи RT-qPCR. Относительная экспрессия была оценена с помощью метода Pfaffl. В качестве гена-рефери использовали ген *GAPDH*. Для оценки хромосомных aberrаций генов использовалась система цифровой капельной ПЦР (ddPCR QX200, Bio-Rad, USA). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., USA).

Результаты. Для 31 пациента было проведено назначение персонализированной схемы АХТ. У 16 больных (51,6 %) схема — гемцитабин / карбоплатин, в трех случаях (9,7 %) — паклитаксел/карбоплатин и в двух случаях (6,5 %) — доксорубицин/карбоплатин. У 10 пациентов (32,3 %) химиотерапия была проведена по схеме винорелбин/карбоплатин. В результате назначения персонализированной схемы АХТ, основанный на определении экспрессии генов химиочувствительности позволил статистически значимо увеличить трехлетнюю безрецидивную выживаемость больных — 80,6 % по сравнению с контролем — 51,7 % (ОР = 2,562; 95 % ДИ 1,089–6,027); Log-rank test $\chi^2 = 4,196$, $p = 0,041$. Далее на основании полученных данных, была предпринята попытка персонализированного назначения НХТ. У 4 (44 %) больных назначена схема НХТ паклитаксел/карбоплатин, и по одному пациенту (11 %) по схемам: гемцитабин/карбоплатин, паклитаксел/ доксорубицин, гемцитабин/доцетаксел, доксорубицин/доцетаксел, доцетаксел. В результате общая эффективность неоадьювантной химиотерапии составила 44,4 % (частичная регрессия), стабилизация — 22,2 % случаев, для остальных больных оценка эффекта продолжается.

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ОБРАЗЦАХ ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ ПРИ ПОМОЩИ ДУПЛЕКС-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ НУКЛЕАЗЫ (ДСН) И ПЦР

DETECTION OF MUTATIONS IN LIQUID BIOPSY SAMPLES USING DUPLEX-SPECIFIC NUCLEASE (DSN) AND PCR

М. Д. Чанышев, Д. А. Родионова, К. А. Благодатских, А. П. Коваль, Д. С. Щербо

ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Министерства здравоохранения РФ,
Москва, Россия

M. D. Chanyshev, D. A. Rodionova, K. A. Blagodatskikh, A. P. Koval, D. S. Shcherbo

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

e-mail: chanishq@gmail.com

Разработана система для определения мутаций в образцах жидкостной биопсии, основанная на ПЦР и дуплекс-специфической нуклеазе, которая элиминирует ДНК «дикого типа». Работа системы была проверена на модельной ДНК из клеточной линии и на клинических образцах плазмы крови.

Ключевые слова: дуплекс-специфическая нуклеаза, жидкостная биопсия, мутации, EGFR

We have developed a system for detection of low-frequency mutations in liquid biopsy samples using PCR and a duplex-specific nuclease which eliminates wild-type DNA. The system was tested on DNA from a cell line and cfDNA samples.

Keywords: duplex-specific nuclease, liquid biopsy, mutations, EGFR

Плазма крови содержит свободно циркулирующую ДНК (cfDNA); в многочисленных исследованиях показано, что при онкологических заболеваниях в ДНК плазмы крови появляется фракция, происходящая из опухолевых клеток и несущая соответствующие мутации. В ряде работ продемонстрирована возможность определения наличия соматических мутаций в опухоли по ДНК плазмы, что может быть использовано для назначения таргетной терапии [1,2]. При этом фракция молекул, содержащих исследуемые мутации, может быть незначительна на фоне ДНК «дикого типа», что повышает требования к чувствительности метода детекции. Например, считается, что опухоль немелкоклеточного рака легкого размером 10 см³ приведет к содержанию мутантного аллеля в ДНК плазмы крови порядка 0,1 % [3]. Поэтому актуальны подходы, позволяющие выявлять в образце даже низкопредставленные мутации. Благодаря свойству дуплекс-специфической нуклеазы (ДСН) избирательно гидролизовать полностью комплементарные ДНК-дуплексы возможно значительно снизить содержание ДНК «дикого типа» в пробе, сохраняя фрагменты ДНК, несущие мутации [4].

