

Юрченко Ксения Андреевна

**ИНГИБИТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ТИОФОСФАТНОГО АНТИСМЫСЛОВОГО
ОЛИГОНУКЛЕОТИДА ПРОТИВ МАТРИЧНОЙ РНК ГЕНА
ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЕЛАНОМЫ МЫШЕЙ**

3.3.3. Патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискании ученой степени
кандидата медицинских наук

Симферополь – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель:

Оберемок Владимир Владимирович, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Рукша Татьяна Геннадьевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии им. проф. В.В. Иванова федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Бойчук Сергей Васильевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей патологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2026 года в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.2.318.01 Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института имени С. И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», по адресу: 295051, Симферополь, бульвар Ленина, 5/7.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института имени С. И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», по адресу: 295051, Симферополь, бульвар Ленина, 5/7 и на сайте <http://cfuv.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Е. Ю. Зяблицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень её разработанности

Меланома кожи (МК) представляет собой злокачественную опухоль, возникающую в результате неопластической трансформации меланобластов, меланоцитов и невусных клеток, являясь первым локальным проявлением общего неопластического заболевания всей меланоцитарной системы организма человека [Ахматова А.М. и др., 2011]. Меланома кожи относится к числу высокоагрессивных злокачественных опухолей. В структуре общей онкологической заболеваемости в России МК составляет 2 %. Несмотря на то, что данная патология составляет лишь 12% среди злокачественных новообразований кожи, 65 % всех случаев смерти, вызванных онкологическими заболеваниями кожи, приходится на ее долю.

Основные прорывы лечения меланомы кожи связаны с детальным изучением её патофизиологии на генетическом и молекулярном уровне. На сегодняшний день хорошо охарактеризованы ключевые гены, участвующие в процессе формирования и прогрессии меланомы, такие как: BRAF, NRAS, KIT, NF1 [Teixido S. et al., 2021]. Причем разработка и использование современных препаратов для лечения меланомы (ниволумаб, пембролизумаб, ипилимумаб и др.), механизм действия которых направлен на торможение процесса диссеминации клеток, сталкивается с проблемой высокой токсичности препаратов и негативного влияния на другие системы организма. Это требует проведения дальнейших исследований, направленных на поиск новых мишеней и разработку более эффективных и менее токсичных таргетных препаратов.

Основные препараты, которые сейчас используются для лечения меланомы, ниволумаб, пембролизумаб, ипилимумаб, направлены на остановку процесса диссеминации клеток, но у подобных препаратов негативный эффект заключается в том, что негативно влияют на другие системы организма, что в свою очередь требует поиска новых таргетных препаратов.

Одним из метаболических путей, которые играют важную роль в развитии злокачественных новообразований является пентозофосфатный путь (ПФП). Ключевой фермент этого пути *Г6ФД* катализирует первый шаг ПФП, который продуцирует NADPH [Jin L. et al., 2019]. Установлено, что ПФП играет важную роль и в развитии меланомы. NADPH нужен клеткам для восстановления ДНК и активации противоокислительных систем путем участия в регуляции редокс-состояния и детоксикации ROS, а также синтеза липидов и нуклеотидов, что необходимо для поддержания потребности активно растущих клеток [Xiao W. et al., 2018]. Опухолевым клеткам часто требуется высокий уровень NADPH для борьбы с повышенным уровнем ROS, поддержания антикатаболических процессов и синтеза биомассы опухоли. Некоторые опухоли демонстрируют “редоксовые уязвимости”: при пониженном NADPH они хуже справляются с ROS, чем нормальные клетки [Brandl N. et al., 2025]. NADPH является критически важным кофактором для ферментов, участвующих в антиоксидантной защите клетки. В условиях повышенного образования свободных радикалов в опухолевых клетках меланомы,

NADPH используется для нейтрализации этих вредных молекул, защищая клетку от повреждений [Ju H. Q. et al., 2020].

Установлено, что ПФП играет важную роль в развитии меланомы, поскольку в опухолевых клетках он обеспечивает производство NADPH, необходимого для защиты от оксидативного стресса, и рибозо-5-фосфата, который служит предшественником для биосинтеза нуклеиновых кислот и аминокислот, что поддерживает быстрый рост опухоли [Aurora A. B. et al., 2022]. Повышенная активность ПФП у опухолевых клеток, включая меланому, необходима для компенсации окислительного стресса и обеспечения строительными блоками их метаболизма [Huang C. et al., 2021].

Как и другие злокачественные клетки, клетки меланомы демонстрируют повышенную активность ПФП. Этот путь становится более активным для поддержания метаболических потребностей опухоли, особенно в условиях быстрого роста и повышенного стресса [Tan I. J. et al., 2024].

Таким образом, ПФП является центральным метаболическим путем для поддержания жизнеспособности и роста клеток меланомы, обеспечивая их необходимой энергией, защитой от окислительного повреждения и строительными блоками для синтеза биомолекул.

Меланома характеризуется высоким уровнем ROS и зависимостями от NADPH для защиты от окислительного стресса. Ингибирование *Г6ФД* может снизить NADPH, усилив оксидативный стресс, и снизить способность клеток ремонтировать ДНК, синтезировать липиды и нуклеотиды, привести к гибели опухолевых клеток через апоптоз и активацию клеточной смерти. Таким образом, в условиях повышенного ROS ингибирование *Г6ФД* может усилить клеточный стресс и увеличить вероятность гибели опухолевых клеток [Hayes John D. et al., 2020]. Ингибиторы *Г6ФД* могут снижать рост опухолей меланомы в культурах клеток и в мышинных моделях. Существуют данные о том, что снижение NADPH через *Г6ФД* делает клетки меланомы более уязвимыми к дополнительному оксидативному стрессу (например, ROS-генерирующие агенты, радиация, некоторые химиотерапевтики). В настоящий момент исследования по ингибированию *Г6ФД* в меланоме ограничены и поиск ингибиторов *Г6ФД* для меланомы находится в стадии поиска. В основном поиск ведется в направлении поиска малых молекул, направленные на активный сайт *Г6ФД*, или целевых ингибиторов, которые могут влиять на регуляцию ПФП [Yang H. C. et al., 2019].

Перспективным подходом считается возможность использования антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) комплементарных к мРНК-последовательности гена-мишени *Г6ФД*. При связывании с мРНК *Г6ФД* АСО могут блокировать трансляцию белка вызывать деградацию мРНК через РНК-ингибирование и/или нарушать сплайсинг и приводить к нестандартным изоформам белка. Учитывая преимущества АСО-подхода, которые заключаются в возможности целенаправленного воздействия на специфические участки мРНК *Г6ФД* и их адаптации под различные изоформы и регуляторные участки, данный подход можно

считать перспективным и требующим экспериментального изучения [Stanley T. Crooke et al., 2020].

Целенаправленное лечение МК является актуальной задачей, направленной на снижение не избирательности действия химиотерапии и уменьшающей негативные влияния на организм. Модифицированные АСО обладают возможностью в программировании на определенный эффект, выраженный в блокировке экспрессии целевого гена. Исследования показывают [Stanton R. C., 2012], что пентозофосфатный путь и его ключевые ферменты, является удобной мишенью для действия антисмысловых олигонуклеотидов, вызывая редукцию опухоли. АСО благодаря своей исключительной целенаправленности воздействия, позволяют исследовать механизмы, лежащие в основе патогенеза меланомы и так же разработать эффективные препараты для ее лечения. В последнее время тиофосфатные АСО (тАСО) проявили свой потенциал в лечении разного рода заболеваний, включая онкологические.

