

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах
подготовленной научно-квалификационной работы
(диссертации)

**Исследование резистентности опухолевых клонов под влиянием
лекарственной терапии**

Ни Валерия Игоревна

30.06.01 Фундаментальная медицина

03.03.01 Физиология

научные руководители

профессор, член-корр. РАН Имянитов Евгений Наумович

к.б.н., с.н.с. Гальперина Елизавета Иосифовна

Санкт-Петербург

2021 год

Оглавление

| | |
|---|----|
| Общая характеристика работы | 3 |
| Глава 1. Современные представления о методах определения спектра химиочувствительности опухолей..... | 5 |
| 1.1.1 Ксенографты..... | 5 |
| 1.1.2 МТТ-тест..... | 6 |
| 1.1.3 Органная культура | 7 |
| 1.1.4 Микрофлюидные системы | 7 |
| 1.1.5 Тканевые пластинки (organotypic tumor slises)..... | 7 |
| 1.2.1 Рак яичника..... | 8 |
| 1.2.2 Молекулярные особенности рака яичника | 8 |
| Глава 2. Материалы и методы..... | 10 |
| 2.1 МТТ-тест..... | 10 |
| 2.2 Тканевые пластинки..... | 11 |
| 2.3 Анализ экспрессии мРНК..... | 14 |
| Глава 3. Результаты..... | 15 |
| 3.1 МТТ-тест..... | 15 |
| 3.2 Тканевые пластинки..... | 16 |
| 3.3 Клинические случаи..... | 20 |
| Выводы..... | 22 |
| Список публикаций по теме диссертации | 23 |
| Список литературы | 24 |

Общая характеристика работы Актуальность темы исследования

На сегодня стандартом лечения рака яичника (в частности, серозных карцином высокой степени злокачественности, HGSOС) является терапия препаратами платины в сочетании с циторедуктивной операцией [1,2]. Однако, несмотря на высокую чувствительность к платиносодержащей терапии, данная опухоль склонна к рецидивированию, приобретая, как правило, платинорезистентность [3,4]. Таким образом, изучение спектров химиочувствительности клеток рака яичника (в основном, рецидивирующих случаев) представляется актуальной задачей.

В рамках данной работы планируется сравнение методов анализа чувствительности клеток серозных карцином яичника высокой степени злокачественности к платиносодержащим препаратам и другим цитостатикам. Предполагается сопоставление клинической картины и результатов лабораторных экспериментов. В случае установления подобного соответствия, возможно внедрение подбора терапии на основе данного тестирования.

Цели и задачи

Цель исследования – разработка *in vitro* моделей для персонализированного определения спектра химиочувствительности опухолей яичника.

Задачи:

1. Провести оценку апоптотической активности в ответ на применение химиотерапии с помощью МТТ-тестов и тканевых пластинок РЯ;
2. Сопоставить полученные данные с клиническими для установления соответствия;
3. Провести анализ экспрессии мРНК в тканевых пластинках РЯ, обработанных цитостатическими препаратами – цисплатином и митомицином;
4. Выбрать оптимальный метод для использования в рутинной диагностике.

Положения, выносимые на защиту

1. МТТ-тест не является достаточно достоверным для использования в рутинной диагностике химиочувствительности рака яичника;

2. Протокол, основанный на тканевых пластинках, несмотря на большую трудоемкость, является более достоверным методом для определения спектра химиочувствительности карцином яичника.

Новизна

- 1) Будет предложен экспресс-тест на химиочувствительность опухолей яичника, основанный на анализе тканевых пластинок, полученных непосредственно из нативной опухоли; будет установлено, насколько результаты теста *in vitro* соответствуют клиническим данным об эффективности лечения; если подобное соответствие будет наблюдаться, возможна апробация данного метода в клинической практике;
- 2) Анализ экспрессии мРНК позволит раскрыть механизмы возникновения резистентности в серозных карциномах яичника высокой степени злокачественности.

Теоретические и практическое значение работы

Апробация работы

Основные результаты диссертационного исследования дважды доложены и обсуждены на Петербургском онкологическом международном форуме «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2019, 2021), а также на Европейском конгрессе, посвященном онкогинекологии (ESGO, 2021)

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 19-15-00168

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы в журналах, индексируемых в SCOPUS и Web Of Science.

Глава 1. Современные представления о методах определения спектра химиочувствительности опухолей

Различные *in vitro* модели, используемые для определения спектра химиочувствительности опухолей, особенно экспериментальные, имеют большое потенциальное значение в клинической практике. Несмотря на имеющиеся клинические рекомендации, предсказать поведение опухоли не всегда представляется возможным ввиду спонтанно возникающей резистентности [5]. Внедрение новых методов диагностики химиочувствительности позволит подбирать индивидуальную эффективную терапию для каждого пациента.

На сегодняшний день существует несколько путей для определения спектра химиочувствительности опухолевых клеток.

1.1.1 Ксенографты

Одним из первых способов, разработанных для определения спектра химиочувствительности опухолей, является применение ксенографтов. Суть данного метода состоит во вживлении фрагментов нативной опухоли пациента в организм иммунодефицитного лабораторного животного. Перевивание происходит либо подкожно, либо ортотопически (если ткань перевивается в область аналогичного органа). Для подобных экспериментов используются мыши, например, SCID, NOD-SCID, NSG, Balb/c Nude [6]. Отличительной особенностью этих животных является их иммунодефицитный статус. Как следствие, опухоли хорошо приживаются, сохраняя свои гистологические свойства, иммунологические и молекулярно-генетические особенности [6-8]. В дальнейшем выращенную на первичном животном опухоль перевивают другим иммунодефицитным мышам-реципиентам, на которых тестируются различные варианты химиотерапии. Ответ на лечение оценивается по торможению роста опухоли, и стоит отметить, что в большинстве случаев полученные на ксенографтах результаты соотносятся с ответом опухоли непосредственно у пациента [9-11].

К сожалению, несмотря на все достоинства метода, у него имеется ряд существенных недостатков. Одним из самых важных минусов с точки зрения применения на практике является длительность эксперимента, так как для приживления ксенографта требуется около 4-8 месяцев, а также дополнительное время для создания дочерних опухолей, при этом процент приживания опухоли не превышает 50%, а обычно он на порядок меньше [12]. Помимо этого, лабораторные животные, такие как

иммунодефицитные мыши, которые сами по себе дорогостоящи, требуют специальных условий содержания и высококвалифицированного персонала.

1.1.2 МТТ-тест

МТТ-тест – это колориметрический метод, позволяющий определить спектр химиочувствительности опухоли, материалом для которого служат клеточные культуры, полученные либо из опухоли, либо из жидкости (асцитической или плевральной, подвергнувшейся опухолевой диссеминации). В основе данного эксперимента лежит химическое превращение желтого тетразола (МТТ) в формазан (соединение насыщенного пурпурного цвета) в клетках с помощью НАДФ-Н-зависимых клеточных оксидоредуктазных ферментов [13,14]. Исходя из вышесказанного, следует вывод о том, что подобного рода эксперименты оценивают митохондриальную активность клеток, снижение которой сигнализирует об угнетении жизненных функций материала [15].

