

фактивного и доступного для практического применения метода, а при его неэффективности необходимо дополнять лечение введением в серозную полость аллогенных ЛАК-клеток.

А.С. Тихомиров^{1,2}, Л.Г. Деженкова¹, А.Е. Щекотихин^{1,2}

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНТРАФУРАНКАРБОКСАМИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ CF₃-ГРУППУ В ПОЛОЖЕНИИ 2

¹ФГБНУ «НИИНА им. Г.Ф. Гаузе», Москва;

²ФГБОУ ВПО «РХТУ им. Д.И. Менделеева», Москва

Введение. Антрафурандион-3-карбоксамиды высокоактивны в отношении ряда культур опухолевых клеток, в том числе резистентных, а наиболее активное производное ЛХТА-2034 (Щекотихин А.Е. и др. Патент РФ № 2554939, 2015) прошло доклинические исследования и рекомендовано для проведения I стадии клинических испытаний.

Цель исследования – синтез аналогов антрафурандиона ЛХТА-2034 и исследование влияния трифторметильного заместителя в положении 2 на способность новых соединений блокировать рост опухолевых клеток и работу топоизомеразы I.

Материалы и методы. ЛХТА-2251 – новый аналог препарата ЛХТА-2034, содержащий CF₃-группу в положении 2 гетероцикла, получен конденсацией 4,11-дигидрокси-5,10-диоксо-2-трифторметилантра[2,3-*b*]фуран-3-карбоновой кислоты [Тихомиров А.С. и др. Химия гетероциклических соединений 2014; (2):298] и циклического диамина. Антипролиферативную активность веществ определяли в МТТ-тесте на опухолевых клетках меланомы В16, миелоидного лейкоза человека К562 и карциномы кишечника НСТ116. Влияние на активность топоизомеразы I (Promega, США) изучали в реакции релаксации суперскрученной плазмиды pBR₃₂₂ (Fermentas, Литва).

Результаты. Новый 2-CF₃-антрафурандион ЛХТА-2251 обладает более высокой растворимостью по сравнению с ЛХТА-2034, однако модификация метильной группы в CF₃-группу приводит к 5–10-кратному снижению активности препарата ЛХТА-2251 в отношении тестируемых линий клеток. Изучение влияния веществ на работу топоизомеразы I показало, что новый антрафурандион ЛХТА-2251 также уступает в способности блокировать активность фермента соединению ЛХТА-2034.

Заключение. Замена метильной группы в положении 2 антрафуран-3-карбоксамидов на трифторметильную повышает растворимость производных данного химического класса, однако приводит к падению антипролиферативных свойств, что коррелирует со снижением их способности ингибировать топоизомеразу I.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-33-00908 мол_а.

Е.Г. Тырсица, С.И. Никулицкий, О.О. Рябая, А.Н. Иншаков

ЛОКАЛИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРА VEGFR1

В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

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

Введение. Любые нарушения регуляции ангиогенеза приводят к тяжелым последствиям. В опухоли баланс проангиогенных и антиангиогенных факторов сдвинут в сто-

рону первых. Ключевым белком, стимулирующим образование кровеносных сосудов, является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), а его эффекты определяются взаимодействием с соответствующим рецептором. Наиболее противоречива информация о VEGFR1: до сих пор точно не установлена ни его функция, ни клеточная локализация. Различные изоформы этого рецептора могут проявлять противоположные свойства. Полноразмерный мембраносвязанный mVEGFR1 способствует правильному созреванию кровеносных сосудов в эмбриогенезе, а растворимый sVEGFR1 подавляет ангиогенез. Помимо «сосудистых» функций, VEGFR1 экспрессируется многими опухолевыми клетками и ответственен за их выживание, миграцию, инвазию и метастазирование. Установление точной локализации VEGFR1 в опухолевых клетках позволит в будущем рассматривать его как перспективную мишень в терапии злокачественных новообразований.

Цель исследования – выявить и установить локализацию белка VEGFR1 в опухолевых клетках.

Материалы и методы. В работе использованы линии опухолевых клеток человека различного гистогенеза: A431, A549, Sn12c. Ведение культур осуществляли по стандартной методике. Оценка уровня экспрессии гена *VEGFR1* проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Наличие белка в целых клетках регистрировали с помощью иммуноцитохимического (ИЦХ) исследования и непрямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ) с последующим анализом на проточном цитофлуориметре. Вклад ядерной локализации VEGFR1 оценивали разработанным методом РИФ с экстрагированными интактными ядрами.

Результаты. Во всех трех клеточных линиях обнаружена базальная экспрессия гена *VEGFR1*. По данным ИЦХ-исследования также было установлено, что все перечисленные линии содержат белок VEGFR1, причем наибольшее количество зафиксировано в клетках A431. В связи с этим указанная линия была выбрана для детальных исследований. РИФ с интактными клетками A431 показала практически полное отсутствие VEGFR1 на цитоплазматической оболочке (не более 2,7 %), однако после пермеабиллизации метанолом уровень сигнала возрос до 47,0 %. С целью уточнения внутриклеточной локализации VEGFR1 оценивали количество белка снаружи и внутри ядра. В связи с этим была разработана методика выделения интактных ядер для РИФ. Результаты экспериментов свидетельствуют о присутствии VEGFR1 на наружной ядерной мембране (5,0 %), однако значительно большее количество белка зарегистрировано внутри ядра (18,4 %).

Заключение. Полученные данные по выяснению локализации VEGFR1 позволят подбирать адекватные способы ингибирования его активности, что может привести к снижению злокачественного потенциала опухоли и степени ее васкуляризации.