В данной работе разрабатывается новый путь патогенетической терапии меланомы с участием модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов и их взаимодействия с защитно-приспособительными реакциями организма.

В данной работе проводится экспериментальное обоснование возможности разработки нового пути патогенетической терапии меланомы на основе технологии модифицированных антисмысловых олигонуклеотидов.

Цель исследования

Установить в эксперименте на культуре клеток Clone М-3 меланомы и на лабораторных животных (мыши) механизмы действия и эффективность применения экспериментальной олигонуклеотидной терапевтической конструкции, направленного на блокировку экспрессии гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Задачи исследования

1. Изучить экспрессию целевого гена *Г6ФД* под влиянием тАСО Skeen-11 и его влияние на метаболическую активность клеточной линии меланомы мышей Clone М-3.
2. Определить динамику клеточной пролиферации и интенсивность апоптоза под влиянием разработанного тАСО Skeen-11.
3. Исследовать влияние тАСО Skeen-11 на остановку клеточного цикла клеток меланомы.
4. Изучить действие разработанной экспериментальной олигонуклеотидной терапевтической конструкции на динамику и морфологию опухоли у лабораторных мышей.
5. Исследовать влияние тАСО на состояние печени и почек модельных животных.

Научная новизна. В работе проведена комплексная оценка тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11. Впервые продемонстрирована эффективность Skeen-11 в блокировке гена пентозофосфатного пути *Г6ФД* и уменьшение его экспрессии в 1,6 раз в клеточной линии меланомы мышей Clone М-3.

Была продемонстрирована эффективность тАСО (тиофосфатного АСО) Skeen-11, который приводил к значительному снижению пролиферации опухолевых клеток в культуре клеток линии Clone M-3 меланомы мышей.

Впервые показано влияние тАСО Skeen-11 на метаболическую активность клеток меланомы мышей, где уменьшение метаболической активности при трех разных концентрациях составляла $63\% \pm 1,6\%$, $42,5\% \pm 2,1\%$ и $16\% \pm 1,2\%$.

Впервые установлено, что под действием тАСО Skeen-11 апоптотические процессы в клетки достигают 93,9% и происходит остановка клеточного цикла в S-фазе. Также установлено нарушение миграционной активности клеток меланомы после воздействия тАСО Skeen-11.

Впервые выявлено, модифицированный Skeen-11 показывает стабильность соединения в гомогенате клеток в течении 18 часов и подвергается воздействию сывороточных нуклеаз на 36 час после взаимодействия.

Показано уменьшение размеров опухоли на 52 % у мышей с привитой меланомой, при введении перитуморальных инъекций Skeen-11.

Практическая и теоретическая значимость

Научная значимость полученных результатов носит как прикладное, так и фундаментальное значение, так как могут быть использованы при разработке новых препаратов для лечения и других заболеваний (другие формы онкологических заболеваний, ревматоидный артрит и др.).

Полученные результаты будут важными для следующих областей исследований:

- получение новых таргетных препаратов для терапии меланомы и других разновидностей опухолевых клеток кожи;
- развитие эффективных подходов перспективной терапии на основе применения антисмысловых олигонуклеотидов.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование было проведено с формированием контрольных и опытных групп, с оценкой функциональных параметров.

В ходе выполненной работы были использованы основные методы культивирования культуры клеток, патологическое экспериментальное моделирование, иммуногистохимические, гистохимические и биохимические методы, методы оценки пролиферации опухолевых клеток. Оценка функциональной активности тиофосфатных олигонуклеотидов, их дизайн и синтез.

Основные научные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Примененный тиофосфатный антисмысловый олигонуклеотид Skeen-11 снижает пролиферативную активность клеток меланомы. Однократное применение олигонуклеотидов в течение 12 часов в культуре клеток Clone M-3 снижало пролиферацию на 62%.
2. Перитуморальное введение тиофосфатного олигонуклеотида Skeen-11 мышам с привитой меланомой приводило к уменьшению размера опухоли на 57% по сравнению с размером опухоли в контрольной группе.
3. Повышение экспрессии иммуногистохимических маркеров FAS и BC1-2 указывают на улучшение прогноза лечения при использовании Skeen-11.

4. Уменьшение экспрессии гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы говорит о целевом действии тиофосфатного олигонуклеотида Skeen-11.

Степень достоверности

Степень достоверности полученных результатов исследования подтверждены большим количеством лабораторных исследований, проанализированных данных, репрезентативностью выборки, применением современных статистических методов анализа. Достоверность также подтверждается наличием современного оборудования, с высокой точность оценки результатов.

Апробация работы

Результаты проведенного исследования доложены и обсуждены на 4-х научно-практических конференциях, в том числе на In Vitro Cellular & Developmental Biology (Сан-Диего, Калифорния, 2022), In Vitro Cellular & Developmental Biology (Норфолк, Вирджиния, 2023). В конференции Фундаментальные исследования - Stopper или Driver современной онкологии? (Ростов-на-Дону, 2022) и на Курчатовском геномном форуме (Москва, 2024). Исследовательская работа выиграла Грант Государственного Совета Республики Крым среди молодых ученых по медицине за проект «Создание комплексного таргетного препарата на основе тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида на примере меланомы (2022 г.). Работа заняла 2 место в общероссийском научно-практическом мероприятии «Эстафета вузовской науки – 2025» в рамках Международного медицинского форума «Вузовская наука. Инновации» по направлению междисциплинарные биомедицинские исследования: молекулярная медицина. Результаты исследования были освещены на III Международном форуме геномных и биомедицинских технологий «От рождения до активного долголетия», г. Сургут, Ханты-Мансийский автономный округ – Югра (2025 г.)

По материалам диссертационного исследования опубликовано 9 работ, из них, статьи, опубликованные в журналах, входящих в перечень ВАК – 2, 4 – тезисы в сборниках конференции, и 2 статьи входящие в международную базу данных Scopus, 1 патент РФ.

Связь работы с научными программами, планами, темами.

Работа выполнялась в Лаборатории молекулярной генетики и биотехнологий в рамках государственного задания «Разработка олигонуклеотидных конструкций для создания селективных и высокоэффективных препаратов для медицины и сельского хозяйства» FGEZ-2021-009. В рамках инициативной НИР «Молекулярные механизмы развития системных и локальных патологических процессов и подходы к их патогенетической коррекции с использованием фармакологических, генетических и клеточных технологий», № госрегистрации 124022300133-1.

Личный вклад автора в исследование

Автором проведены все лабораторные исследования, анализ научной литературы, подбор методологии, сбор данных и обработка результатов. Вместе с научным руководителем проведены обобщения результатов. Научные публикации, текст диссертации и автореферат написаны диссертантом.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, содержит главу с описанием материалов и методов исследования, главы, в которых изложены результаты собственного исследования, заключения и списка литературы. Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 30 рисунков. Список литературы состоит из 137 зарубежных и источников и 11 отечественных источников литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

В работе были подобраны и использованы два тиофосфатных олигонуклеотида, одноцепочечных фрагментов, состоящих из 11 нуклеотидов: антисмысловой целевой Skeen-11 – фрагмент ДНК гена пентозофосфатного пути глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (*Г6ФД*) меланомы мышей с последовательностью 5'-CTGAATCTCCG-3' и контрольный OligoA-11 с последовательностью 5'-AAAAAAAAAAAA-3'.