В данной работе такое применение рекомбинантного варианта природного фермента ДСН проверялось на модельных образцах ДНК, выделенных из клеточной линии, и на образцах ДНК из плазмы крови. После обработки образцов ДСН в присутствии зондов, комплементарных ДНК «дикого типа», детекцию мутаций проводили с помощью ПЦР и

секвенирования по Сэнгеру. В результате в пробах, обработанных ДСН, относительная представленность мутантных фрагментов ДНК повышалась, что делало возможным их детекцию с помощью секвенирования по Сэнгеру, в частности, таким образом были определены клинически значимые мутации гена *EGFR*. Количественно содержание мутантного аллеля определялось при помощи ddPCR с использованием специальных универсальных праймеров.

Список литературы

1. *Rachiglio A. M. et al.* Limits and potential of targeted sequencing analysis of liquid biopsy in patients with lung and colon carcinoma // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7(41). P. 66595–66605.
2. *Heitzer E. et al.* Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology // *Nat Rev Genet*. 2019. Vol. 20(2). P. 71–88.
3. *Abbosh C. et al.* Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution // *Nature*. 2017. Vol. 545. P. 446–451.
4. *Shagin D. A. et al.* A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas // *Genome Res*. 2002. Vol. 12. P. 1935–1942.

СОДЕРЖАНИЕ

Т. В. Абакумова, И. И. Антонеева, Н. С. Хирдина, Ю. М. Лазарева. ЦИТОХИМИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ НЕЙТРОФИЛОВ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ	3
А. Е. Алексеева. ЦИФРОВОЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И БЕЛКОВ С СИСТЕМОЙ GEOMX	6
В. В. Бриллиантова, Д. В. Шевцов, Т. В. Шаманская, С. Р. Варфоломеева, Д. Ю. Качанов, Е. В. Райкина, А. Е. Друй. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ <i>TH</i> , <i>RHOX2B</i> И <i>DCX</i> МЕТОДОМ ЦИФРОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕЙРОБЛАСТОМОЙ.....	9
Т. С. Геращенко, Е. В. Денисов, Н. М. Новиков, Л. А. Таширева, Н. В. Крахмаль, М. В. Завьялова, В. М. Перельмутер. <i>SPATA18</i> КАК НОВЫЙ ПРЕДИКТИВНЫЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	11
П. А. Гервас, А. А. Иванова, Н. В. Чердынцева. НАСЛЕДСТВЕННЫЙ РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПАЦИЕНТОК ТУВИНСКОЙ НАЦИОНАЛЬНОСТИ, АССОЦИИРОВАННЫЙ С МУТАЦИЯМИ ГЕНОВ <i>BRCA1/2</i>	14
Т. В. Григорьева, Е. Н. Телышева, Е. И. Новикова, Е. Г. Шайхаев, Н. Н. Новицкая, Г. П. Снигирева. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА NGS ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ГЛИОМ ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ СТЕПЕНИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ.....	17
Д. Р. Долгова, Т. В. Абакумова, И. Р. Мягдиева, И. О. Колодий. АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ВЫСКУЛОЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (<i>VEGFA</i> -634G/C) С ЭФФЕКТОМ ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ .	19
Г. А. Ефимов, Д. С. Романюк, М. Ю. Дроков, А. А. Хмелевская., Н. А. Быкова, Д. Б. Малько. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ, РАСПОЛОЖЕННЫЕ ВНЕ HLA ЛОКУСА, ВЛИЯЮТ НА ИСХОД ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СИСТЕМЫ КРОВЕТВОРЕНИЯ.....	22
М. К. Ибрагимова, М. М. Цыганов, И. В. Дерюшева, П. В. Казанцева, Е. М. Слонимская, Н. В. Литвяков. ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ В ПРОГРЕССИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....	24