Е.Г. Тырсица, С.И. Никулицкий, А.Н. Иншаков

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТОРА VEGFR1

НА ИНТАКТНЫХ ЯДРАХ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России, Москва

Введение. Целью многих исследований является регистрация интересующих клеточных белков. Многие годы эту задачу с успехом позволяет реализовать метод проточной цитофлуориметрии. Вместе с тем проточная цитометрия дает возможность детектировать антигены либо на наружной поверхности клетки, либо внутри нее после пермеабилзации. Однако даже регистрация соответствующего протеина внутри клетки не позволяет судить о его распределении по клеточным компартментам. Для решения вопроса о точной внутриклеточной локализации белка применяют вестерн-блоттинг и иммуноцитохимическое исследование, но данные методики являются полуколичественными и трудно сопоставимы с результатами проточной цитометрии. Поэтому возникает необходимость расширить возможности проточной цитометрии, а именно – разделить сигналы от различных компартментов клетки. Такая возможность даст экспериментаторам более тонкий инструмент оценки клеточной реакции на то или иное воздействие.

Цель исследования – оценка количественного содержания рецептора фактора роста эндотелия сосудов I-го типа (VEGFR1) в интактных ядрах методом непрямой реакции иммунофлуоресценции с помощью проточной цитофлуориметрии.

Материалы и методы. Изучали белок VEGFR1. Контрольной для данного протеина была выбрана клеточная линия эпидермоидной карциномы человека A431. В целях идентификации VEGFR1 использовали следующие первичные и вторичные антитела: мышинные анти-VEGFR1 #MAB321 (R&D Systems) и козы антимышинные поликлональные IgG: FITC #STAR70 (AbD Serotec). Для контроля отсутствия цитозольной примеси в ядерном экстракте в качестве первичных применяли кроличьи антитела к β -актину #4970L (Cell Signaling Technology), а вторичных – козы антикроличьи IgG: Alexa Fluor 488 #A-11008 (Invitrogen). Интактность ядер оценивали, анализируя мазки из полученной суспензии, окрашенные азуром и гематоксилином по Майеру.

Результаты. Полученные данные подтвердили, что разработанный нами метод экстракции, очистки и стабилизации ядер подходит для их исследования на проточном цитофлуориметре. Антигены VEGFR1, расположенные на наружной ядерной мембране, оказались доступными для связывания со специфическими антителами (4,9 %). После пермеабилзации кариолеммы метанолом VEGFR1 регистрировался и внутри ядра (18,4 %). В обоих случаях доля ядер, неспецифически связавшихся с вторичными антителами, не превышала 0,1 %. Чистота ядерной фракции по критерию отсутствия цитоплазматического белка β -актина составляла более 99 %. Эти данные были подтверждены результатами микроскопического исследования окрашенных препаратов. При точном соблюдении условий результаты ряда независимых экспериментов хорошо воспроизводились.

Заключение. Разработанный нами метод экстракции, очистки и стабилизации ядер пригоден для идентификации ядерных белков на проточном цитофлуориметре.

Б.С. Федоров, М.А. Фадеев, А.Б. Еремеев, Н.П. Коновалова, С.А. Гончарова, Т.А. Раевская, Д.В. Мищенко
ГИБРИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В КАЧЕСТВЕ ХЕМОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В КОМБИНИРОВАННОЙ ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ
ФГБУН ИПХФ РАН, Черноголовка, Московская область

Введение. Особый интерес представляют попытки снижения побочных эффектов противоопухолевых химиопрепаратов посредством использования в комбинированной химиотерапии малотоксичных хемосенсибилизаторов. Однако выявление таких хемосенсибилизаторов носит случайный характер и не поддается систематизации и выявлению классов веществ с такими свойствами. В этой связи поиск новых низкотоксичных противоопухолевых или адьювантных средств, которые бы резко понизить терапевтические дозы цитостатиков с сохранением терапевтических характеристик, является важнейшей задачей проводимых исследований в области онкологии.

Цель исследования – осуществить синтез, изучить противоопухолевое действие и возможность использования оксиамидов дикарбоновых кислот в качестве адьювантных средств (или хемосенсибилизаторов) в комбинированной цитостатической терапии раковых опухолей в сочетании с цитостатиками.

Материалы и методы. Работа выполнена на мышах-самцах линии BDF₁ массой тела 22–24 г. Содержание животных и эксперименты осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием лабораторных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). В качестве критериев эффективности были использованы количество выживших животных по истечении 60 сут наблюдения после начала терапии, средняя продолжительность жизни (СПЖ) и увеличение СПЖ. Степень ингибирования роста опухоли определяли по торможению ее роста. Рассчитывали также индекс ингибирования метастазов, который позволяет оценить степень метастатического поражения.

Результаты. Использование в комбинированной цитостатической терапии гидроксидов щавелевой, винной и малеиновой кислот в сочетании с цисплатином или циклофосфамидом обеспечивают 100 % выживаемость лейкозных животных, а также полное ингибирование процессов метастазирования при экспериментальных меланоме В16 и карциноме легких Льюис. Следовательно, можно предположить, что нами получены таргетные препараты, которые способны дезактивировать гистондеацетилазу – фермент, участвующий в синтезе ДНК опухолевых клеток. В продолжение этих работ нами синтезированы гибридные соединения на основе дикарбоновых кислот и аминокислот, некоторые из них обеспечивают 50 % выживаемость животных, увеличение СПЖ оставшихся животных составляет 200 %.

Заключение. Таким образом, поиск новых биогенных хемосенсибилизаторов (таргетных препаратов) является многообещающей стратегией в экспериментальной химиотерапии злокачественных новообразований.