Исследование антипролиферативной активности (клеточного индекса) тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 и контрольного олигонуклеотида OligoA-11 на клеточной линии меланомы мышей Clone M-3 было проведено с помощью системы xCelligence Real Time Cell Analyzer.

Оценку противоопухолевого действия тАСО Skeen-11 проводили на мышах 14-16 недель, вес мышей на момент постановки экспериментов составлял 12-18 грамм. Животных содержали по 10 особей в клетке, у мышей был свободный доступ к еде и воде. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей, и одобрены этическим комитетом Крымского федерального университета (протокол № 8 от 17 сентября 2020 г.). Мышам были подкожно трансплантированы клетки меланомы мышей Clone M-3. На 16-18-е сутки, после возникновения пальпируемых опухолей, мышам проводили перитуморальные инъекции препарата Skeen-11 каждые сутки, в течение 7-ми дней. После подкожного введения, АСО всасываются быстро и вводятся в кровоток.

Иммуногистохимический анализ. На 7е сутки животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Для морфологического исследования кусочки опухоли размером 0,5*0,2*0,2 см фиксировали в забуференном 10% формалине в течение 12 часов, после чего дегидратировали и пропитывали парафином в полуавтоматическом микроволновом гистопроцессоре LOGOS (Mielstone, Италия). Затем изготавливали срезы толщиной 4 мкм, окрашивали их гематоксилином-эозином для оценки морфологии опухоли, подсчитывали количество фигур митоза в 10 полях зрения по каждому препарату с вычислением среднего арифметического. Для определения экспрессии маркеров апоптоза FAS (CD95) и BCL-2 использовали метод иммуногистохимии. Реакцию проводили в иммуногистостейнере BOND-Max. Протокол окрашивания включал депарафинизацию, демаскировку антигена с буфером pH 6,2 в течение 20 минут, блокировку пероксидазы в течение 5 минут,

инкубацию с первичными антителами в течение 30 минут при комнатной температуре. Для визуализации реакции использовали систему детекции на основе полимера Polimer Refine Detektion (Leica, Германия). В качестве первичных антител использовали антитела к рецептору Fas-R (клон ab13361, Abcam, США) в разведении 1:200 и к антиапоптотическому белку NCL-L-bcl-2 (Novokastra, Великобритания) в аналогичном разведении. Просмотр и оценку результатов окрашивания проводили под микроскопом DM2000 (Leica, Германия) с цифровой камерой DFC295. Интенсивность окрашивания оценивали полуколичественно. Менее 10 % слабо окрашенных клеток – отрицательная реакция, 10-30 % слабо окрашенных клеток – слабопозитивная реакция, 30-50% слабоокрашенных клеток или до 10-30% интенсивно окрашенных клеток – среднепозитивная реакция, более 50% окрашенных клеток – сильнопозитивная реакция. Оценивалось мембранное окрашивание с маркером FAS и цитоплазматическое окрашивание с маркером bcl-2. В оценке не учитывались клетки, имеющие в цитоплазме зерна меланина.

Токсичность тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов оценивали также посредством биохимического анализа крови. Оценку проводили по шести главным биохимическим показателям крови, которые показывают состояние и функциональную работу внутренних органов, в частности, работу печени и почек. Основные показатели: аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, мочевины, креатинин, общий белок.

Оценку апоптотических процессов, после воздействия тАСО Skeen-11 проводили через 12 часов, после добавления Skeen-11 в культуру клеток, с концентрацией 300 нг/мкл в объеме 100 мкл на 5×10^5 клеток Clone M-3, путём окрашивания клеток Annexin V. Эксперимент проводили в пяти повторностях.

Часть клеток (5×10^5), после исследования на апоптоз, была отобрана на анализ клеточного цикла. Чтобы определить, связано ли влияние Skeen-11 на ингибирование пролиферации клеток Clone M-3 с остановкой клеточного цикла, количество клеток в фазах G0/G1, S и G2/M оценивали с помощью проточной цитометрии.

Для оценки эффекта тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 на жизнеспособность клеток Clone M-3 мы на провели трансфекцию олигонуклеотида в клетки с помощью набора для трансфекции PEI 40K (Servicebio, Китай).

В эксперименте участвовало 2 группы клеток, в каждой группе было 1×10^5 клеток. Первой группе трансфецировали тАСО Skeen-11 в концентрации 7 000 нг/мкл, а второй группе клеток добавили тАСО Skeen-11 в такой же концентрации в культуральную среду. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью подсчета живых клеток на приборе Luna-II (Logos Biosystems, Южная Корея). Жизнеспособность клеток подсчитывали в процентах.

Исследование миграционной активности клеток меланомы Clone M-3 после воздействия тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 проводили методом «заращания царапины» (scratch-test). Этот анализ используется для измерения основных параметров скорости постоянства миграции клеток. Клетки на краю раны поляризуются и мигрируют в раневое пространство.

Для изучения антисмыслового подавления экспрессии гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клеточной линии меланомы мышей Clone M-3, в культуральную среду в виде свободного олигонуклеотида вводили Skeep-11 в 2-х разных концентрациях: 1000 нг/мкл и 2000 нг/мкл в количестве 10 мкл на 1×10^6 клеток для каждой концентрации.

Выделенную тотальную РНК, использовали для обратной транскрипции с отжигом обратного праймера 5'-A-CAG-TGG-ATG-TCC-TAG-GTG-3'. В дальнейшем для ПЦР в реальном времени использовали два специфических праймера: прямой 5'-ССА-GGC-TGG-TGA-СGA-TТА-С-3' и обратный 5'-A-CAG-TGG-ATG-TCC-TAG-GTG-3'.

Метаболическую активность клеток меланомы оценивали с помощью теста с использованием красителя МТТ, который применяется для прижизненной окраски митохондрий клеток, определяет активность митохондриальных дегидрогеназ, и несет оценку интенсивности реакции восстановления тетразолиевого красителя НАДФ-Н-зависимыми оксидоредуктазными ферментами. При конверсии МТТ реагента в формазан клетками линии Clone M-3 при использовании в качестве поверхностно-активного растворителя раствора ДМСО приходится на 560 нм. Данная длина волны была выбрана для регистрации оптической плотности во всех 5-ти повторностях. В качестве референсной была выбрана длина волны 670 нм, в интактной группе клеток оптическую плотность так же измеряли при длине волны 560 нм. Отсечение данного показателя при расчетах позволяет не использовать отрицательный контроль (среда без клеток).

При процентном расчете метаболической активности контрольную группу клеток (клетки без олигонуклеотида) брали за 100%.