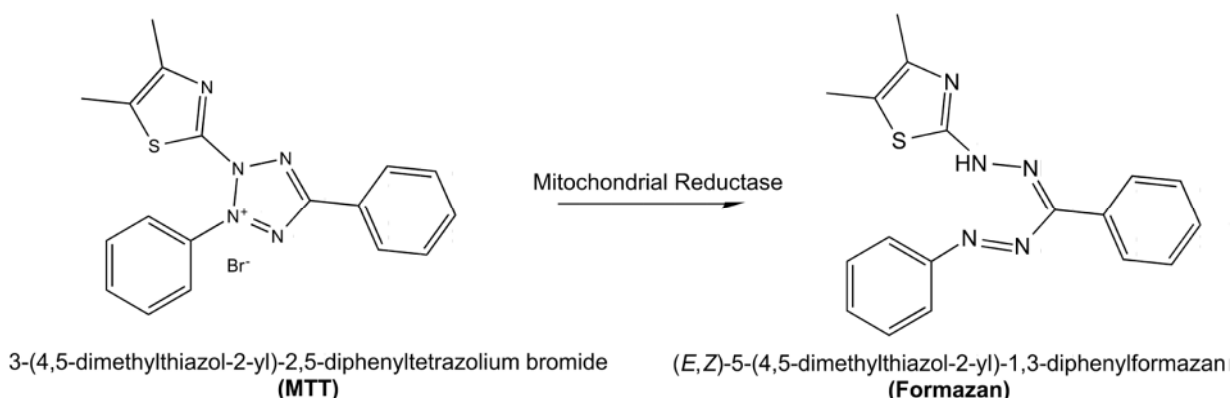


Рисунок 1. Химическая реакция превращения МТТ в формазан.

Дальнейшая фотометрия позволяет оценивать метаболическую активность клеточной линии, и, соответственно, степень токсичности добавленных в питательную среду препаратов.

Неоспоримым достоинством данного способа является простота получения культуры, ее неограниченный рост, обусловленный способностью клеток пролиферировать не только в организме, но и в питательных средах при наличии всех необходимых для жизнедеятельности химических веществ [15].

Минусом получения клеточных культур из опухоли является ферментативная и механическая обработка, что является причиной дополнительного стрессового

повреждением клеток, что может приводить к изменению молекулярного профиля и, как следствие, снижению достоверности метода.

Также полученные культуры не отображают гистологические особенности опухоли, ее структуру.

1.1.3 Органная культура

Существуют методики, позволяющие культивировать клетки не просто на пластике, а на особом каркасе, позволяющем хотя бы частично сохранять гистологическое строение нативной ткани. Для этого применяются либо некие синтетические производные, например, ацетат вискозы, различные гелевые подложки или даже металлическая сетка. В этом случае рост ткани происходит на границе фаз жидкость-газ, что позволяет предотвратить развитие некрозов [16].

Также при данном типе культивирования возможно использование нескольких типов клеток. Одни из них, иммортализованные или с органичным митотическим потенциалом, используются в качестве матрикса, на котором выращивается непосредственно интересующая нас культура. Подобного рода трехмерная структура поддерживает клетки, имитируя тканевую структуру [16].

К недостаткам метода можно отнести излишнюю трудоемкость получения, невозможность длительного поддержания *in vitro*, что ограничивает применение подобного способа в рутинной экспериментальной и диагностической работе.

1.1.4 Микрофлюидные системы

Одним из способов создания условий, приближенных к организменным, является использование микрофлюидных систем. Они состоят из оптически прозрачных материалов (стекло, пластик, полидиметилсуксан) и содержат компоненты, имитирующие транспорт веществ по аналогии с процессами, происходящими непосредственно в организме [17]. На сегодняшний день существует множество вариаций данных устройств, позволяющих имитировать не только тканеспецифичное окружение, но и, например, пути взаимодействия опухоли с лимфатической системой [18].

1.1.5 Тканевые пластинки (organotypic tumor slises)

Одним из способов сохранить строение нативной опухоли является применение тканевых опухолевых пластинок (organotypic tumor slises, эксплантов, слайсов). Они представляют собой тонкие серийные срезы (300-400 мкм), полученные с помощью

вибрационного микротомы из фрагмента нативной опухоли, и помещенные в питательную среду [19,20]. На сегодняшний день показано, что слайсы способны сохранять жизнеспособность до 7 суток. [21,22]. Несмотря на ограничения, связанные с краткосрочным культивированием, возможные трудности, связанные с диффузией препарата в центр пластинки и сложности с наблюдением в реальном времени, у этого метода есть ряд неоспоримых плюсов. Например, простота получения эксплантов, сохранение цитоархитектоники нативной опухоли, иммунологических, молекулярно-генетических особенностей. Неоспоримым достоинством является возможность использовать серию срезов для тестирования химиочувствительности к различным категориям препаратов и подбора персонализированной терапии. Благодаря этому можно считать применение тканевых опухолевых пластинок перспективной моделью для оперативного подбора терапии.

1.2.1 Рак яичника

Рак яичника является одним из распространенных онкозаболеваний и занимает седьмое место среди злокачественных новообразований у женщин. Также опухоль данной локализации находится на восьмом месте среди причин женской смертности в онкологии, и на третьем – в онкогинекологии [23] Согласно данным ВОЗ, ежегодно выявляется 225,5 тысяч новых случаев РЯ и 140,2 тысяч женщин погибает от данного заболевания.

Первичная терапия РЯ включает в себя препараты платины. Однако, несмотря на ее эффективность, в большинстве случаев возникают рецидивы. Например, у 25% пациенток заболевание прогрессирует в течение года после завершения терапии, у 50% рецидив возникает в течение полутора лет, а пятилетняя выживаемость даже в развитых странах не превышает 40-50% [24].

1.2.2 Молекулярные особенности рака яичника

Наиболее часто рак яичника ассоциирован с наследственными мутациями в *BRCA1/2*. Примерно 22-28% случаев данного заболевания обусловлено нарушениями именно в этих генах [25]. Функцией белкового продукта *BRCA1/2* является репарация двунитевых разрывов ДНК. В опухоли зачастую наблюдается феномен утери «здорового» аллеля, что обуславливает особенности спектра химиочувствительности данной опухоли (чувствительность к препаратам платины, например, цисплатину). Однако, несмотря на это, в новообразовании присутствуют опухолевые клоны, не утратившие *BRCA1/2*, и именно этот клон подвергается селекции во время терапии. Это один из огромного количества вариантов развития платинорезистентных рецидивов рака яичника.

Наиболее часто встречается high-grade серозная карцинома яичника (HGOS), до 70% случаев РЯ приходится на эту нозологию. Именно для неё характерны соматические мутации в гене *TP53* [26].

Ген *TP53* носит неофициальное название «страж генома», что обусловлено его функциями. При накоплении повреждений ДНК данный фактор активируется и останавливает смену клеточных циклов. Подобная задержка клеточного цикла позволяет клеткам восстановить накопленные повреждения ДНК перед переходом в следующую фазу. Однако при чрезмерной активации именно p53 запускает программируемую клеточную смерть (апоптоз).

Эксперименты мышинных клеточных линиях показали, что наличие мутантных изоформ p53 приводит к возникновению резистентности к различным видам воздействий, как физических (гамма-излучение), так и химических (цисплатин и доксорубицин) [27]. Похожий эффект был обнаружен позднее на культуре рака легкого [28]. В дальнейшем значение подобных открытий было продемонстрировано, что при подавлении мутантного p53 чувствительность опухолевых клеток к различным видам терапии возрастает [28].

Глава 2. Материалы и методы

Все планируемые экспериментальные процедуры проводились в соответствии с этическими стандартами национального комитета по исследовательской этике и рекомендациями Европейского сообщества по генетике человека. Информированное согласие больного является обязательным условием его участия в данном исследовании.

Для определения спектра химиочувствительности опухолей яичника было выбрано два метода – эксперименты на тканевых пластинках и МТТ-тест. Выбор МТТ-теста обусловлен простотой получения клеточного материала (выведение клеточных культур из асцитической жидкости). Тканевые пластинки же позволяют нам визуально оценивать патоморфоз опухоли, уровень апоптотической активности. Также благодаря сохранению цитоархитектоники нативной опухоли данный метод позволяет наблюдать комплексный ответ на терапию.