М. К. Иванов, С. Е. Титов, В. В. Дзюбенко, С. А. Глушков, С. Э. Красильников, А. С. Мансурова, Ю. А. Ланцухай, И. Э. Вахтурова, И. Д. Нущик, Т. С. Присяжная, Н. А. Назмиева, А. В. Малек.	
ВЫЯВЛЕНИЕ НОВООБРАЗОВАНИЙ ШЕЙКИ МАТКИ В ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ С ПОМОЩЬЮ КОМБИНИРОВАННОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛАССИФИКАТОРА	27
М. А. Красильников, Ю. Ю. Щеголев, А. М. Щербаков, М. В. Гудкова.	
ЭКЗОСОМАЛЬНЫЕ МИКРОРНК В РЕГУЛЯЦИИ ГОРМОНАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОПУХОЛЕЙ	30
О. Н. Михайлова, Е. Подвальный.	
ПЦР — МАГИЯ, ИСКУССТВО ИЛИ ТЕХНОЛОГИЯ?	33
Н. С. Никифорова, Р. Б. Самсонов, А. К. Носов, Н. А. Назмиева, В. В. Шаройко, А. В. Малек.	
АНАЛИЗ МИКРО-РНК ПРОСТАТ-СПЕЦИФИЧНЫХ ЭКЗОСОМ — НОВЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ И МОНИТОРИНГА ЭФФЕКТА ТЕРАПИИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	36
Е. И. Новикова, Г. П. Снигирева, Е. Н. Тельшева, Н. Н. Новицкая, Е. Г. Шайхаев, Е. Д. Хазинс, Т. В. Григорьева.	
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКА ЯИЧНИКОВ	39
А. М. Певзнер, М. М. Цыганов, М. К. Ибрагимова, Е. М. Слонимская, Н. В. Литвяков.	
АМПЛИФИКАЦИИ ГЕНОВ СТВОЛОВОСТИ — НОВЫЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ У БОЛЬНЫХ С РАННЕЙ ФОРМОЙ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	42
Г. Плехова, В. И. Апанасевич, Е. А. Подолянчук, Н. В. Накцова.	
ВИРУС ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА — ТРИГГЕРНЫЙ ФАКТОР РАЗВИТИЯ ОПУХОЛИ	44
Н. С. Сергеева, К. Ю. Канукоев, М. П. Солохина, Н. В. Маршутина, Г. Г. Пуцман, К. М. Нюшко, Б. Я. Алексеев.	
KIM-1 (KIDNEY INJURY MOLECULE-1) КАК УРИНОЛОГИЧЕСКИЙ ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННЫЙ МАРКЕР ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА	48
Л. В. Спирина, И. В. Кондакова, З. А. Юрмазов, Е. А. Усынин, Е. М. Слонимская, Н. А. Лушникова, Д. В. Поднебеснова.	
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ПРОГНОЗА ТЕЧЕНИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОГО РАКА ПОЧКИ, СВЯЗЬ С ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА <i>VHL</i>	51

С. Н. Тамкович, О. С. Тутанов, А. К. Сомов, К. В. Проскура, Н. В. Юнусова, А. Е. Григорьева, В. Е. Войцицкий, Е. И. Рябчикова, Ю. П. Центалович, В. В. Власов, П. П. Лактионов.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ПРОТЕОМНЫЕ МАРКЕРЫ В СОСТАВЕ ЭКЗОСОМ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ 54

Е. Н. Тельшева, Е. И. Новикова, Е. Г. Шайхаев, Т. В. Григорьева, Н. Н. Новицкая, Г. П. Снигирева.

МУТАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ПАТОГЕНЕЗ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА 56

А. А. Тихонов, А. А. Афанасьев.

ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ СИНДРОМОВ МЕТОДОМ NGS. ОПЫТ КОММЕРЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ..... 58

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

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД К НАЗНАЧЕНИЮ ХИМИОТЕРАПИИ БОЛЬНЫМ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО 59

М. Д. Чанышев, Д. А. Родионова, К. А. Благодатских, А. П. Коваль, Д. С. Щербо.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ОБРАЗЦАХ ЖИДКОСТНОЙ БИОПСИИ ПРИ ПОМОЩИ ДУПЛЕКС-СПЕЦИФИЧЕСКОЙ НУКЛЕАЗЫ (ДСН) И ПЦР 61

*Выражаем благодарность за оказанную помощь
в организации конференции ОМ-2019 всем спонсорам!*

Спонсоры конференции	О Компании
<i>Генеральный спонсор</i> AstraZeneca  www.astrazeneca.ru 125284, Москва, ул. Беговая, д. 3, строение 1 Бизнес-центр NordStar Tower +7 (495) 799-56-99	Мы являемся глобальной биофармацевтической компанией, сфокусированной на активной научно-исследовательской деятельности. Миллионы пациентов во всем мире применяют наши инновационные препараты
BIOCAD Biopharmaceutical Company https://biocad.ru Санкт-Петербург, Бутик-офис центр «Пассаж» Москва, Технопарк Сколково Санкт-Петербург, АДЦ Нойдорф Санкт-Петербург, Фронтонная Москва, БЦ «Северная башня» Москва, ОП Любучаны МО, ОП Петрово-Дальнее	Биотехнологическая компания BIOCAD — международная инновационная компания, объединившая научно-исследовательский центр мирового уровня, ультрасовременное фармацевтическое и биотехнологическое производство, доклинические и международные клинические исследования, соответствующие современным стандартам. BIOCAD — одна из немногих в мире компаний полного цикла создания лекарственных препаратов: от поиска молекулы до массового производства и маркетинговой поддержки. Препараты предназначены для лечения самых сложных заболеваний, таких как рак, ВИЧ, гепатит, рассеянный склероз и т. д.
MERCK merckmillipore.com sigmaaldrich.com mm.russia@merckgroup.com ruorder@sial.com 115054, Москва, ул. Валуевская, д. 35 +7(495) 937-33-04 8-800-100-7425	Life Science — подразделение компании Merck — объединило в себе продукты и услуги мирового класса, инновационные возможности и исключительный талант компаний Merck Millipore и Sigma-Aldrich, став одним из глобальных лидеров в направлении Life Science. Теперь в нашем портфеле более 300,000 продуктов. Среди которых оборудование и материалы для клеточного анализа, стерилизующей фильтрации, клеточные линии ЕСАСС и сопутствующие буферы, реагенты, питательные среды и посуда для подготовки и подсчета клеток, культивирования и детекции, анализа белков, первичные и вторичные антитела, приборы и наборы инструментов для мультиплексного анализа, а также широкий спектр других продуктовых решений в области экспрессии, экстракции и количественного анализа, очистки и концентрирования белков, белкового электрофореза и детекции, а также системы получения сверхчистой воды



ООО «СибДНК»

Маслов Олег Георгиевич

Директор

(+7383)-213-64-81 (моб)

e-mail: maslov@sibdna.ru



123112, Москва, Пресненская
наб., д. 10

БЦ «Башня на Набережной»
(Блок С)

тел. + 7 (495) 2875000

факс: +7 (495) 2875300

Russia@pfizer.com

Pfizer — одна из ведущих мировых биофармацевтических компаний. Основана в США более 160 лет назад. Штаб-квартира находится в Нью-Йорке (США). Ежегодно лекарства Pfizer помогают более 150 млн человек бороться с заболеваниями и вести здоровый образ жизни. Инвестиции в R&D составляют более 7 млрд долларов в год. Диверсифицированный портфель продуктов компании включает как инновационные, так и уже давно представленные на рынке препараты: рецептурные лекарственные препараты и вакцины, а также ряд хорошо известных во всем мире безрецептурных препаратов для поддержания здоровья.