Результаты исследований

В наших экспериментах была продемонстрирована эффективность тАСО Skeep-11, который приводил к значительному снижению пролиферации опухолевых клеток в культуре клеток линии Clone M-3 меланомы мышей. Наиболее выраженный эффект наблюдался через 6 ч после начала эксперимента, когда клеточная пролиферация культуры, обработанной Skeep-11, составила $0,38 \pm 0,02$; в течение 6 часов это значение резко уменьшилось до $0,19 \pm 0,02$. В контрольной группе клеточная пролиферация через 6 часов составила $0,54 \pm 0,03$; через 12 часов он достиг плато роста со значением $0,48 \pm 0,03$. Среднее снижение клеточной пролиферации через 12 часов в группе, получавшей Skeep-11, было в 2,71 раза ниже, чем в контрольной группе. Контрольный олигонуклеотид OligoA-11 не оказал существенного влияния на рост меланомы по сравнению с контрольной группой (рисунок 1).

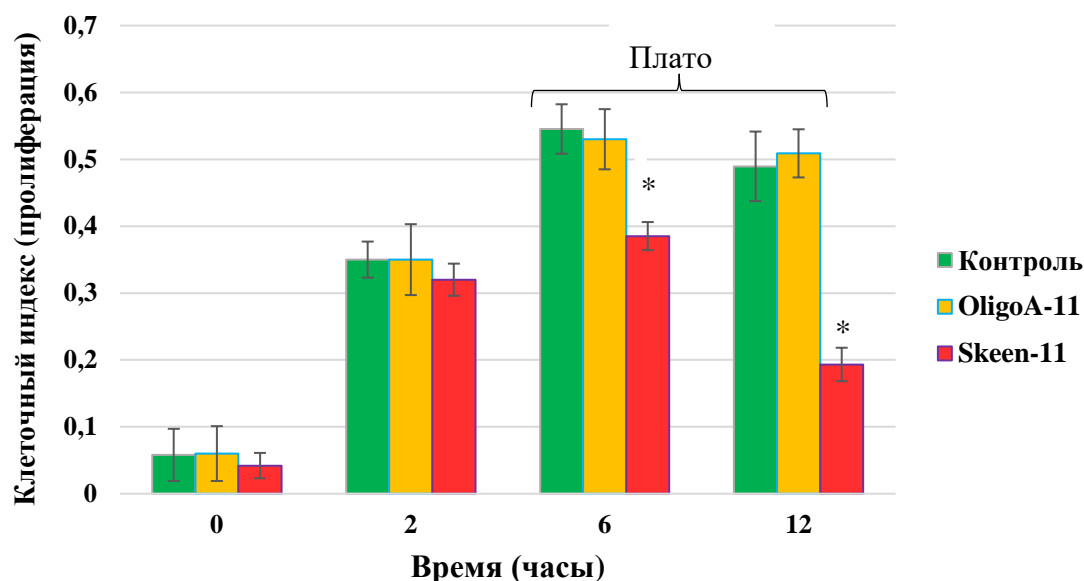


Рисунок 1 – Динамика клеточного индекса (пролиферации) клеточной линии Clone M-3 в разных экспериментальных группах; *достоверная разница по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$); значения показаны со средними значениями и SE.

Показано, что под действием тАСО Skeep-11, на 12 часов эксперимента апоптотические процессы в клетки достигли $93,9\% \pm 0,33$, в это время у контроля было $9,2\% \pm 0,56$ апоптотических клеток. Это достоверно указывает на апоптотический эффект тАСО Skeep-11 (рисунок 2, А, Б).

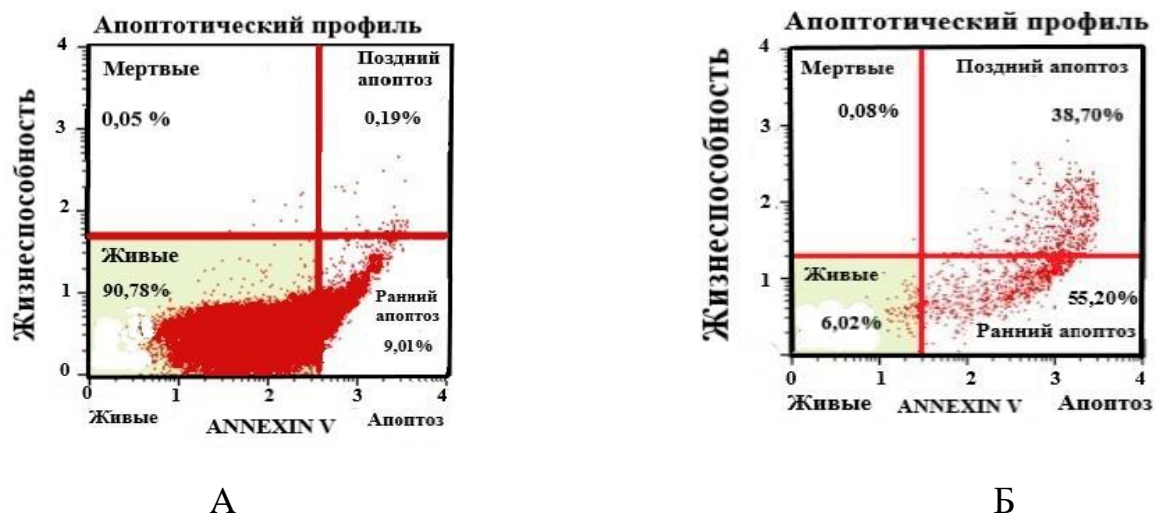


Рисунок 2 – Процент апоптотических клеток меланомы Clone M-3 на 12 часов, после проникновения тАСО в клетки, окрашенных Annexin V. А – Контроль; Б – Skeep-11.

Было показано ингибирующее действие Skeep-11 с остановкой прогрессирования клеточного цикла. Наши данные показали, что воздействие на

клетки с помощью Skeep-11 значительно снижало долю клеток в фазах S и G2/M, и увеличивало долю клеток в фазе G0/G1.

Тиофосфатный олигонуклеотид Skeep-11 вызывает остановку клеточного цикла в клетках меланомы мышей Clone M-3. Воздействие тАСО Skeep-11 действительно ингибировало прогрессирование клеточного цикла в клетках меланомы мышей Clone M-3. Результаты анализа клеточного цикла показали, что применение Skeep-11 индуцирует достоверное накопление клеток в фазе G0/G1 и составляет 97,7%, по сравнению с контролем. Кроме того, Skeep-11 достоверно ($p > 0,05$) снижал процент клеток в фазах S 1,6% \pm 0,96 и G2/M 0,07% \pm 0,01 по сравнению с необработанной группой контроля. Эти результаты согласуются с результатами апоптотического анализа (рисунок 3).