2.1 МТТ-тест

МТТ-тест – это колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток. В основе данного исследования лежит активность митохондриальной редуктазы, которая превращает МТТ в формазан.

Одним из неоспоримых достоинств метода можно считать простоту получения материала, поскольку асцит является распространенным осложнением РЯ.

Данный метод включает в себя следующие этапы:

1. Получение культур клеток из асцитической жидкости пациенток, страдающих РЯ;
2. Проведение МТТ-теста на полученных образцах;
3. Молекулярно-генетический анализ клеток на том пассаже, на котором ставился тест (с помощью секвенирования нового поколения, NGS).

Для проведения эксперимента использовалась клеточная культура, полученная из асцитической жидкости, не достигшая третьего пассажа, поскольку при дальнейшем культивировании клетки могут утрачивать свойства опухолевых.

Подбор лекарственных средств осуществлялся на основе существующих протоколов лечения рака яичника и результатов клинических исследований. В данном случае выбор был остановлен на следующих препаратах и их комбинациях:

- Митомицин-С;
- Цисплатин;

- Паклитаксел;
- Сочетание митомицина и цисплатина;
- Сочетание митомицина и паклитаксела.

Одним из ключевых моментов данной методики является определение IC50.

IC50 – это доза полулетального ингибирования, являющаяся характеристикой эффективности химиопрепарата. Данный показатель является количественным, отображая количество лиганда, требуемое для гибели 50% клеток в культуре.

Величина IC50 для конкретного препарата определяется путём построения кривой доза-эффект.

Для этого необходимо:

1. Рассчитать процент выживших клеток для различных препаратов и их комбинаций;
2. Построить кривую доза-эффект;
3. Определить с помощью полученного графика IC50;
4. Соотнести полученное значение с диапазоном IC50, характерным для чувствительных к этому препарату клеток.

Основная цель проведения секвенирования нового поколения, NGS, состоит в верификации клеток, полученных на интересующем нас пассаже. Именно с помощью этого метода планировалось определение принадлежности полученных клеток к опухолевым, поскольку для серозных карцином яичника характерны мутации в гене *TP53* [4].

2.2 Тканевые пластинки

В качестве альтернативного способа определения спектра химиочувствительности был выбран метод тканевых пластинок (эксплантов; organotypic tumor slises).

Злокачественные опухоли, помимо раковых, состоят из иммунных, эндотелиальных клеток, фибробластов и внеклеточной матрицы. Подобное микроокружение имеет большое значение при изучении биологии рака и, в частности, ответа на химиотерапию. Применение тканевых пластинок, в которых сохранена цитоархитектоника новообразования, позволяет получить более достоверные данные по химиочувствительности, чем, например, МТТ-тест.

Ниже приведена схема работы с тканевыми пластинками серозных карцином яичника высокой степени злокачественности.

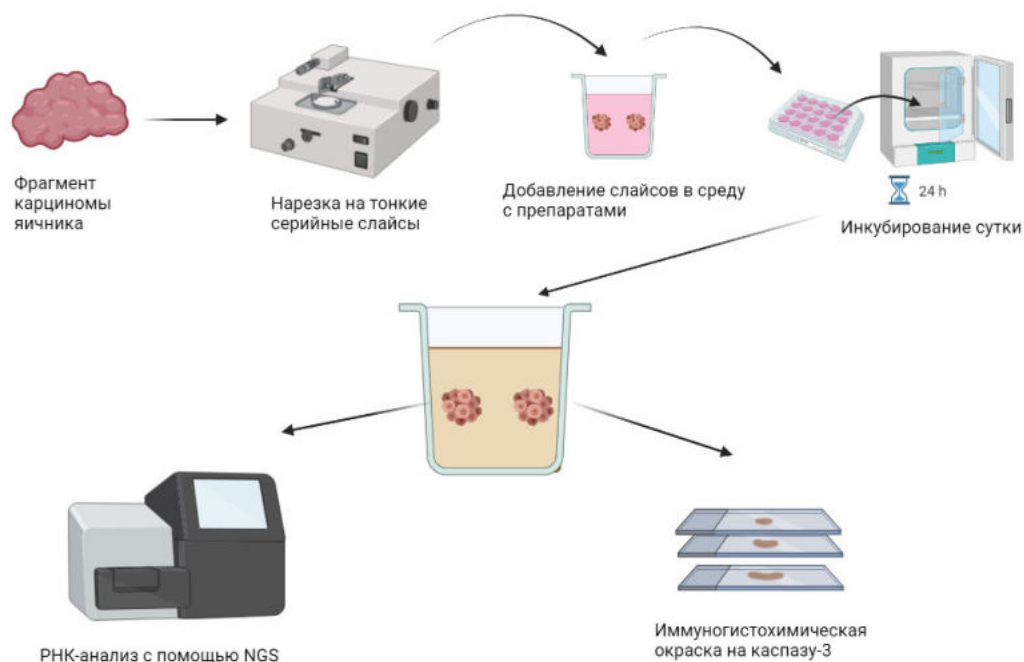
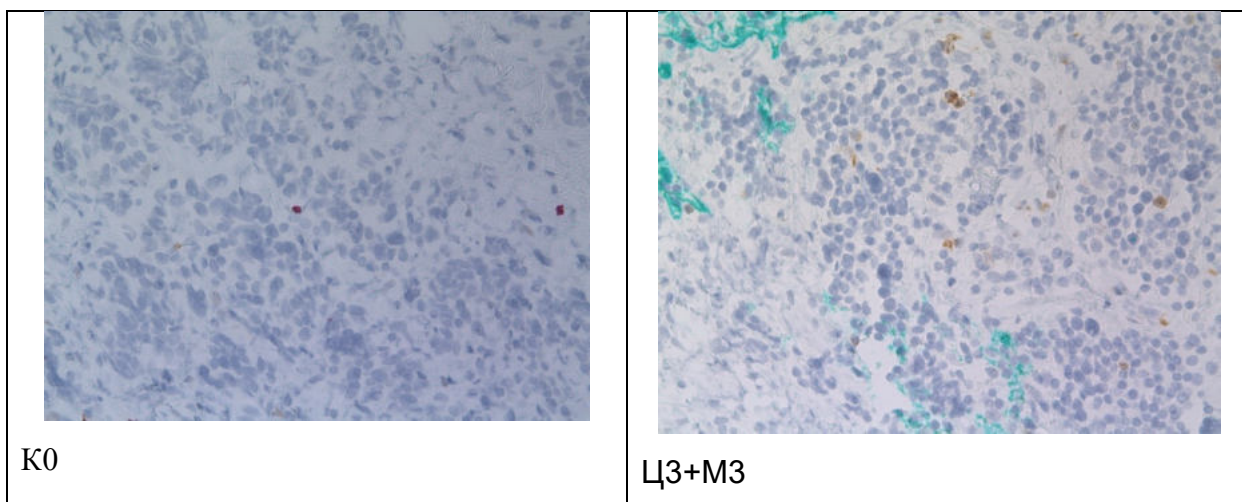