Применяя инновации и используя глобальные ресурсы, Pfizer работает для улучшения здоровья и самочувствия людей на каждом этапе жизни. Мы стремимся устанавливать высокие стандарты качества и безопасности проводимых исследований, разработки и производства лекарств. Ежедневно сотрудники Pfizer работают в развитых и развивающихся странах над улучшением профилактики и лечения наиболее серьезных заболеваний современности. Следуя своим обязательствам как ведущей биофармацевтической компании мира, Pfizer сотрудничает со специалистами здравоохранения, государственными органами и местными сообществами с целью обеспечения и расширения доступности надежной, качественной медицинской помощи по всему миру



biopharmexpert.ru

197375, Санкт-Петербург,
ул. Маршала Новикова, д. 28

+7 (812) 924-11-75

Точность и достоверность результатов — вот что необходимо для эффективной лабораторной диагностики и научных исследований. Все это возможно лишь при использовании качественных лабораторных материалов.

Мы регулярно проводим акции и распродажи, рассказываем об обучающих семинарах и вебинарах, делимся актуальной информацией о выставках и конференциях. Будьте в курсе!

 medabv.ru Москва, ул. Малая Пироговская, д. 16 +7 495 788-57-30	«Медиа Сервис АБВ» предоставляет полный цикл услуг по внедрению современных медицинских технологий в государственные и частные медицинские учреждения, а также осуществляет сервисное обслуживание и обучение персонала. Компания является официальным дистрибьютором таких известных мировых брендов, как Roche, Alifax, General Electric Healthcare, Olympus, Sysmex, bioMérieux, Erika Carmel и др. Благодаря высокому качеству работы на протяжении многих лет, «Медиа Сервис АБВ» входит в список доверенных компаний по исполнению комплексных поставок в рамках закупок, проводимых Министерством здравоохранения РФ по федеральным и региональным программам
 https://www.qiagen.com	QIAGEN serves more than 500,000 customers around the globe, all seeking insights from the building blocks of life – DNA, RNA and proteins. We deliver Sample to Insight solutions for molecular testing, propelling QIAGEN customers from start to finish to unlock new insights. This is how we make improvements in life possible
 www.albiogen.ru 127006, Россия, Москва, ул. Долгоруковская, 27с1 +7 (499) 550 15 25	Компания АЛЬБИОГЕН — официальный дистрибьютор illumina и Lucigen ООО «АЛЬБИОГЕН» с 2015 года является эксклюзивным (единственным) официальным торговым представителем и дистрибьютором компании illumina на территории Российской Федерации, Республики Беларусь, Республики Казахстан и Республики Узбекистан. Нашей задачей является обеспечение полного доступа клиентов к передовым технологиям и сервисам illumina, включая современные системы NGS и анализа ДНК-биочипов, программное обеспечение для биоинформатики и весь спектр реактивов. Компания предоставляет полный комплекс услуг, связанных с продажей, технической поддержкой и сервисным (гарантийным и постгарантийным) обслуживанием продукции компании Illumina, а также обучением пользователей работе на данном оборудовании
 www.bio-rad.com/ info_russia@bio-rad.com	Подразделение молекулярно-биологических технологий компании Bio-Rad предлагает широкий спектр приборов, реагентов, расходных материалов и программного обеспечения для исследований в областях клеточной биологии, экспрессии генов, очистки белков, количественного определения белков, разработки и