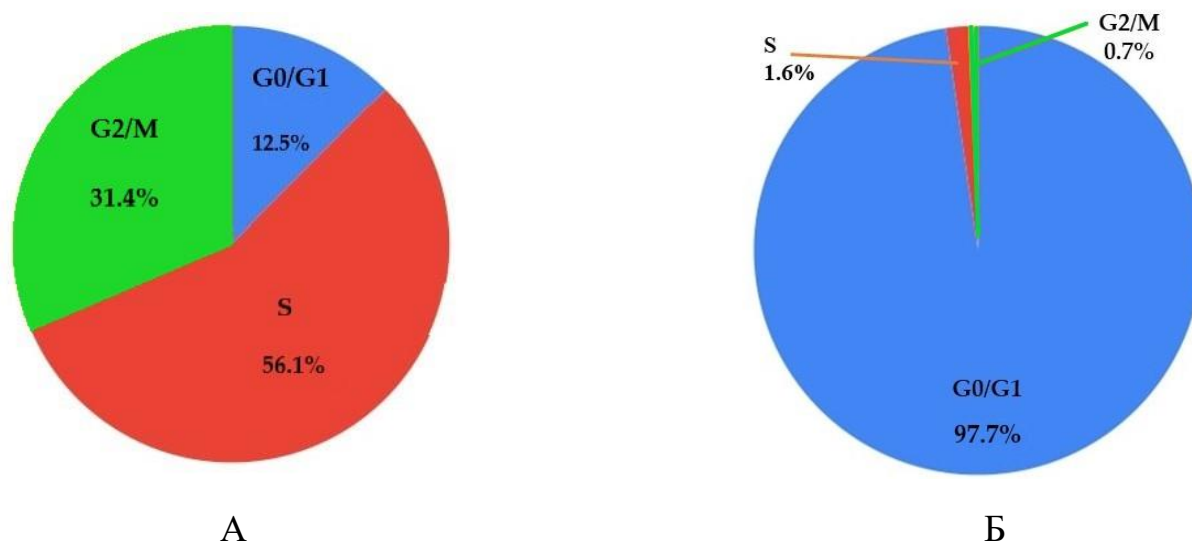


Рисунок 3 – Клеточный цикл культуры клеток меланомы мышей Clone-M3, после воздействия тАСО Skeep-11: а – контроль; б – Skeep-11.

Как видно из представленных данных, тиофосфатный олигонуклеотид Skeep-11 значительно снижает скорость миграции клеток меланомы: скорость зарастания царапин в контроле составила 14,3% \pm 3,3 через 24 ч, 17,3% \pm 3,3 через 72 ч инкубации, тогда как Skeep-11 способствовал разрушению клеточного монослоя от краев царапины наружу через 24 часа на 13,3% \pm 3,3 и через 72 часа на 23,3 \pm 3,3%, что достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рисунок 4).

Таким образом, тАСО Skeep-11 эффективно и длительно снижает клеточную пролиферацию, тем самым обеспечивает подавление процессов канцерогенеза и миграционной активности клеточной линии меланомы мышей Clone M-3.

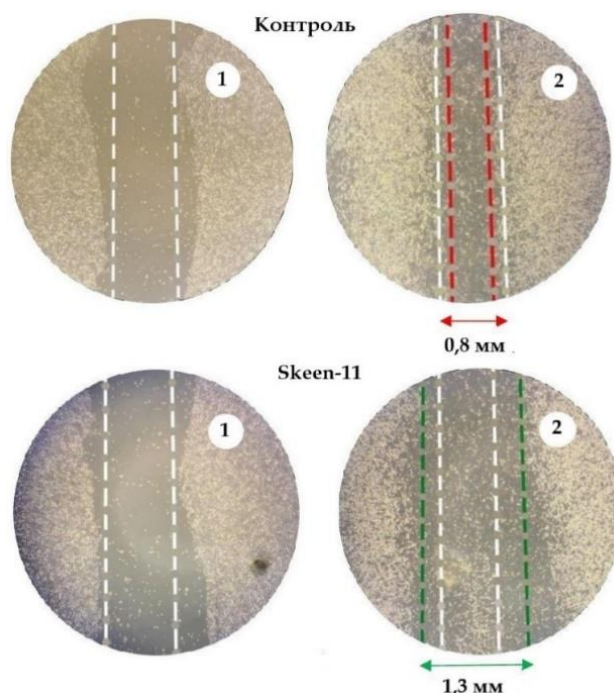


Рисунок 4 – Метод зарастания царапины (scratch-test): контроль — 1 — 1-е сутки от начала эксперимента, царапина = 1 мм; 2 — 3-е сутки от начала эксперимента, царапина = 0.8 мм; Skeen-11 — 1 — 1-е сутки от начала эксперимента, царапина = 1 мм; 2 — 3-е сутки от начала эксперимента, царапина = 1.3 мм; фотофиксирование клеток проводили под микроскопом каждые 24 ч в течение 3 суток.

Для оценки эффекта тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 на жизнеспособность клеток Clone M-3 мы провели трансфекцию олигонуклеотида в клетки с помощью набора для трансфекции PEI 40K (Servicebio, Китай).

Таблица 1 – Жизнеспособность клеток Clone M-3 с трансфецирующим агентом и без

Часы инкубации	Без трансфекции (контроль)	С трансфекцией
12	51 ± 1,1%	48 ± 1,4%
16	36 ± 1,6%	34 ± 1,8%
24	30 ± 1,5%	26 ± 2,1%
28	22 ± 1,4%	23 ± 2%

Достоверных отличий в экспериментальных группах не было. Это подтверждает тот факт, что тиофосфатные АСО могут проникать в клетку без трансфецирующих агентов.

При изучении экспрессии гена *Г6ФД*, выяснили, что экспрессия достоверно менялась при увеличении концентрации тиофосфатного олигонуклеотида, что позволяет предположить, что ингибирование, полученное с помощью антисмыслового олигонуклеотида, было специфичным для последовательности.

Концентрация мРНК гена *Г6ФД* при 10 мкг была в 1,6 раз ниже, что достоверно контрольной группе ($p < 0,05$), а концентрация мРНК гена *Г6ФД* при 20 мкг была в 3,5 раза ниже, что так же достоверно контрольной группе ($p < 0,05$) (рисунок 5).