Рисунок 2. Схема эксперимента на тканевых пластинках

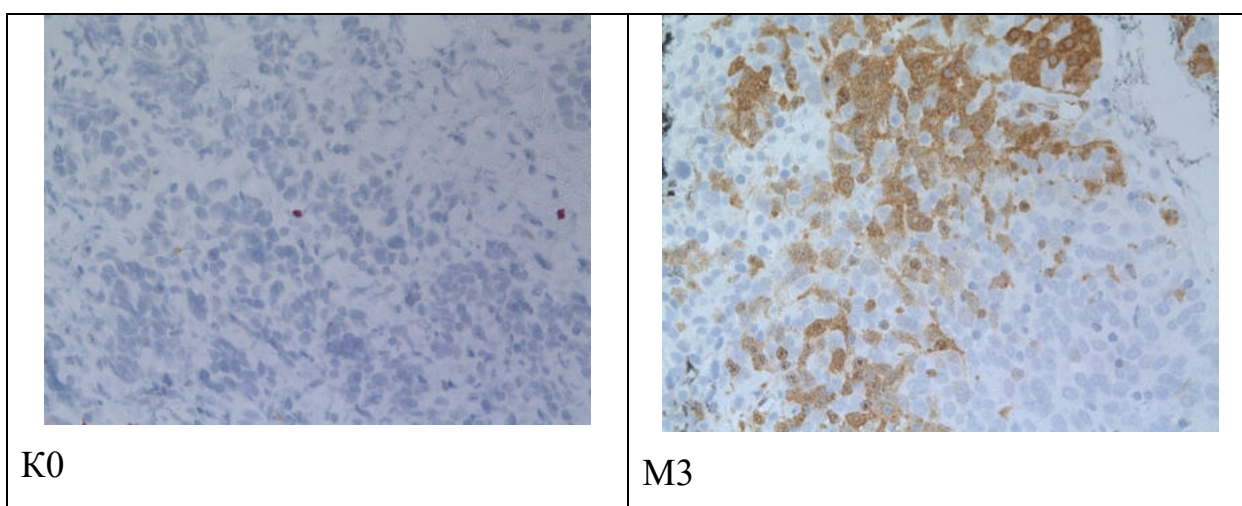
1. Фрагмент нативной опухоли нарезался на тонкие серийные слайсы толщиной 400 мкм;
2. Полученные слайсы попарно помещались в питательную среду, содержащую химиопрепараты в различных концентрациях (митомидин Ц в концентрации 30 мкг/мл и 70 мкг/мл, цисплатин – 10 мкг/мл и 20 мкг/мл) и их комбинации (митомидин С 30 мкг/мл + цисплатин 10 мкг/мл и митомидин С 70 мкг/мл + цисплатин 20 мкг/мл);
3. Пластинки выдерживались 24 часа в CO₂-инкубаторе;
4. Одна пластинка заливалась парафином для создания блока и проведения иммуногистохимического исследования (ИГХ), а вторая использовалась для выделения РНК и последующего секвенирования для определения изменения экспрессионного профиля.

Пластинки, которые помещались в гистологические блоки, подвергались окраске антителами на каспазу-3 (маркер программируемой клеточной гибели). В качестве контролей апоптотической активности использовались слайсы, не подвергавшиеся инкубации и слайсы, инкубированные в питательной среде без добавления химиопрепаратов. Оценка осуществлялась визуально в зависимости от количества окрашенных клеток.

Ниже приведен пример устойчивости опухоли к комбинации препаратов. Слева расположена фотография пластинки, полученной из нативной опухоли без инкубации в питательной среде, справа – пластинка, выдержанная в комбинации препаратов. Как можно заметить, на изображении справа присутствует окраска единичных клеток, что говорит об отсутствии апоптотической активности в данном образце и резистентности опухоли.



Фотографии ниже демонстрируют разницу в апоптотической активности контрольного и чувствительного образцов. Справа – пластинка, подвергавшаяся воздействию цитостатика. Количество клеток, окрасившихся каспазой-3, демонстрирует активацию сигнальных путей, связанных с апоптозом в значительном количестве опухолевых клеток. Таким образом можно сделать вывод о чувствительности данного образца к препарату (в данном случае это Митомицин Ц).



Данный метод позволяет визуализировать апоптотическую активность под воздействием лекарств, что, неоспоримо, является его преимуществом. Также стоит отметить, что в состав опухоли входят не только злокачественные клетки, но и

стромальные, иммунные клетки, соединительнотканые элементы. Таким образом, сохранение цитоархитектоники нативной опухоли позволяет нам оценивать комплексный ответ на терапевтическое воздействие.

2.3 Анализ экспрессии мРНК

Анализ экспрессии мРНК осуществлялся с помощью панели Qiagen Human Cancer Transcriptome, включающей 395 генов, вовлеченных в апоптоз, клеточное старение, метаболизм, эпителиально-мезенхимальный переход, регуляцию клеточного цикла, ангиогенез, поддержание теломер, репарацию ДНК и ответ на гипоксию.

Ниже на рисунке 3 приведена последовательность шагов при работе с образцами, подвергавшимися секвенированию. На первом этапе требуется синтез кДНК, поскольку данная структура является более устойчивой, чем РНК. На втором к изучаемой последовательности добавлялась заведомо известная последовательность, по которой в дальнейшем происходила верификация образцов. После пробы очищались от остаточных продуктов реакции, затем ставилась ПЦР, в результате которой к продукту добавлялась универсальная последовательность. Затем следуют очистка продукта и обогащение полученной библиотеки.

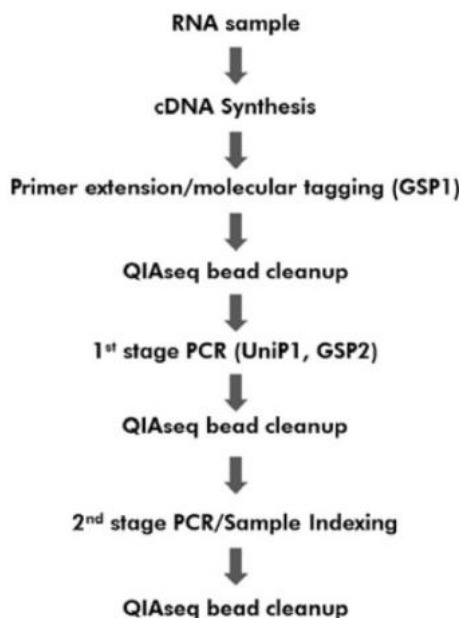


Рисунок 3. Последовательность этапов подготовки обогащенной библиотеки РНК с помощью набора Qiagen Human Cancer Transcriptome.

Глава 3. Результаты

3.1 МТТ-тест

Было получено 99 образцов асцитической жидкости от пациенток, страдающих раком яичника, полученных во время диагностического лапароцентеза. Только для 45 из них (49%) удалось нарастить достаточное количество клеточной массы для выполнения МТТ-теста и сопоставления с клинической картиной. Результаты приведены в таблице ниже.

Таблица 1. Чувствительность клеток асцитической жидкости к различным цитостатикам и их комбинациям. В заключении представлены результаты сопоставления полученных данных с историями болезни (наличие либо отсутствие соответствия)

| N | Митомицин | Цисплатин | Паклитаксел | Митомицин + Цисплатин | Паклитаксел+ Цисплатин | Заключение |
|------|-----------|-----------|-------------|-----------------------|------------------------|------------|
| OC17 | Нет | Нет | х | Нет | х | Нет |
| OC28 | Да | Да | Да | Да | Нет | Да |
| OC32 | Да | Нет | х | Да | Х | Нет |
| OC38 | Да | Нет | Нет | Да | Да | Да |
| OC43 | Да | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет |
| OC44 | Нет | Да | Нет | Нет | Да | Нет |
| OC46 | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет | Да |
| OC49 | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет |
| OC50 | Да | Нет | Нет | Да | Да | Нет |
| OC51 | Нет | Нет | Нет | Да | Нет | Да |
| OC52 | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет |
| OC54 | Да | Нет | Нет | Нет | Нет | Да |
| OC55 | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет | Да |
| OC56 | Да | Нет | Нет | Да | Да | Нет |
| OC57 | Нет | Нет | Нет | Да | Да | Нет |
| OC58 | Да | Нет | Нет | Да | Да | Нет данных |
| OC61 | Нет | Нет | Нет | нет | Нет | Нет |
| OC62 | Да | Нет | Нет | Да | Нет | Нет |
| OC64 | Да | Нет | Нет | Да | Нет | Нет |
| OC65 | Да | Нет | Нет | Да | Нет | Нет |
| OC66 | Да | Нет | Нет | Да | Нет | Нет |
| OC67 | Да | Нет | Нет | Да | Нет | Нет |
| OC68 | Да | Нет | Нет | Да | Нет | Нет |
| OC69 | Да | Нет | Нет | Да | Да | Нет |
| OC75 | Нет | Нет | Нет | Нет | нет | Нет данных |
| OC77 | Да | Да | Нет | Да | Да | Нет |
| OC79 | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет |
| OC80 | Нет | Нет | Нет | Да | Нет | Нет |
| OC82 | Да | Нет | Нет | Да | Нет | Да |

| | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| OC83 | Да | Нет | Нет | Да | Нет | Нет |
| OC84 | Нет | Нет | Нет | Да | Нет | Нет |
| OC85 | Нет | Нет | Нет | Да | нет | Нет данных |
| OC87 | Да | Нет | Нет | Да | Да | Нет |
| OC88 | Да | Нет | Нет | Да | нет | Нет |
| OC89 | Да | Нет | Нет | Да | Да | Нет |
| OC90 | Да | Нет | Нет | Да | Да | Нет данных |
| OC91 | Да | Нет | Нет | Да | Да | Нет |
| OC92 | Да | Нет | Нет | Нет | Да | Нет |
| OC93 | Да | Да | Да | Да | Да | Да |
| OC94 | Да | Нет | нет | Да | Нет | Нет данных |
| OC95 | нет | Да | нет | Да | Нет | Нет данных |
| OC96 | Да | Да | нет | Да | Да | Нет данных |
| OC97 | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет | Да |
| OC98 | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет | Нет данных |
| OC99 | Да | Да | Да | Да | Да | Да |

Как оказалось, в 27 случаях из 45 (60%) полученные в результате МТТ-тестирования данные не соответствуют клиническим данным, в 10 (22%) случаях удалось обнаружить соответствие, а в 8 (17%) не поступили клинические данные. Поскольку причины данного несоответствия были неясны, было решено использовать секвенирование нового поколения для верификации использованных культур.

Для 27 образцов клеточной культуры был проведен молекулярно-генетический тест, связанный с анализом последовательности ассоциированных с канцерогенезом генов. В результате оказалось, что мутации в гене *TP53*, характерные для серозных карцином яичника высокой степени злокачественности [24], присутствуют у 2 (7,4%) пациенток. Это говорит о том, что практически во всех поставленных МТТ-тестах отсутствуют опухолевые клетки. Возможно, причина кроется в том, что часть асцитов была получена практически сразу после получения химиотерапии пациентками, и поврежденные опухолевые клетки вытеснялись в культуре фибробластами. Исходя из этого был сделан вывод о непригодности данного метода для рутинной диагностики.

3.2 Тканевые пластинки

Эксперименты по тканевым пластинкам были проведены для 12 пациенток.

При сравнении с контрольными образцами тканевых пластинок, также инкубированных в среде в течение 24 часов, в обработанных образцах наблюдается подавление гликолиза и ответа на гипоксию.

Ниже приведены рисунки, иллюстрирующие изменение экспрессии различных генов после проведения терапии непосредственно в нативной опухоли и в тканевых пластинках. Зеленым цветом отмечены гены, экспрессия которых понижалась, красным — повышалась.

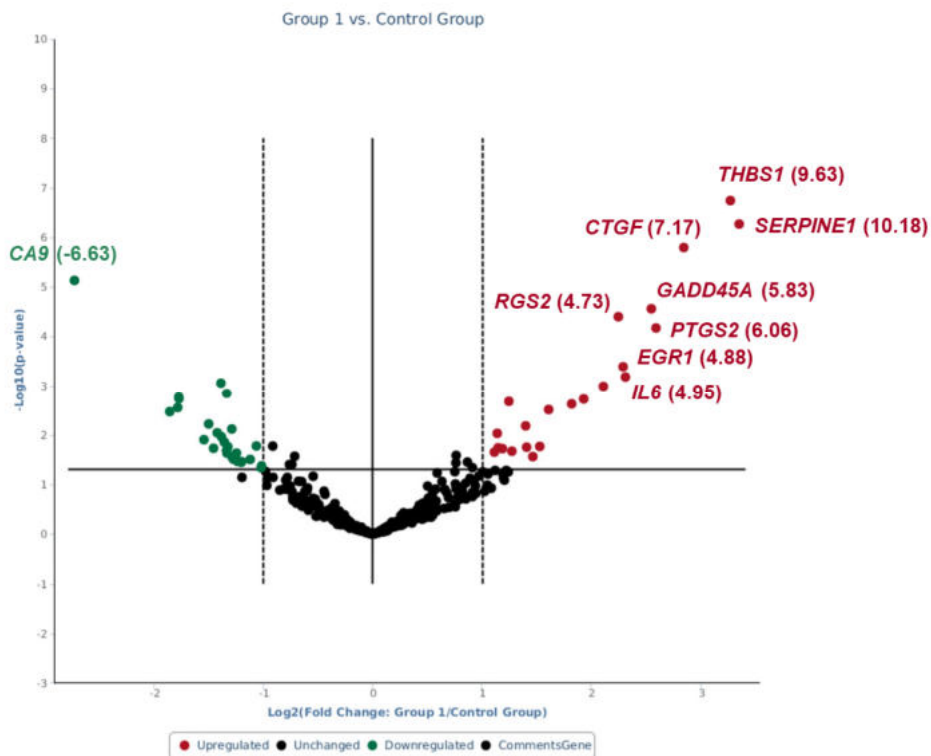


Рисунок 4. Сравнение экспрессии мРНК опухоль-ассоциированных генов в образцах тканей пациенток, которые подвергались неoadъювантной платиносодержащей терапии. Зеленые — это гены, экспрессия которых упала после НАПХТ, красные — выросла.

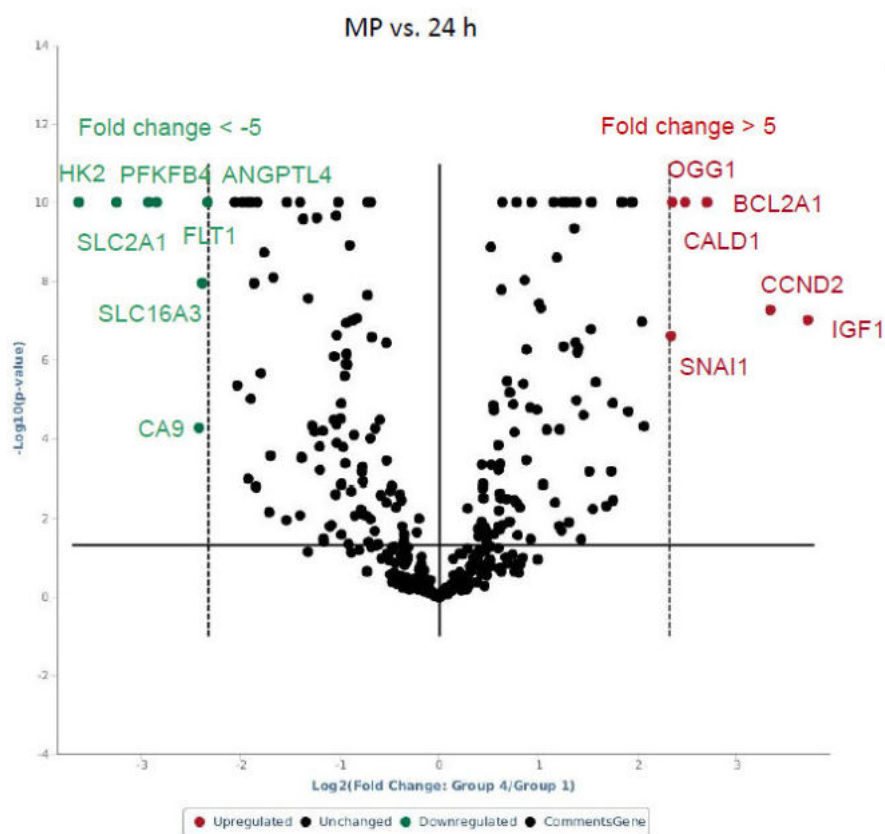


Рисунок 5. Сравнение экспрессии мРНК опухоль-ассоциированных генов в опухолевых пластинках по сравнению с контрольными (не подвергавшимися обработке химиопрепаратами пластинками).