105064, Москва, Нижний Сусальный пер., д. 5, стр. 5А Тел.: (495) 721-14-04 Факс: (495) 721-14-12	производства лекарств и обучения биологическим наукам. Bio-Rad входит в пятерку ведущих мировых производителей в области наук о жизни. Наши продукты и решения используются для разделения, очистки, идентификации, анализа и амплификации биологических объектов, таких как антитела, белки, нуклеиновые кислоты, клетки и бактерии. Технологии и области применения включают в себя электрофорез, визуализацию, мультиплексный иммуноанализ, хроматографию, микробиологию, анализ функций белка, трансфекцию, проточную цитометрию и сортировку клеток, а также амплификацию, в том числе в режиме реального времени или цифровой ПЦР. Продукты Bio-Rad помогают проводить фундаментальные и прикладные исследования в лабораториях по всему миру
 www.biovitrum.ru Россия, 199106, Санкт-Петербург, Большой проспект Васильевского острова, д. 68, лит. А +7 (812) 305 06 06	Компания БиоВитрум работает на российском рынке медицинского и лабораторного оборудования с 2001 года. Более 10-ти лет активной работы позволили нам стать представителем ведущих мировых производителей диагностического оборудования и расходных материалов, открыть офисы в крупных городах России и в Казахстане, расширить сеть региональных представительств, запустить собственное производство и выстроить все внутренние бизнес-процессы компании. Все эти усилия предприняты для того, чтобы стать надежным партнером для своих клиентов. Эффективность, точность и скорость диагностики, безопасность в эксплуатации оборудования — ключевые факторы, которыми мы руководствуемся при выборе зарубежных партнеров. Концепция дистрибуции самого современного и надежного оборудования позволяет воплощать главную идею компании — диагностику, спасающую жизнь. Для нас каждый клинический случай — это жизнь и судьба реального человека! Коммерческая деятельность — это главное, но не единственное направление компании. БиоВитрум поддерживает некоммерческие организации и самостоятельно проводит благотворительные и спонсорские акции в гематологических центрах, где врачи ежедневно борются за жизнь маленьких пациентов. Благодарные улыбки детей — для нас лучшая награда!
 http://www.skygen.com	SKYGEN THE LIFE SCIENCE TRADE & SERVICES COMPANY Мы поставляем оборудование, реагенты и расходные материалы для исследовательских и биотехнологических лабораторий и производств. Мы находим, разрабатываем и внедряем высокотехнологичные решения в генетике и геномике. Наша цель — успех исследований наших покупателей.

115093, Москва, ул. Люсиновская, д. 36, стр. 1 Бесплатная линия: +7 (800) 333-12-26	В настоящее время мы являемся эксклюзивным дистрибьютером продукции компаний New England Biolabs, 10x Genomics, Nimagen, Bio Molecular Systems и официальным дистрибьютером продукции компаний QIAGEN, Agilent Technologies, Oxford Nanopore Technologies, BioSan, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific. 5 ПРИЧИН ВЫБРАТЬ SKYGEN 1. Доступ к высококачественной продукции. 2. Быстрая логистика и складская программа. 3. Удобное и взаимовыгодное сотрудничество. 4. Высококвалифицированная научная и сервисная поддержка. 5. Адекватные цены и надежность. Нас знают. Нам доверяют. Нас рекомендуют
 https://www.roche.ru/ 107031, Москва Трубная площадь, дом 2, «Галерея Неглинная» Тел.: 7 (495) 229-29-99 Факс : 7 (495) 229-79-99	Компания «Рош» входит в число ведущих компаний мира в области фармацевтики и диагностики, являясь самым крупным производителем биотехнологических лекарственных препаратов для лечения онкологических, офтальмологических и аутоиммунных заболеваний, тяжелых вирусных инфекций и нарушений центральной нервной системы
 Москва, Певческий пер., д. 4, стр. 1. Тел: (495) 937-45-94; Факс: (495)-937-45-92. e-mail: info@pribori.com	Компания Pribori Oy — один из крупнейших в России и СНГ поставщиков современного высокотехнологичного оборудования. На протяжении многих лет Компания является эксклюзивным дистрибьютором мировых производителей оборудования для генетического скрининга, лабораторных исследований, клинической диагностики и радиационного контроля. За время существования компании были успешно реализованы проекты по оснащению ведущих отраслевых предприятий, среди которых: больницы и лаборатории, пищевые и фармацевтические предприятия, атомные электростанции и научно-исследовательские институты. Pribori Oy — это коллектив высоко квалифицированных специалистов, умеющих воплощать в жизнь новые прогрессивные технологии