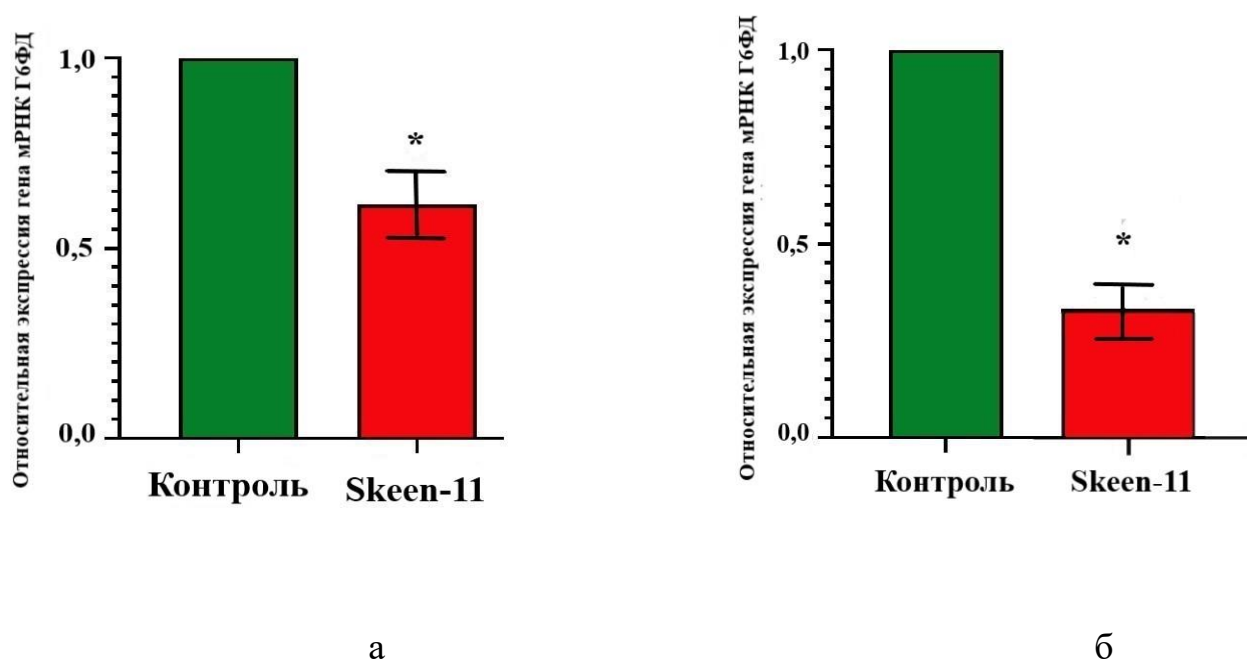


Рисунок 5 – Антисмысловой олигонуклеотид Skeen-11 ингибирует экспрессию гена *Г6ФД* в зависимости от концентрации, в клеточной линии меланомы мышей Clone М-3 на 12 часов после обработки тАСО Skeen-11: а – 10 мкг, б – 20 мкг. Данные представляют собой средние значения и стандартные ошибки концентраций мРНК для 6 повторов по сравнению с контрольной группой клеток. Значения для контроля равны 1 (100%). Примечание: * достоверная разница по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$).

Исследование метаболической активности клеток меланомы, при взаимодействии с тАСО Skeen-11, показало, что при концентрации 2 мкг Skeen-11, метаболическая активность клеток составляла $63\% \pm 1,6\%$ ($p < 0,05$), при концентрации 7 мкг метаболическая активность клеток составляла $42,5\% \pm 2,1\%$ ($p < 0,05$). При этой концентрации клетки пересекают границу LC50, что означает, что метаболическая активность клеток падает на 50%. При концентрации 10 мкг,

процент метаболической активности составляет $16\% \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$), что ближе к летальному метаболическому значению LC_{100} (рисунок 6).

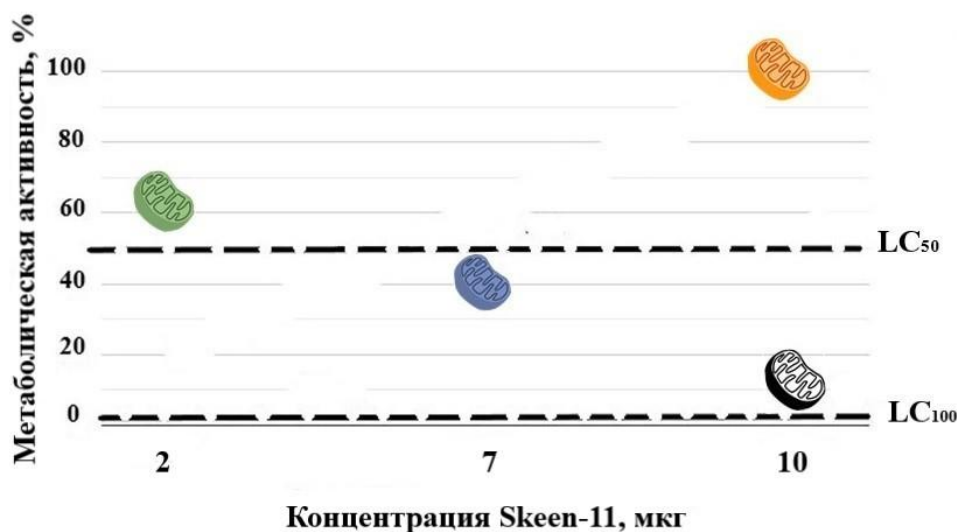


Рисунок 6 – Метаболическая активность клеток Clone M-3 после инкубации тАСО Skeen-11 в разных концентрациях на 1×10^3 клеток. Контроль – зеленый цвет, экспериментальная группа обозначена красным цветом.

LC_{100} – это концентрация, при которой метаболическая активность составляет 0% (абсолютная летальная концентрация). На практике такой результат не встречается, поскольку какая-то часть МТТ-реагента восстанавливается внеклеточными ферментами, поэтому метаболическая активность менее 10% можно условно принять за LC_{100} [Прилепский А.Ю. и др., 2019].

Учитывая воздействие тАСО Skeen-11 на фермент *Г6ФД*, который играет центральную роль в пентозофосфатном пути для образования клеточного НАДФ, его в клетках Clone M-3, после воздействия тАСО Skeen-11, значительно ниже, это доказывает то, что тАСО Skeen-11 угнетает НАДН-дегидрогеназный комплекс.

Важной особенностью препарата, используемого в терапевтических целях *in vitro* и *in vivo* является его стабильность к действию внутриклеточных и сывороточных нуклеаз. На рисунках показаны результаты анализа стабильности тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 в гомогенате клеток Clone M-3 (рисунок 7,8).

Как видно из представленных на рисунке данных, модифицированный олигонуклеотид показывает стабильность соединения в гомогенате клеток в течении 18 часов, в то время как тиофосфатный олигонуклеотид Skeen-11 подвергается воздействию сывороточных нуклеаз на 36 час после взаимодействия (рисунок 7). Относительно тиофосфатного олигонуклеотида в гомогенате клеток, то на 36 час инкубации мы видим остаточное свечение Skeen-11 (рисунок 8).

0 2 4 M 8 16 24 36 K₁ K₂

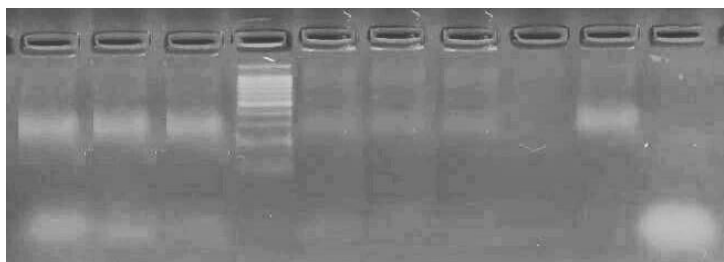


Рисунок 7 – Электрофореграмма нуклеазной активности тАСО Skeen-11 в сыворотке крови мышей. 0-36 часы инкубации; М – маркер молекулярного веса; К₁ – контроль сыворотка; К₂ – контроль тАСО Skeen-11.

0 2 4 M 8 16 24 36 K₁ K₂

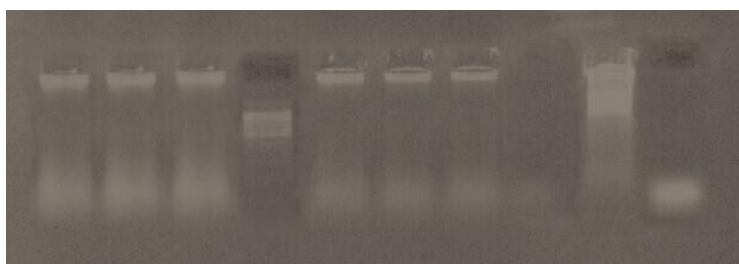


Рисунок 8 – Электрофореграмма нуклеазной активности тАСО Skeen-11 в гомогенате клеток линии Clone-M-3. 0-36 часы инкубации; М – маркер молекулярного веса; К₁ – контроль гомогенат клеток; К₂ – контроль тАСО Skeen-11.

