

ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ

Российская научно-практическая конференция,
посвященная 40-летию НИИ онкологии Томского НИМЦ

Сборник материалов секции молодых ученых

22–24 мая 2019 г.

ИЗДАТЕЛЬСТВО ТОМСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

2019

УДК: 616-006

Фундаментальная и клиническая онкология: достижения и перспективы развития: российская научно-практическая конференция, посвященная 40-летию НИИ онкологии Томского НИМЦ. 22–24 мая 2019 г.: сборник материалов секции молодых ученых / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Н.В. Чердынцевой, В.И. Чернова. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2019. – 267 с.

ISBN 978-5-7511-2591-2

Сборник содержит материалы секции молодых ученых конференции «Фундаментальная и клиническая онкология: достижения и перспективы развития», посвященной 40-летию НИИ онкологии Томского НИМЦ, и отражает основные достижения исследований молодых специалистов разных уровней – от студентов, практических врачей до докторов наук. В сборнике представлены научные статьи по направлениям онкология, химиотерапия, радиология, молекулярная биология, генетика, а также смежным специальностям. Сборник материалов Конгресса молодых ученых предназначен для ученых в области как фундаментальной, так и клинической онкологии.

УДК: 616-006

Рецензенты:

проф. И.В. Кондакова, д.б.н. Н.В. Литвяков, проф. Л.А. Коломиец,
проф. Е.М. Слонимская, проф. С.Г. Афанасьев, проф. И.Г. Фролова,
проф. РАН Ж.А. Старцева

ISBN 978-5-7511-2591-2

© Научно-исследовательский институт онкологии,
Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук, 2019

(рис. 2). У животных, которым вводили немодифицированные человеческие Т-лимфоциты, происходила регрессия опухоли на 20-е сут после инъекции, но спустя месяц у них появились новые очаги опухолевого роста, и к концу эксперимента все животные из этой группы имели высокую опухолевую нагрузку.

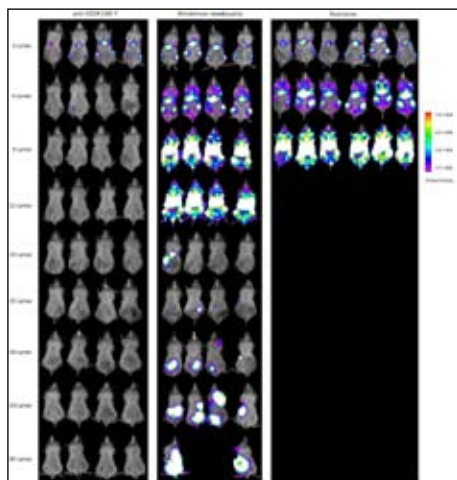


Рис. 2. Результаты биOLUMИнесцентной *in vivo* визуализации опухолевых клеток Raji-luc-cl.9 у мышей экспериментальной и контрольных групп. Слева указано время, прошедшее после введения животным анти-CD19 CAR-T или немодифицированных лимфоцитов. Шкала демонстрирует соответствие интенсивности биOLUMИнесценции, выраженной в фотонах/сек на мм², псевдоцветам на изображении

Выводы. Данная экспериментальная модель позволяет успешно проводить доклиническую оценку фармакодинамики анти-CD19 CAR-T методом прижизненной биOLUMИнесцентной визуализации опухолей и может в дальнейшем использоваться для доклинических исследований новых вариантов терапии В-клеточных неходжкинских лимфом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts D., Goyal S., Chang Z., Flowers C.R., Lechowicz M.J., Langston A., Koff J.L. Evaluation of All Cause of Death after High Dose Chemotherapy and Autologous Stem Cell Transplant in Hodgkin Lymphoma and Non-Hodgkin Lymphoma. *Blood*. 2018; 132: 2157.
2. Runckel K., Barth M.J., Mavis C., Gu J.J., Hernandez-Ilizaliturri F.J. The SMAC mimetic LCL-161 displays antitumor activity in preclinical models of rituximab-resistant B-cell lymphoma. *Blood Adv*. 2018; 2(23): 3516–3525.
3. Rossi E.A., Goldenberg D.M., Cardillo T.M., Stein R., Chang C.H. CD20-targeted tetrameric interferon-alpha, a novel and potent immunocytokine for the therapy of B-cell lymphomas. *Blood*. 2009; 114(18): 3864–71.