При использовании комбинации митомycin Ц и цисплатин наиболее существенно снижалась экспрессия генов *HK2*, *PFKFB4* (ферменты гликолиза), транспортера глюкозы *GLUT1* (*SLC2A1*), *CA9* (карбоангидраза), проангиогенных факторов *FLT1* и *ANGPTL4* и транспортера *SLC16A3* (*MCT4* – ген, кодирующий мембранный белок, «выкачивающий» избыток лактата, образующегося при гликолизе).

Гексокиназа 2 (*HK2*) представляет собой фермент, основная функция которого – фосфорилирование глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата (G6P). Подобное превращение является первым этапом метаболизма глюкозы. Регулируется экспрессия гена *HK2* с помощью инсулина. Было показано, что *HK2* принимает непосредственное участие в увеличении скорости гликолиза, особенно в злокачественных новообразованиях [30].

Белок, кодируемый геном *PFKFB4*, является бифункциональной киназой/фосфатазой, функцией которой является регуляция концентрации побочного продукта гликолиза - фруктозо-2,6-бисфосфата (F2,6BP). Высокая экспрессия характерна для раковых клеток и индуцируется гипоксией. Также он способен увеличивать концентрацию АТФ в клетке в условиях гипоксии.

Глюкозный транспортер типа 1, *GLUT1 (SLC2A1)*, является однонаправленным белковым переносчиком, позволяющим глюкозе преодолевать гематоэнцефалический барьер. Замечено, что экспрессия этого гена может быть повышена при различных онкологических заболеваниях, например, раке груди, простаты, колоректальном раке [31-34].

Для опухолевых клеток характерно состояние ацидоза, а также получение энергии с помощью гликолиза (так называемый эффект Варбурга). Помимо использования переносчика лактата *SLC16A3*, клетка может избавляться от этого метаболита с помощью диффузии через щелевые контакты, образованные коннексинами соседних клеток [34]. Однако подобного рода механизм не является достаточно эффективным, поскольку приводит к накоплению кислот в клетках и межклеточном пространстве [36,37].

Карбоангидраза IX (*CA9*) относится к семейству белков карбоангидраз и представляет из себя трансмембранный гликопротеин, основная функция которого – катализ гидратации диоксида углерода. В опухоли гипоксия стимулирует гиперэкспрессию *CA9*. Гипоксия-индуцируемый фактор, HIF-1, связывается с промоторной зоной гена *CA9*, активируя транскрипцию данного гена [38].

3.3 Клинические случаи

Ос4

Пациентка С., 74 года, носительница патогенной мутации *BRCA2* с.6070C>T [p.Gln2024Ter].

Диагноз: рак яичников (серозная high grade карцинома). Получила 3 курса неoadьювантной химиотерапии по схеме МР (Митомицин Ц+Цисплатин). В дальнейшем, после оптимальной циторедуктивной операции получила три курса адьювантной химиотерапии по той же схеме. Гистологически был отмечен лечебный патоморфоз в виде полного регресса опухоли.

В результате эксперимента с тканевыми опухолевыми пластинками была продемонстрирована чувствительность к Цисплатину и Митомицину Ц по сравнению с фрагментами опухоли, которые не подвергались обработке химиопрепаратами.

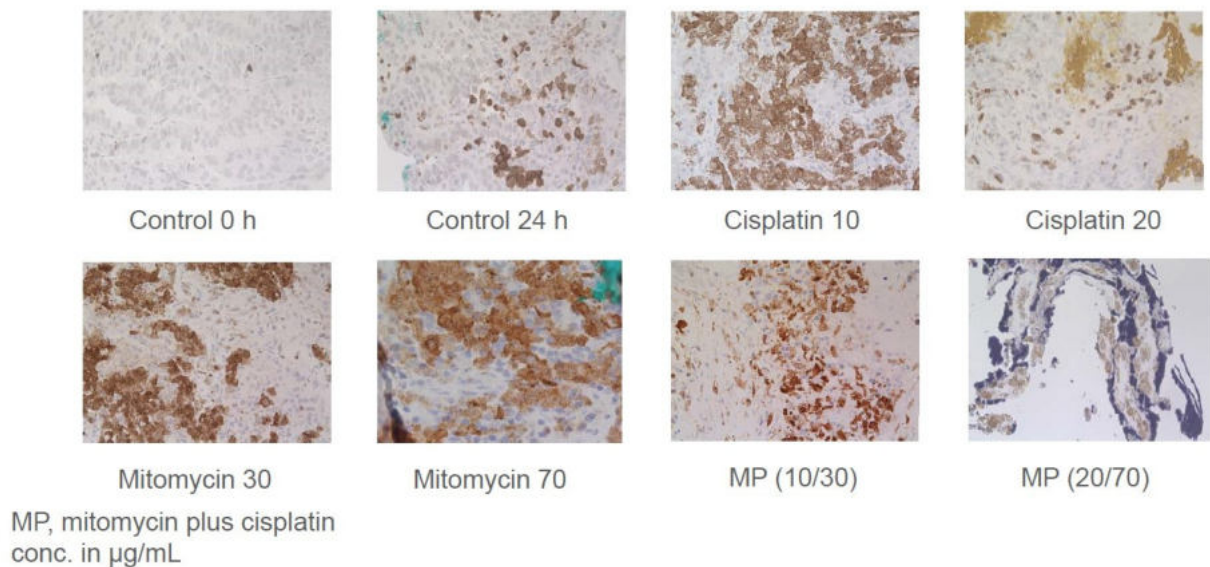


Рисунок 6. Иммуногистохимическая окраска на каспазу-3. Тканевые пластинки пациентки С.

Пациентка М, 54 года, носительница патогенной мутации *BRCA2* с.4525С>Т [p.Q1509X rs80358683].

Диагноз: рак яичников (серозная high grade карцинома). Состояние после диагностической лапароскопии, биопсии опухоли и трех курсов неoadъювантной химиотерапии по схеме Митомицин Ц+цисплатин. После проведенной терапии был отмечен полный патоморфологический регресс.

По фотографиям пластинок, приведенным ниже, можно сделать вывод о чувствительности опухоли не только к комбинации Митомицина Ц и Цисплатина, но и к каждому из компонентов по отдельности.