Известно, что модифицированные олигонуклеотиды характеризуются длинным периодом полураспада, так как по своей природе устойчивы к действию внутриклеточных нуклеаз, т. е. обладают высокой биологической активностью *in vitro*. Кинетика в плазме характеризуется короткой фазой распределения (порядка нескольких часов), а затем наступает фаза выведения препарата с периодом его полувыведения, составляющим дни или недели.

В ходе эксперимента при перевивании культуры клеток лабораторным мышам, на 16-18-е сутки, после возникновения пальпируемых опухолей, мышам проводили перитуморальные инъекции препарата Skeen-11 каждые сутки, в течении 7-ми суток. Было обнаружено уменьшение размера опухоли в ответ на применение Skeen-11. В среднем размер опухоли уменьшался на 15% в день в группе, получавшей Skeen-11 в течение 7 дней (рисунок 9, в), тогда как в контрольной группе размер опухоли увеличивался на 7% в день (рисунок 9, а). Контрольный олигонуклеотид OligoA-11 увеличивал размер опухолей с течением времени (рисунок 9,б). Средний размер опухоли в группах в начале эксперимента составил $0,30 \pm 0,04 \text{ см}^2$; на 7-й день эксперимента наблюдались достоверные различия между средней площадью опухоли контрольной группы ($0,35 \pm 0,06 \text{ см}^2$) и группы, получавшей Skeen-11 ($0,15$

$\pm 0,05 \text{ см}^2$) ($p < 0,05$) (рисунок 9, г). Интересной особенностью, которую мы также отметили, было отсутствие роста опухоли в месте инъекции Skeep-11, где опухоль продолжала расти в противоположном направлении от места инъекции. Контрольный олигонуклеотид OligoA-11 не оказывал существенного влияния на рост меланомы по сравнению с контролем ($0,4 \pm 0,11 \text{ см}^2$).

На 7^{-е} сутки площадь опухоли в группе Skeep-11 уменьшилась на 52%; в контрольной группе она увеличилась на 20,8% по сравнению с первыми сутками эксперимента (рисунок 10 а, б).

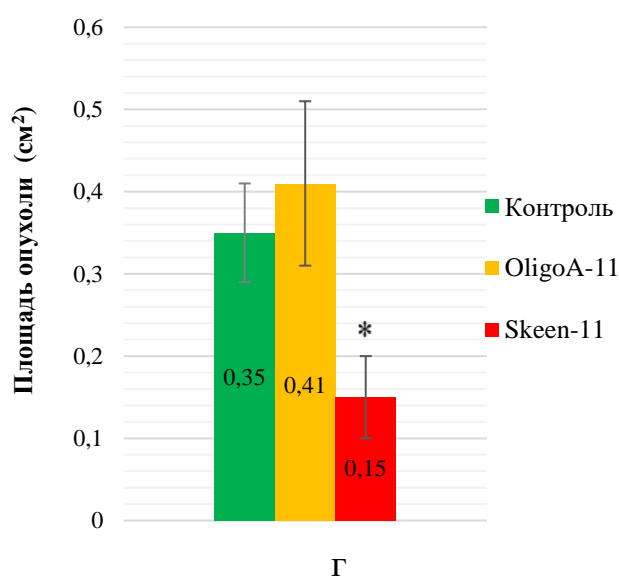
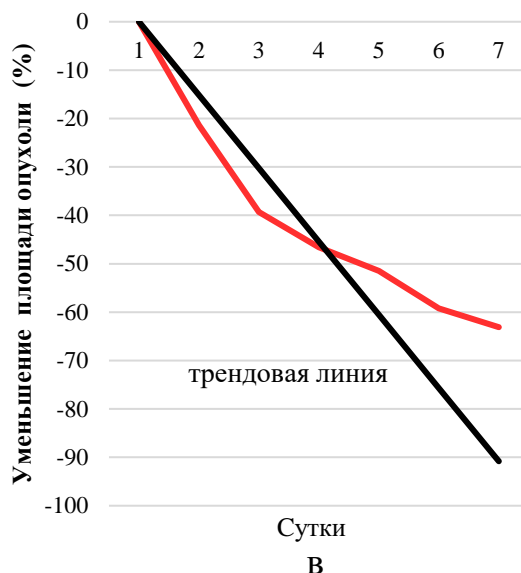
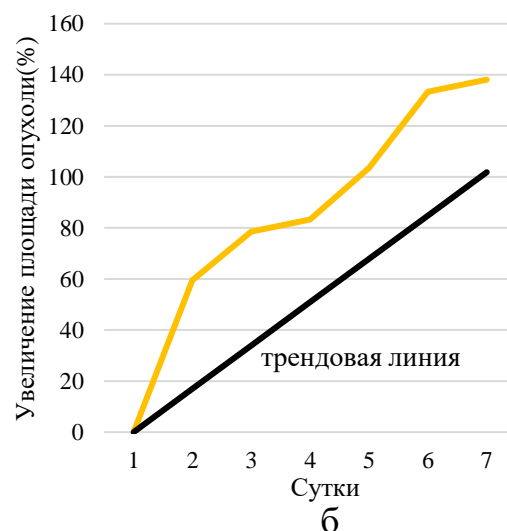
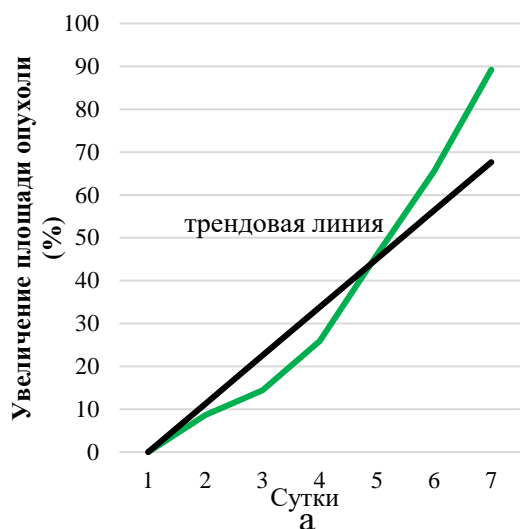


Рисунок 9 – Динамика среднего увеличения площади опухоли для разных экспериментальных групп на 7^{-е} сутки эксперимента: а – контроль; б – OligoA11; в – Skeep-11; г – средняя площадь опухоли. Достоверная разница по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) отмечена *; значения показаны со средними значениями и SE.



Рисунок 10 – а) Образовавшаяся опухоль на 18 день после перевивки культуры клеток Clone M-3, подкожно; б) Редукция опухоли на 7е сутки после лечения Skeen-11 в концентрации 30 мкг.

Гистологический анализ опухолей показал, что в контрольной группе клетки без признаков апоптоза локализовались исключительно вокруг крупных сосудов. Несмотря на то, что их метаболизм претерпевает перестройку в сторону аэробного гликолиза с лактатом в виде конечного продукта и заранее готовится к гипоксии, в результате быстрого роста жизнеспособными остаются лишь клетки в непосредственной близости от сосудов.

Схожая картина наблюдалась в группе OligoA-11. Отличие заключалось лишь в значительно большем количестве митозов.

