

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. Вартанян, О.С. Бутова, 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-3В — маркера необратимой стадии аутофагии. В клеточной линии меланомы с мутацией в *BRAFV600E* LC-3В экспрессировали 22 ± 2 % клеток, а в клеточной линии меланомы дикого типа этот белок экспрессировали 94 ± 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 «осаривались», 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 вариабельные 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 (НТ — 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, Сасо-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 Сасо-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 Сасо-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-