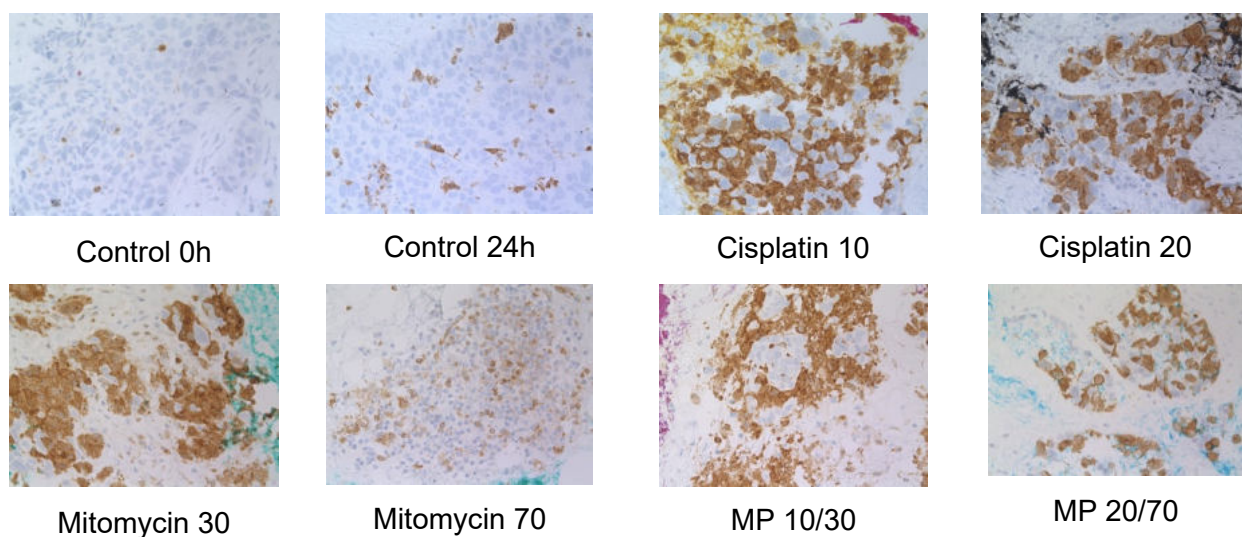


Рисунок 7. Иммуногистохимическая окраска на каспазу-3. Тканевые пластинки пациентки М.

Выводы

1. Из двух использованных методик наиболее достоверной является способ тканевых пластинок. МТТ-тест, несмотря на простоту использования и получения материала, не является точным.
2. Способ определения спектра химиочувствительности карцином яичника на основе тканевых пластинок может быть использован в клинической практике в качестве рутинного метода.
3. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что эффективность воздействия комбинации цисплатина и митомицина Ц (активного в условиях пониженного содержания кислорода в клетке) связана с ингибированием эффекта Варбурга. Возможно, это обусловлено снижением эффективности работы системы репарации в условиях гипоксии и ролью лактата в индуцировании ангиогенеза и формировании иммуносупрессорного комплекса.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи:

1. Gigolaeva L., Krivorotko P., Khadzhimatova S., Zhiltsova E., Yerechshenko S., Nikitina M., Ni V., Emelyanov A., Imyanitov E.N., Sokolenko A.P., Tabagua T. Neoadjuvant eribulin plus carboplatin vs. paclitaxel plus carboplatin in patients with triple-negative breast cancer (TNBC) // ESMO 2018 Congress. Munich, Germany, 19-23 October 2018. *Annals of Oncology*, 2018. Vol. 29 (Supplement 8), P. viii88.
2. Gorodnova, T., Sokolenko, A., Ni, V., Ivantsov, A., Kotiv, K., Petrik, S., & Imyanitov, E. (2019). BRCA1-associated and sporadic ovarian carcinomas: outcomes of primary cytoreductive surgery or neoadjuvant chemotherapy. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 29(4), 779-786.
3. Avanesyan A. A. et al. Gastric Cancer in BRCA1 Germline Mutation Carriers: Results of Endoscopic Screening and Molecular Analysis of Tumor Tissues // *Pathobiology*. – 2020. – Т. 87. – №. 6. – С. 367-374.

Тезисы конференций:

1. Бройде Р.В., Соколенко А.П., Ни В.И., Соколова Т.Н. Таргетный анализ генов репарации ДНК у больных раком яичника, продемонстрировавших выраженный ответ на платиносодержащую терапию // Форум «Белые ночи 2019». 20-23 июня, Санкт-Петербург. Тезисы, С. 349-250.
2. Gorodnova T., Kotiv K., Sokolenko A., Ivantsov A., Sokolova T., Stepanov I., Ni V., Aleksakhina S., Berlev I., Imyanitov E. Randomised neoadjuvant study comparing cisplatin-mitomycin vs. paclitaxel-carboplatin in patients with BRCA1/2-driven ovarian cancer // ESGO. 23-25 October 2021
3. Ни В.И., Баскина С.В., Космин А.В., Венина А.Р., Иванцов А.О. Таргетный анализ экспрессии мРНК в тканевых пластинках карцином яичника под влиянием обработки цисплатином и митомицином // Форум «Белые ночи 2021». 21-27 июня, Санкт-Петербург.

Список литературы

1. Moufarrij, Sara, Monica Dandapani, Elisa Arthofer, Stephanie Gomez, Aneil Srivastava, Micael Lopez-Acevedo, Alejandro Villagra, and Katherine B. Chiappinelli. "Epigenetic therapy for ovarian cancer: promise and progress." *Clinical epigenetics* 11, no. 1 (2019): 1-11.
2. Gorodnova, Tatyana, Anna Sokolenko, Valeria Ni, Alexandr Ivantsov, Khristina Kotiv, Sergey Petrik, Inna Amelina, Igor Berlev, and Evgeny Imyanitov. "BRCA1-associated and sporadic ovarian carcinomas: outcomes of primary cytoreductive surgery or neoadjuvant chemotherapy." *International Journal of Gynecologic Cancer* 29, no. 4 (2019).
3. Kim, Soochi, Youngjin Han, Se Ik Kim, Hee-Seung Kim, Seong Jin Kim, and Yong Sang Song. "Tumor evolution and chemoresistance in ovarian cancer." *NPJ precision oncology* 2, no. 1 (2018): 1-9.
4. Ghanghoria, Raksha, Prashant Kesharwani, and Narendra K. Jain. "Significance of various experimental models and assay techniques in cancer diagnosis." *Mini reviews in medicinal chemistry* 17, no. 18 (2017): 1713-1724.
5. Tentler, John J., Aik Choon Tan, Colin D. Weekes, Antonio Jimeno, Stephen Leong, Todd M. Pitts, John J. Arcaroli, Wells A. Messersmith, and S. Gail Eckhardt. "Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development." *Nature reviews Clinical oncology* 9, no. 6 (2012): 338-350.
6. Lawson, Devon A., Nirav R. Bhakta, Kai Kessenbrock, Karin D. Prummel, Ying Yu, Ken Takai, Alicia Zhou et al. "Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells." *Nature* 526, no. 7571 (2015): 131-135.
7. Xiao, Tengfei, Wei Li, Xiaoqing Wang, Han Xu, Jixin Yang, Qiu Wu, Ying Huang et al. "Estrogen-regulated feedback loop limits the efficacy of estrogen receptor–targeted breast cancer therapy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, no. 31 (2018): 7869-7878.
8. Topp, Monique D., Lynne Hartley, Michele Cook, Valerie Heong, Emma Boehm, Lauren McShane, Jan Pyman et al. "Molecular correlates of platinum response in human high-grade serous ovarian cancer patient-derived xenografts." *Molecular oncology* 8, no. 3 (2014): 656-668.
9. Nunes, Manoel, Patricia Vrignaud, Sophie Vacher, Sophie Richon, Astrid Lievre, Wulfran Cacheux, Louis-Bastien Weiswald et al. "Evaluating patient-derived colorectal cancer xenografts as preclinical models by comparison with patient clinical data." *Cancer research* 75, no. 8 (2015): 1560-1566.
10. George, Erin, Hyoung Kim, Clemens Krepler, Brandon Wenz, Mehran Makvandi, Janos L. Tanyi, Eric Brown et al. "A patient-derived-xenograft platform to study BRCA-deficient ovarian cancers." *Jci Insight* 2, no. 1 (2017).