НОКДАУН ГЕНА RAD50 СЕНСИБИЛИЗИРУЕТ РАКОВЫЕ КЛЕТКИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ТРИЖДЫ-НЕГАТИВНОГО ПОДТИПА К КАРБОПЛАТИНУ

К. Гавриш, А. Нургалиева, Л. Минигулова, Д. Савенкова, В. Скрипова, Р. Киямова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия

Аннотация

Высокоагрессивный рак молочной железы трижды-негативного молекулярного подтипа (ТНРМЖ) не имеет направленного (таргетного) лечения. Современные схемы терапии ТНРМЖ не всегда эффективны, что может быть следствием генетической гетерогенности опухолей пациентов. Таким образом, актуальными являются исследования, направленные на выявление генов, участвующих в регуляции чувствительности раковых клеток к применяемым в клинической практике химиопрепаратам, включая карбоплатин. **Цель исследования** – оценить влияние экспрессии гена RAD50 на чувствительность клеток ТНРМЖ к карбоплатину. В исследовании использовали клеточные линии ТНРМЖ, не имеющие мутаций генов BRCA1/2 (MDA-MB-231, MDA-MB-436_wtBRCA1 и MDA-MB-453). Нокдаун гена RAD50 проводили путём РНК-интерференции, для оценки влияния нокдауна гена RAD50 на чувствительность клеток к карбоплатину использовали тест на жизнеспособность. В результате исследования было выявлено, что нокдаун гена RAD50 в клетках ТНРМЖ человека увеличивает их чувствительность к об-

работке карбоплатином: IC50 в клеточных линиях с нокадаун гена RAD50 на 15,8–27,8 % ниже, чем в клеточных линиях без нокадауна. Таким образом, нокадаун гена RAD50 способствует сенсбилизации клеток ТНРМЖ, не несущих мутаций BRCA1/2, к карбоплатину, а RAD50 является потенциальным предиктивным маркером ТНРМЖ.

Ключевые слова: ТНРМЖ, RAD50, предиктивный маркер, карбоплатин, РНК-интерференция.

KNOCKDOWN OF THE RAD50 GENE SENSITIZES TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER CELLS TO CARBOPLATIN

**K. Havrysh, A. Nurgalieva, L. Minigulova,
D. Savenkova, V. Skripova, R. Kiyamova**

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Abstract

The most aggressive triple-negative molecular subtype of breast cancer (TNBC) doesn't have target treatment. Modern schemes of TNBC treatment are inefficient for a large group of patients, which could be attributed to the genetic heterogeneity of tumors. Thus, studies focused on the identification of genes involved in the regulation of cancer cells susceptibility to clinically used chemotherapeutics, including carboplatin, are relevant. The **Aim** of this study was to evaluate the RAD50 gene expression impact on the TNBC cells sensitivity to carboplatin. TNBC cell lines without mutations of BRCA1/2 genes (MDA-MB-231, MDA-MB-436_wtBRCA1 and MDA-MB-453) were used in this study; the knockdown of RAD50 gene was performed by RNA interference; cell viability test was used to evaluate the impact of the RAD50 gene silencing on cells sensitivity to carboplatin. As a result of the study, it was found that knockdown of the RAD50 gene in the TNBC cells could significantly increase their sensitivity to carboplatin: in the cell lines with RAD50 gene knockdown IC50 was 15.827.8 % lower than in cell lines without knockdown. Thus, the RAD50 gene silencing promotes the sensitization of TNBC cells without BRCA1/2 mutations to carboplatin and RAD50 could be considered as a potential predictive marker for TNBC.

Key words: TN breast cancer, RAD50, predictive marker, carboplatin.

Актуальность. ТНРМЖ является наиболее агрессивным молекулярным подтипом РМЖ [1], который только в 2018 г. был диагностирован более чем у 250 тысяч женщин (примерно 12 % от всех случаев РМЖ) во всем мире [2]. Пациенты с ТНРМЖ имеют более высокий риск возникновения рецидивов и плохой прогноз исхода заболевания, который обусловлен, в том числе отсутствием специфичных и валидированных мишеней для направленной (таргетной) терапии этого подтипа опухолей [1]. С ТНРМЖ ассоциированы мутации генов BRCA1/2, предсказывающие высокую чувствительность раковых клеток к ДНК-повреждающей химиотерапии (например, цисплатином, карбоплатином и т. д.) и терапии ингибиторами PARP. Однако BRCA1/2 мутации не являются частым событием, они встречаются только в 10 % случаев ТНРМЖ [3, 4]. За последние 5 лет многие клинические исследования были посвящены разработке новых схем лечения ТНРМЖ уже известными химиотерапевтическими препаратами и их комбинациями [5–11]. Многие из них включали карбоплатин в качестве основной мишени/одной из мишеней для изучения. Например, было выявлено, что введение карбоплатина в схему неoadъювантной химиотерапии ТНРМЖ увеличивает патологический полный ответ (pathological complete response – pCR) пациентов, получавших карбоплатин по сравнению с контрольной группой [7–11]. В клинических испытаниях показано, что пациенты ТНРМЖ по-разному реагируют на адъювантную химиотерапию карбоплатином [10–11], что может быть результатом исходной генетической гетерогенности опухолей пациентов. В наших предыдущих исследованиях RAD50, участвующий в репарации двухцепочечных разрывов ДНК, был идентифицирован как опухоль-ассоциированный антиген и потенциальный маркер РМЖ [12–14]. Было показано, что RAD50 имеет гетерогенную экспрессию в опухолях РМЖ [15].

