

Г.Г. Варванина<sup>1</sup>, А.В. Смирнова<sup>1,2</sup>, А.С. Гуляев<sup>1,3</sup>,  
И.Е. Трубицына<sup>1</sup>, Л.В. Винокурова<sup>1</sup>, К.К. Носкова<sup>1</sup>

#### ИССЛЕДОВАНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МАТРИКСНОЙ МЕТТАЛОПРОТЕАЗЫ 9-ГО ТИПА И ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<sup>1</sup>ГБУЗ МКНЦ ДЗМ, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
Москва, Россия;

<sup>3</sup>ИБГ РАН, Москва

**Введение.** Хроническое воспаление является фоном для развития неопластического роста, в частности хронические панкреатиты (ХП) наиболее частая причина развития рака поджелудочной железы (РПЖ). Факторы ремоделирования межклеточного матрикса (матриксная металлопротеаза 9-го типа, или MMP-9) и связанная с ними система регуляции синтеза эпидермального фактора роста EGF в настоящее время изучены недостаточно.

**Цель исследования** — определить концентрацию MMP-9 и EGF в крови пациентов с заболеваниями ПЖ. Кровь для исследования наиболее доступна, а выбранные параметры определены ввиду их значимости как при воспалении, так и при опухолевом росте.

**Материалы и методы.** 72 пациента с ХП и РПЖ, средний возраст  $54 \pm 12$  лет (46 мужчин и 26 женщин). Для анализа данных пациенты были разделены на 4 группы: группа контроля — 13 (без патологий ПЖ); РПЖ — 16, ХП с постнекротическими кистами — 23, ХП без кистозных образований — 37. В сыворотке крови определяли концентрацию MMP-9 и EGF. Концентрацию белков в крови определяли методом ELISA. Статистический анализ данных проводили непараметрическим методом Манна-Уитни и *post-hoc* теста Дунна для попарного сравнения концентрации MMP-9 в экспериментальных группах, где для коррекции *p*-уровня значимости использован метод Холма. Достоверность различий считали существенной при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Выявлено достоверное повышение уровня MMP-9 в сыворотке крови пациентов с РПЖ по сравнению с группой контроля  $p = 0,008$ . Между группами контроля и ХП (группа с кистами и без)  $p = 0,044$ . Статистически значимых различий между остальными группами не найдено. При сравнении группы с ХП (с кистами и без) и группой контроля была установлена статистически значимая разница концентрации показателя EGF ( $p = 0,004$ ).

**Заключение.** Исследование изменения концентрации MMP-9 и EGF является перспективной темой для дальнейшего изучения хронического воспаления как фактора опухолевого роста.

Г.Г. Варванина<sup>1</sup>, А.С. Гуляев<sup>1,2</sup>, А.В. Смирнова<sup>1,3</sup>,  
Л.В. Винокурова<sup>1</sup>

#### ГЕНДЕРНОЕ РАЗЛИЧИЕ КОЛИЧЕСТВА СЫВОРОТОЧНЫХ МАТРИКСИНОВ И ИХ ИНГИБИТОРА ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

<sup>1</sup>ГБУЗ МКНЦ ДЗМ, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ИБГ РАН, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,  
Москва, Россия

**Введение.** Причины развития хронического панкреатита (ХП) у мужчин и женщин различны. Вопрос гендерных отличий в показателях активного процесса воспалительного ремоделирования межклеточного матрикса, как фонового состояния для возникновения опухолей, является актуальным.

**Цель исследования** — определить концентрацию MMP-2, MMP-9 и TIMP-2 в крови пациентов с ХП и уточнить наличие гендерных различий.

**Материалы и методы.** Кровь пациентов, страдающих ХП более 7 лет (75 человек, из них женщины — 44, мужчины — 31), и практически здоровых людей (13 человек). Выделены сравнимые по количеству подгруппы: киста, рак предстательной железы (РПЖ), ХП. Белки определяли в плазме венозной крови методом ELISA. Статистический анализ различий медианных значений при различных заболеваниях и в контроле проводили с помощью теста Краскелла-Уоллиса, для множественных попарных сравнений использовали *post-hoc* тест Дунна с поправкой Холма; для расчета коэффициента корреляции использовали ранговый тест Спирмена. Расчеты проводили в среде R (пакеты stats, RCMR, ggplot2).