11. Hidalgo, Manuel, Elizabeth Bruckheimer, N. V. Rajeshkumar, Ignacio Garrido-Laguna, Elizabeth De Oliveira, Belen Rubio-Viqueira, Steven Strawn, Michael J. Wick, James Martell, and David Sidransky. "A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer." *Molecular cancer therapeutics* 10, no. 8 (2011): 1311-1316.
12. Huang, Shaohui, Ahmed A. Heikal, and Watt W. Webb. "Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD (P) H and flavoprotein." *Biophysical journal* 82, no. 5 (2002): 2811-2825.
13. Lukina, M. M., M. V. Shirmanova, T. F. Sergeeva, and E. V. Zagaynova. "Metabolic imaging in the study of oncological processes." *Современные технологии в медицине* 8, no. 4 (eng) (2016).
14. Lukina, Maria M., Varvara V. Dudenkova, Lyubov'E. Shimolina, Ludmila B. Snopova, Elena V. Zagaynova, and Marina V. Shirmanova. "In vivo metabolic and SHG imaging for monitoring of tumor response to chemotherapy." *Cytometry Part A* 95, no. 1 (2019): 47-55.
15. Алпеева, Елена Викторовна, Анастасия Феликсовна Сидоренкова, and Екатерина Андреевна Воротеяк. "Экспериментальные клеточные системы: от органов в чашке Петри до "органов-на-чипах".*" Вестник Московского университета. Серия 16. Биология* 4 (2017).
16. Valente, Karolina P., Sultan Khetani, Ahmad R. Kolahchi, Amir Sanati-Nezhad, Afzal Suleman, and Mohsen Akbari. "Microfluidic technologies for anticancer drug studies." *Drug discovery today* 22, no. 11 (2017): 1654-1670.
17. Shim, Sangjo, Maura C. Belanger, Alexandra R. Harris, Jennifer M. Munson, and Rebecca R. Pompano. "Two-way communication between ex vivo tissues on a microfluidic chip: application to tumor-lymph node interaction." *Lab on a Chip* 19, no. 6 (2019): 1013-1026.
18. Nagaraj, A. B., Q. Q. Wang, P. Joseph, C. Zheng, Y. Chen, O. Kovalenko, S. Singh et al. "Using a novel computational drug-repositioning approach (DrugPredict) to rapidly identify potent drug candidates for cancer treatment." *Oncogene* 37, no. 3 (2018): 403-414.
19. Naipal, Kishan AT, Nicole S. Verkaik, Humberto Sánchez, Carolien HM van Deurzen, Michael A. den Bakker, Jan HJ Hoeijmakers, Roland Kanaar, Maaïke PG Vreeswijk, Agnes Jager, and Dik C. van Gent. "Tumor slice culture system to assess drug response of primary breast cancer." *BMC cancer* 16, no. 1 (2016): 1-13.
20. De Hoogt, Ronald, Marta F. Estrada, Suzana Vidic, Emma J. Davies, Annika Osswald, Michael Barbier, Vitor E. Santo et al. "Protocols and characterization data for 2D, 3D, and slice-based tumor models from the PREDECT project." *Scientific data* 4, no. 1 (2017): 1-23.
21. Koerfer, Justus, Sonja Kallendrusch, Felicitas Merz, Christian Wittekind, Christoph Kubick, Woubet T. Kassahun, Guido Schumacher et al. "Organotypic slice cultures of human gastric and esophagogastric junction cancer." *Cancer medicine* 5, no. 7 (2016): 1444-1453.

22. Gaona-Luviano, Patricia, Lourdes Adriana Medina-Gaona, and Kassandra Magaña-Pérez. "Epidemiology of ovarian cancer." *Chin Clin Oncol* 9, no. 4 (2020): 47.
23. Holmes, David. "Ovarian cancer: beyond resistance." *Nature* 527, no. 7579 (2015): S217-S217.
24. Интернет ресурс (<https://www.genome.jp> 2009)
25. Tyulyandina, Alexandra, Tatiana Kekeeva, Vera Gorbunova, Larisa Kolomiets, Galina Statsenko, Valeria Saevets, Svetlana Victorovna Khokhlova et al. "Non-interventional study OVATAR final report: Diagnostic and treatment approaches in Russian ovarian cancer population—BRCAm group analysis." (2019): e13111-e13111.
26. Lee, Jung-Min, Lori Minasian, and Elise C. Kohn. "New strategies in ovarian cancer treatment." *Cancer* 125 (2019): 4623-4629.
27. Li, Christopher I., Janet R. Daling, and Kathleen E. Malone. "Incidence of invasive breast cancer by hormone receptor status from 1992 to 1998." *Journal of Clinical Oncology* 21, no. 1 (2003): 28-34.
28. Blandino, Giovanni, Arnold J. Levine, and Moshe Oren. "Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy." *Oncogene* 18, no. 2 (1999): 477-485.
29. Vikhanskaya, Faina, Ming Kei Lee, Marco Mazzeletti, Massimo Broggin, and Kanaga Sabapathy. "Cancer-derived p53 mutants suppress p53-target gene expression—potential mechanism for gain of function of mutant p53." *Nucleic acids research* 35, no. 6 (2007): 2093-2104.
30. Lee, Jung-Min, Lori Minasian, and Elise C. Kohn. "New strategies in ovarian cancer treatment." *Cancer* 125 (2019): 4623-4629.
31. Lambert, D. W., I. S. Wood, A. Ellis, and S. P. Shirazi-Beechey. "Molecular changes in the expression of human colonic nutrient transporters during the transition from normality to malignancy." *British journal of cancer* 86, no. 8 (2002): 1262-1269.
32. Pinheiro, Céline, Adhemar Longatto-Filho, Cristovam Scapulatempo, Luísa Ferreira, Sandra Martins, Luc Pellerin, Mesquita Rodrigues, Venancio AF Alves, Fernando Schmitt, and Fátima Baltazar. "Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas." *Virchows Archiv* 452, no. 2 (2008): 139-146.
33. Pinheiro, Céline, André Albergaria, Joana Paredes, Bárbara Sousa, Rozany Dufloth, Daniella Vieira, Fernando Schmitt, and Fátima Baltazar. "Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma." *Histopathology* 56, no. 7 (2010): 860-867.
34. Hao, J., H. Chen, M. C. Madigan, P. J. Cozzi, Julia Beretov, W. Xiao, W. J. Delprado, P. J. Russell, and Yong Li. "Co-expression of CD147 (EMMPRIN), CD44v3-10, MDR1 and

monocarboxylate transporters is associated with prostate cancer drug resistance and progression." *British journal of cancer* 103, no. 7 (2010): 1008-1018.

35. Dovmark, Tobias H., Mara Saccomano, Alzbeta Hulikova, Frauke Alves, and Pawel Swietach. "Connexin-43 channels are a pathway for discharging lactate from glycolytic pancreatic ductal adenocarcinoma cells." *Oncogene* 36, no. 32 (2017): 4538-4550.

36. Swietach, Pawel, Richard D. Vaughan-Jones, Adrian L. Harris, and Alzbeta Hulikova. "The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369, no. 1638 (2014): 20130099.

37. Swietach, Pawel. "What is pH regulation, and why do cancer cells need it?." *Cancer and Metastasis Reviews* 38, no. 1 (2019): 5-15.

38. Becker, Holger M. "Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer." *British journal of cancer* 122, no. 2 (2020): 157-167.