 http://www.vector-best.ru 630117, Новосибирск-117, а/я 492	Компания «Вектор-Бест» является крупнейшим российским производителем наборов реагентов для лабораторной диагностики. Мы выпускаем более 600 наименований продукции для иммуноферментного анализа, real-time ПЦР и клинической биохимии. За все годы компания ни разу не изменила своей цели — научной разработке и промышленному выпуску диагностической продукции, отвечающей мировым стандартам качества. Мы считаем, что главный путь к успеху — это постоянное совершенствование!
 alamed.ru ул. Красноармейская, д. 2, стр.4 +7 495 614 45 97	Компания Аламед занимается поиском решений и реализацией проектов в области Life Sciences, обеспечивает сервисную и аппликационную поддержку своего оборудования, а также методическую и любую другую поддержку — своим клиентам. Мы имеем в своем портфеле пять основных направлений: геномика, протеомика, биотехнология, клеточные технологии, микрочиповые технологии, сопутствующее лабораторное оборудование. В каждом из перечисленных направлений мы представляем современное высокотехнологичное оборудование, которое может быть идейной основой лаборатории
 www.helicon.ru/ ООО «Компания Хеликон» 119234, Москва, Ленинские Горы, МГУ им. М. В. Ломоносова, лаб. корпус «А», д. 1, стр. 40 8 800 770 71 21 +7 499 705 50 50	ООО «Компания Хеликон» — один из ведущих поставщиков оборудования и расходных материалов для научных и прикладных исследований. Основные направления деятельности: геномика, протеомика, клеточная биология, биотехнологии, криминалистика и ветеринария. Компания Хеликон — дистрибьютор ведущих мировых брендов: Thermo Fisher Scientific, Bio-Rad, Beckman Coulter, Fluidigm, Merck Millipore, BMGLabtech, Eppendorf и др.
 https://rosoncoweb.ru/ 127051, Москва, ул. Трубная, д. 25, корпус 1, 7 этаж (мансарда) Тел./факс: +7 (499) 686-02-37	Основной целью деятельности Российского общества клинической онкологии является объединение усилий онкологов и специалистов смежных отраслей (радиологов, патоморфологов, фармацевтов, специалистов диагностических служб, исследователей в области изучения биологических свойств новообразований и т. д.) Для совершенствования профилактики и лечения злокачественных опухолей с целью снижения заболеваемости и смертности населения Российской Федерации



ПРОМИКС

<http://promix.ru/>
Новосибирск (головной
офис)
630117, Новосибирск, а/я 197
Тел. / факс: (383) 336-01-66,
332-80-26
336-07-09, 332-28-53

Мы работаем на рынке лабораторного оборудования,
мебели и лабораторных расходных материалов;
являемся авторизованным дилером ведущих мировых
производителей лабораторного оборудования;
осуществляем прямые поставки от своих основных
партнеров-производителей;
имеем собственную службу сервисного обслуживания,
обеспечивающую бесперебойную работу установленного
оборудования

Научное издание

ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ:
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Материалы конференции

Республика Алтай, г. Горно-Алтайск,
2–5 июля 2019 г.

Материалы печатаются в авторской редакции

Корректор *Я. О. Козлова*
Верстка *Я. О. Козловой*
Дизайн обложки *Е. В. Неклюдовой*

Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 9,25. Усл. печ. л. 8,6.
Заказ № 177
Издательско-полиграфический центр НГУ.
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2



ISBN 978-5-4437-0931-4



9 785443 709314