Цель исследования – оценить влияние экспрессии гена RAD50 на чувствительность клеток ТНРМЖ к карбоплатину.

Материал и методы. Клетки ТНРМЖ, а именно MDA-MB-231, MDA-MB—453, были получены из Американской коллекции типичных культур клеток (ATCC). Модифицированные клетки MDA-MB-436, экспрессирующие дикий тип гена BRCA1 (MDA-MB-436_wtBRCA1),

были любезно предоставлены лабораторией И. Асцатурова (Центр Рака Фокс Чейз, США). Все клеточные культуры ТНPMЖ культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, L-глутамин и пенициллин/стрептомицин (ПанЭко, Россия). Нокдаун гена RAD50 проводили путём обратной трансфекции клеток специфичными для этого гена малыми интерферирующими РНК (Invitrogen™, США) с использованием трансфецирующего реагента RNAiMAX (Invitrogen™, США) [16]. В качестве негативного контроля миРНК использовали Control siRNA-A (Santa Cruz Biotechnology, USA). Валидацию эффективности трансфекции проводили в 24-луночных планшетах. Влияние нокдауна гена RAD50 на восприимчивость клеток к обработке карбоплатином проводили в 96-луночных планшетах с помощью теста на жизнеспособность (AlamarBlue™, Invitrogen™, США) по стандартному протоколу [17]. Эффективность нокдауна гена оценивали при помощи мультиплексного ПЦР в режиме реального времени с использованием наборов TaqMan Gene Expression Assay (Invitrogen™, США) для гена RAD50 и референсного гена АСТВ [18]. Расчеты относительной экспрессии проводили по формуле: [19]. Кривые жизнеспособности сравнивали при помощи U-критерия Манна – Уитни. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7.

Результаты и обсуждение. Нокдаун гена RAD50 путём РНК-интерференции был проведён в клеточных линиях трижды-негативного рака молочной железы (MDA-MB-231, MDA-MB-436_wtBRCA1 и MDA-MB-453) с генами BRCA1/2 дикого типа. Для нокдауна гена RAD50 на клеточной линии MDA-MB-231 были протестированы комбинации трёх миРНК, специфичных для гена RAD50. В результате была отобрана комбинация миРНК, наиболее эффективно вызывающая молчание гена RAD50 (69,3 %) (таблица).

Таблица

Эффективность нокдауна гена RAD50 различными комбинациями миРНК

Комбинация миРНК	Относительная экспрессия гена RAD50 ($\times 1000$)	Эффективность нокдауна гена RAD50
Silencer™Select siRNA s791+s792	2,1324	69,3 %
Silencer™Select siRNA s791+s793	4,0534	41,6 %
Silencer™Select siRNA s792+s793	3,4841	49,8 %
Негативный контроль	6,9441	0 %

Затем для всех клеточных линий ТНPMЖ с нокдауном и без нокдауна гена RAD50 был проведён анализ цитотоксической чувствительности клеток к обработке карбоплатином (3 биологических повтора). В результате IC₅₀ карбоплатина для клеточной линии MDA-MB-231 с нокдауном гена RAD50 составила 20,65 мкМ, что на 17,2 % больше, чем без нокдауна, – 24,93 мкМ (р-значение = 0,009); IC₅₀ для клеточной линии MDA-MB-436 с нокдауном гена RAD50 составила 7,497 мкМ, что на 27,8 % больше, чем без нокдауна, – 10,39 мкМ (р-значение = 0,01); IC₅₀ для клеточной линии MDA-MB-453 с нокдауном гена RAD50 составила 7,336 мкМ, что на 15,8 % больше, чем без нокдауна, – 8,711 мкМ (р-значение = 0,002) (рис. 1).