**Результаты.** При сравнении групп пациентов с ХП, состоявших как из мужчин, так и из женщин, была установлена статистически значимая разница концентрации MMP-9 ( $p = 0,012$ ) и TIMP-2 ( $p = 0,03$ ) с практически здоровыми людьми. При сравнении групп были определены изменения MMP-9 для групп контроля и РПЖ, а также практически здоровых и всех типов пациентов с ХП (группа с ХП и с кистами)  $p = 0,008$  и  $0,044$  соответственно, и для TIMP-2 при сравнении группы пациентов с кистами и ХП. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между концентрацией TIMP-2 и MMP-2 во всей выборке пациентов равен  $\rho = 0,37$  ( $S = 74490$ ,  $p = 0,0004$ ), однако эти коэффициенты для TIMP-2, MMP-2 и MMP-9 статистически незначимы. Коэффициент линейной регрессии TIMP-2 по MMP-2 был статистически значим, но невелик, так же как и коэффициент детерминации:  $82,77 + 0,17$ ,  $R^2 = 0,12$ ,  $p < 0,001$  для всех коэффициентов. При анализе по отдельности группы женщин и мужчин установлено существование гендерной специфики: у женщин ранговый коэффициент корреляции Спирмена между TIMP-2 и MMP-2 существенно выше, чем в смешанной выборке, и составляет  $\rho = 0,62$  ( $S = 4380,7$ ,  $p < 0,0001$ ), в то время как у мужчин никакой существенной зависимости между этими показателями не наблюдали.

**Заключение.** В выбранной нами популяции течение воспалительного процесса ПЖ у женщин и мужчин различается. Реакция межклеточных факторов ремоделирования

зависит от пола пациента, что должно учитываться для разработки алгоритмов диагностики и создания панелей диагностических систем для раннего выявления рака ПЖ при ХП.

**А.А. Вартамян, О.С. Бурова, М.А. Барышникова**  
**ВОВЛЕЧЕНИЕ АУТОФАГИИ В ВАСКУЛОГЕННУЮ МИМИКРИЮ ПРИ МЕЛАНОМЕ**

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

**Введение.** Аутофагия рассматривается как катаболический процесс удаления отработанных органелл, долгоживущих белков, патогенов и продуктов распада с помощью двухмембранных аутофагосом, в результате которого клетка самообновляется и поддерживает жизнеспособность. Аутофагия сопровождает жизнедеятельность нормальной клетки на протяжении всего времени ее существования и, по всей видимости, является элементом клеточной защиты. В последние годы получены доказательства существования альтернативной системы кровоснабжения опухоли — васкулогенной мимикрии (ВМ): формирование опухолевыми клетками в отсутствие эндотелиальных клеток васкулярных каналов, ограниченных базальной мембраной.

**Цель исследования** — выявить взаимосвязь между аутофагией и ВМ.

**Материалы и методы.** В работе были использованы 2D- и 3D-культивирование клеток меланомы, выведенных в клеточную линию из операционного материала пациентов с диссеминированной меланомой, электрофорез и Вестерн блот, нокдаун гена с помощью малых интерферирующих РНК, проточная цитофлуориметрия.

**Результаты.** Об уровне активации аутофагии в клетках меланомы судили по экспрессии LC-3B — маркера необратимой стадии аутофагии. В клеточной линии меланомы с мутацией в *BRAFV600E* LC-3B экспрессировали  $22 \pm 2$  % клеток, а в клеточной линии меланомы дикого типа этот белок экспрессировали  $94 \pm 5$  % клеток. Блокирование аутофагии 3-Ма, ингибитором инициации аутофагии, приводило к заметному снижению способности клеток меланомы формировать в 3D-культуре сосудисто-подобные структуры (СПС). Блокирование поздней стадии аутофагии (слияния фагофор с лизосомами) хлорокином также ингибировало формирование СПС. Полученные результаты были подтверждены нокдауном гена *BECN1*, участвующего в инициации аутофагии, и гена *ATG5* — маркера функционально активной аутофагосомы. Нокдаун гена *BECN1* в клетках меланомы, формирующих СПС, малыми интерферирующими РНК снижал уровень белка beclin1 на 70–75 % и блокировал формирование СПС на Матригле. Клетки меланомы с нокдауном гена *ATG5* на Матригле «ошаривались», но сохраняли способность мигрировать и узнавать друг друга, формирование СПС не наблюдалось.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что аутофагия активно участвует в формировании СПС. Мы предполагаем, что аутофагия в прогрессии опухоли выполняет двойную функцию — снижает эффективность химиотерапии и способствует формированию дополнительной васкулярной сети, ВМ, которая может частично

компенсировать недостаточно быстрое развитие в опухоли кровеносной сети.

**П.И. Васильчиков, А.Д. Перенков, Д.В. Новиков, С.В. Шумилова, Н.А. Новикова, В.В. Новиков**  
**РЕКОМБИНАНТНЫЙ ИММУНОТОКСИН ПРОТИВ МУЦИНА 1 НА ОСНОВЕ SCFV МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ИКО25 И РОТАВИРУСНОГО ЭНТЕРОТОКСИНА NSP4**

ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

**Введение.** Одним из перспективных направлений в терапии онкологических заболеваний является использование антител против опухолеассоциированных антигенов. Ранее в РОНЦ им. Н.Н. Блохина были получены моноклональные антитела (МКА) мыши ИКО25, специфичные к Муцину 1 (MUC1) человека, для которых показана возможность использования в иммунотерапии опухолей. В клетках *E. coli* нами был получен рекомбинантный аналог антител против MUC1, представляющий собой объединенные в одну молекулу переменные фрагменты легкой и тяжелой цепей (scFv) МКА ИКО25. Для усиления противоопухолевого действия scFv был слит с фрагментом молекулы ротавирусного энтеротоксина NSP4, что привело к получению иммунотоксина scFv-NSP4. Согласно литературным данным, NSP4 обладает мембранодестабилизирующим действием и способностью индуцировать апоптоз в клетках линий колоректального рака (HT — 29) и рака тела матки (HeLa).

**Цель исследования** — изучить характер взаимодействия иммунотоксина scFv-NSP4 с клеточными линиями, экспрессирующими и не экспрессирующими MUC1.

**Материалы и методы.** Культуры клеток MCF-7, Colo-205, Saso-2, предоставленные РОНЦ им. Н.Н. Блохина, выращивали по стандартному протоколу. Иммунотоксин scFv-NSP4 экспрессировали в *E. coli* и очищали хроматографически. Полученный препарат scFv-NSP4 и МКА ИКО25 (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) метили активированным эфиром флуоресцентного красителя Cy-5 и методом проточной цитометрии, оценивали взаимодействие с клетками линий MCF-7, Colo-205 и Saso-2.

**Результаты.** Показано, что иммунотоксин scFv-NSP4 взаимодействовал с 99,2 и 98 % клеток линий Colo-205 и MCF-7, экспрессирующих MUC1, соответственно. Флуоресценция клеток линии Saso-2, не экспрессирующих MUC1, регистрировалась лишь в 0,33 % случаев, что, вероятно, связано с неспецифическим взаимодействием. При этом уровень флуоресценции рекомбинантного иммунотоксина scFv-NSP4 на поверхности клеток линии Colo-205 был в 1,8 раз выше, чем на поверхности клеток линии MCF-7. Полученные данные совпадали с результатами окрашивания клеток с использованием МКА ИКО25. Следует отметить, что уровень флуоресценции клеток, окрашенных рекомбинантным иммунотоксином, в среднем в 2,5 раза превышал уровень флуоресценции клеток, окрашенных МКА ИКО25.

**Заключение.** Таким образом, рекомбинантный иммунотоксин scFv-NSP4 проявлял сходную с МКА ИКО25 специфичность связывания с MUC1 антигеном на поверхности опухолевых клеток. Повышенный уровень флуорес-