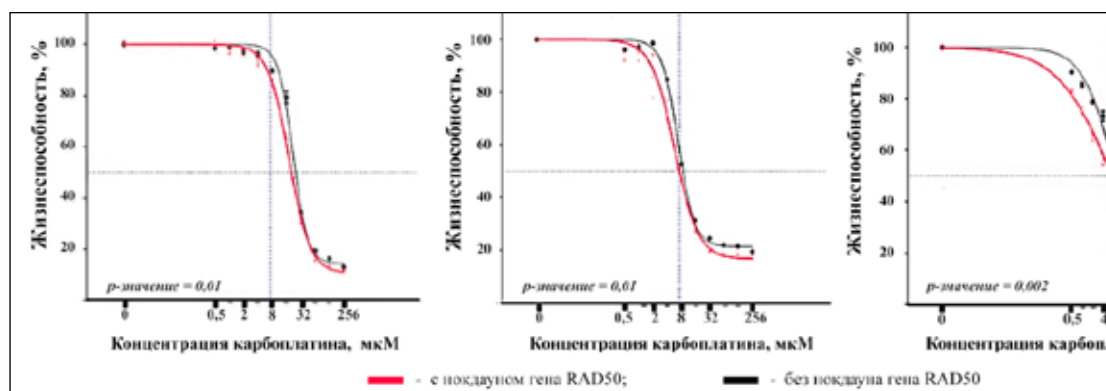


Рис. 1. Кривые жизнеспособности клеток ТНPMЖ с нокдауном и без нокдауна гена RAD50, зависящие от дозы карбоплатина (0,5–256 мкМ)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что нокдаун гена RAD50 способствует сенсibilизации клеток ТНPMЖ, не несущих мутаций BRCA1/2, к обработке карбоплатином.

Таким образом, RAD50 является потенциальным предиктивным маркером эффективности терапии ТНРМЖ карбоплатином и мишенью для разработки новых противоопухолевых препаратов для лечения ТНРМЖ, в том числе в комбинации с карбоплатином. В дальнейшем предполагается валидация полученных нами результатов с использованием опухолевого материала больных ТНРМЖ и моделей ксенографтов.

Работа выполнена за счёт средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров

ЛИТЕРАТУРА

1. Anders C., Carey L.A. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2008 Oct; 22(11): 1233–9; discussion 1239–40, 1243.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov; 68(6): 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
3. Peshkin B.N., Alabek M.L., Isaacs C. BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. *Breast Dis*. 2010; 32(12): 25–33. doi: 10.3233/BD-2010-0306.
4. Guney Eskiler G., Cecener G., Egeci U., Tunca B. Triple negative breast cancer: new therapeutic approaches and BRCA status. *APMIS*. 2018 May; 126(5): 371–379. doi: 10.1111/apm.12836.
5. Loibl S., Weber K.E., Timms K.M., Elkin E.P., Hahnen E., Fasching P.A., Lederer B., Denkert C., Schneeweiss A., Braun S., Salat C.T., Rezaei M., Blohmer J.U., Zahm D.M., Jackisch C., Gerber B., Klare P., Kümmel S., Schem C., Paepke S., Schmutzler R., Rhiem K., Penn S., Reid J., Nekljudova V., Hartman A.R., von Minckwitz G., Untch M. Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response-final results from GeparSixto. *Ann Oncol*. 2018 Dec 1; 29(12): 2341–2347. doi: 10.1093/annonc/mdy460.
6. Sharma P., López-Tarruella S., García-Saenz J.A., Khan Q.J., Gómez H.L., Prat A., Moreno F., Jerez-Gilarranz Y., Barnadas A., Picornell A.C., Monte-Millán M.D., González-Rivera M., Massarrah T., Pelaez-Lorenzo B., Palomero M., González Del Val R., Cortés J., Fuentes-Rivera H., Morales D.B., Márquez-Rodas I., Perou C.M., Lehn C., Wang Y.Y., Klemp J.R., Mammen J.V., Wagner J.L., Amin A.L., O’Dea A.P., Heldstab J., Jensen R.A., Kimler B.F., Godwin A.K., Martin M. Pathological Response and Survival in Triple-Negative Breast Cancer Following Neoadjuvant Carboplatin plus Docetaxel. *Clin Cancer Res*. 2018 Dec 1; 24(23): 5820–5829. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0585.
7. Schneeweiss A., Möbus V., Tesch H., Hanusch C., Denkert C., Lübke K., Huober J., Klare P., Kümmel S., Untch M., Kast K., Jackisch C., Thomalla J., Ingold-Heppner B., Blohmer J.U., Rezaei M., Frank M., Engels K., Rhiem K., Fasching P.A., Nekljudova V., von Minckwitz G., Loibl S. Intense dose-dense epirubicin, paclitaxel, cyclophosphamide versus weekly paclitaxel, liposomal doxorubicin (plus carboplatin in triple-negative breast cancer) for neoadjuvant treatment of high-risk early breast cancer (GeparOcto-GBG 84): A randomised phase III trial. *Eur J Cancer*. 2019 Jan; 106: 181–192. doi: 10.1016/j.ejca.2018.10.015.
8. Castrellon A.B., Pidhorecky L., Valero V., Raza L.E. The Role of Carboplatin in the Neoadjuvant Chemotherapy Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Oncol Rev*. 2017 Mar 17; 11(1): 324. doi: 10.4081/oncol.2017.324.
9. Zhang P., Yin Y., Mo H., Zhang B., Wang X., Li Q., Yuan P., Wang J., Zheng S., Cai R., Ma F., Fan Y., Xu B. Better pathologic complete response and relapse-free survival after carboplatin plus paclitaxel compared with epirubicin plus paclitaxel as neoadjuvant chemotherapy for locally advanced triple-negative breast cancer: a randomized phase 2 trial. *Oncotarget*. 2016 Sep 13; 7(37): 60647–60656. doi: 10.18632/oncotarget.10607.
10. Vetter M., Fokas S., Biskup E., Schmid T., Schwab F., Schoetzau A., Güth U., Rochlitz C., Zanetti-Dällenbach R. Efficacy of adjuvant chemotherapy with carboplatin for early triple negative breast cancer: a single center experience. *Oncotarget*. 2017 May 23; 8(43): 75617–75626. doi: 10.18632/oncotarget.18118.
11. Formenti S.C., Golden E.B., Goldberg J.D., Li X., Taff J., Fenton-Kerimian M.B., Chandrasekhar S., Demaria S., Novik Y. Results of a phase I-II study of adjuvant concurrent carboplatin and accelerated radiotherapy for triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Dec 27; 6(3): e1274479. doi: 10.1080/2162402X.2016.1274479.
12. Kostianets O., Antoniuk S., Filonenko V., Kiyamova R. Immunohistochemical analysis of medullary breast carcinoma autoantigens in different histological types of breast carcinomas. *Diagn Pathol*. 2012 Nov 26; 7: 161. doi: 10.1186/1746-1596-7-161.
13. Kostianets O., Shyyan M., Antoniuk S.V., Filonenko V., Kiyamova R. Panel of SEREX-defined antigens for breast cancer autoantibodies profile detection. *Biomarkers*. 2017 Mar; 22(2): 149–156. doi: 10.1080/1354750X.2016.1252952.
14. Havrysh K.V., Filonenko V.V., Serebriiskii I.G., Kiyamova R.G. Evaluation of RAD50 as a prognostic marker of survival in breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2016; 27(sup 6): 107P. doi: 10.1093/annonc/mdw363.55.
15. Шиян М.А., Костянец О.И., Цуварев О.Ю., Столярук А.В., Антонюк С.В., Филоненко В.В., Киямова Р.Г. Особливості експресії генів пухлинноасоційованих антигенів медулярної карциноми молочної залози у різних типах пухлин молочної залози. *Biopolym. Cell*. 2012; 28(5): 381–388.
16. Zhao M., Yang H., Jiang X., Zhou W., Zhu B., Zeng Y., Yao K., Ren C. Lipofectamine RNAiMAX: an efficient siRNA transfection reagent in human embryonic stem cells. *Mol Biotechnol*. 2008 Sep; 40(1): 19–26. doi: 10.1007/s12033-008-9043-x.
17. Bonnier F., Keating M.E., Wróbel T.P., Majzner K., Baranska M., Garcia-Munoz A., Blanco A., Byrne H.J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol In Vitro*. 2015 Feb; 29(1): 124–31. doi: 10.1016/j.tiv.2014.09.014.
18. Galatola M., Auricchio R., Greco L. Gene Expression Profiling of Celiac Biopsies and Peripheral Blood Monocytes Using Taqman Assays. *Methods Mol Biol*. 2015; 1326: 105–15. doi: 10.1007/978-1-4939-2839-2_11.
19. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 2008; 3(6): 1101–1108.