В группе Skeen-11 наблюдали снижение количества митозов относительно контрольной группы. Также обращает на себя внимание вакуолизация ядер в клетках опухоли, расположенной вблизи сосудов. Имеются признаки дистрофии клеток. Вероятно, это связано с нарушением (окислительной/неокислительной ветви) пентозофосфатного пути, в результате чего значительно снижается продукция нуклеиновых кислот, необходимая для поддержания высокой скорости роста клеток, а также дисбаланса в синтезе белков и липидов.

Результаты иммуногистологического исследования на апоптоз-ассоциированный белок Bcl-2 показали, что в поле зрения в группе лечения было обнаружено $11,9 \pm 0,85$ клеток, что на 40,77% больше, чем в контрольной группе, где в группе лечения было обнаружено $8 \pm 0,48$ клеток. поле зрения ($p < 0,01$). На апоптоз-ассоциированный белок FAS в поле зрения в группе лечения было обнаружено $11,2 \pm 1,08$ клеток, что на 65,7% больше, чем в контрольной группе, где в поле зрения было обнаружено $3,7 \pm 0,48$ клеток ($p < 0,01$). Отмечен интересный факт, что в группе Skeen-11 наблюдалось в 2,5 раза меньше амитозов по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Также обращает на себя внимание вакуолизация ядер в опухолевых клетках, расположенных вблизи сосудов, и имеются признаки клеточной дистрофии (рисунок 11). Иммуногистохимическое окрашивание на апоптоз-ассоциированные белки Bcl-2 и FAS дало интересный результат. Известно, что при злокачественной трансформации экспрессия этих маркеров снижается. Таким образом, снижение экспрессии FAS и Bcl-2 улучшает прогноз лечения.

В данном эксперименте при иммуногистохимическом окрашивании в группе лечения отмечено более интенсивное окрашивание на апоптоз-ассоциированные белки FAS и Bcl-2, что в свою очередь свидетельствует о повышенной экспрессии этих белков и более благоприятном прогнозе лечения. Отдельно следует отметить, что при гистологическом исследовании отмечено достоверное снижение числа амитозов в группе лечения по сравнению с контрольной группой, наряду с наблюдением некроза новообразованных клеток.

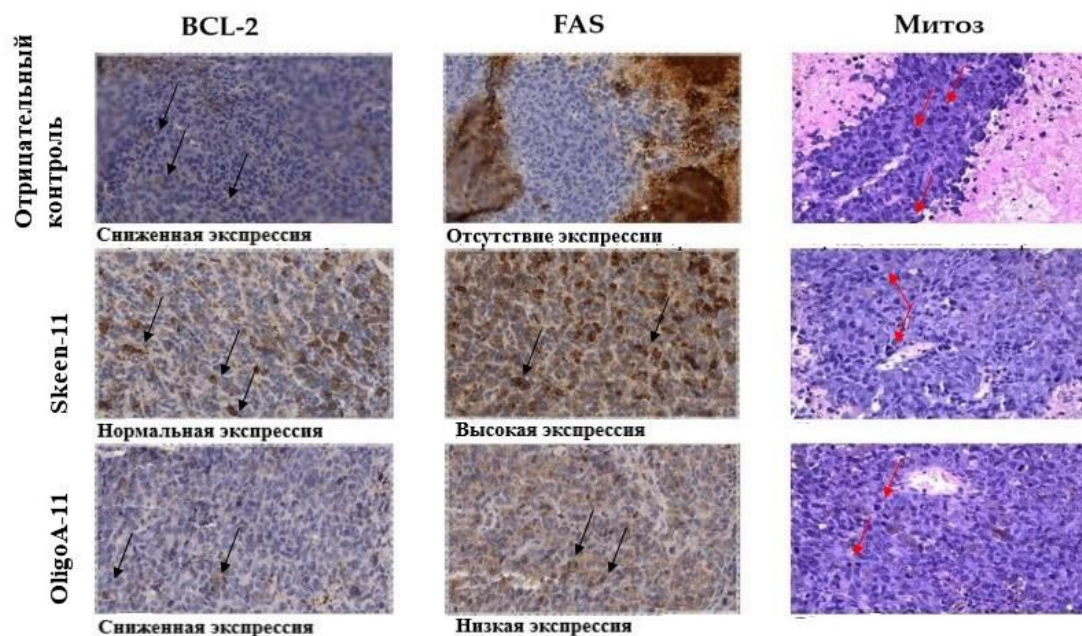


Рисунок 11 – Гистологическое исследование опухолей меланомы в разных группах эксперимента (увеличение 400x) *черные стрелки – экспрессирующиеся клетки; красные стрелки – митотические клетки

Токсичность тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов оценивали путем иммуногистохимического анализа деструктивных изменений в печени и почках животных-опухоленосителей. Показано, что развитие опухоли само по себе оказывает токсическое действие на печень модельных животных, выражающееся в деструктивных изменениях в тканях печени в виде дистрофии и апоптоза, достигающих 15% всей паренхимы опухоли. Введение тиофосфатных олигонуклеотидов не оказывает существенного дополнительного деструктивного действия на печень и почки животных.

Морфометрический анализ печени показал, что печень животных контрольной группы имеет типичное строение. Гепатоциты организованы в балки и формируют печеночные дольки с центральными венами в центре и триадами по периферии. Синусы между дольками умеренно расширены, в просветах единичные эритроциты и макрофаги. В просветах крупных сосудов, наряду с эритроцитами встречаются лейкоциты, местами скапливающиеся в периваскулярном пространстве. Гепатоциты имеют округлую или многогранную форму с мелкозернистой цитоплазмой и округлым ядром с хорошо выраженными ядрышками. По периферии дольки могут встречаться двуядерные клетки.

В группе OligoA-11 наблюдали гипертрофию гепатоцитов и их ядер, часто встречались полиплоидные ядра. Также характерна баллонная дистрофия цитоплазмы, отек ядра клетки, фрагментация хроматина, в меньшей степени пикноз. Встречали очаги апоптотической гибели клеток. Организация гепатоцитов внутри долек печени нарушена. В периваскулярном пространстве и вокруг желчных протоков, а также очагово в паренхиме печени имелась лимфоидная инфильтрация (рисунок 12). Синусы сужены, но полнокровны.

В группе Skeen-11 синусные капилляры расширены, что несколько затрудняет фильтрацию крови. Наблюдалась очаговая лимфоидная инфильтрация паренхимы, однако в значимо меньшей степени, чем у группы OligoA-11. Также встречались отдельные гипертрофированные гепатоциты с полиплоидными ядрами, большое количество двуядерных клеток, что свидетельствует об активных процессах регенерации. Однако большая часть гепатоцитов имела баллонную дистрофию цитоплазмы, у многих вакуолизировано ядро. Такие клетки чаще всего располагались в центральной части долек. Структура долек не была нарушена.

В целом в группе Skeen-11 печень имеет некоторые признаки повреждения и репарации, при этом отличия от контрольной группы незначительны и касаются исключительно площади ядер и ядерно-цитоплазматического соотношения.

В группе Oligo-A11 гепатоциты повреждены сильно, а репаративные процессы не могут компенсировать данные повреждения, что приводит к гибели клеток по апоптотическому пути и элиминации апоптотических клеток лейкоцитами, о чем свидетельствуют обширные области лейкоцитарной инфильтрации.

В группе OligoA-11 гепатоциты повреждены сильно, а репаративные процессы не могут компенсировать данные повреждения, что приводит к гибели клеток по апоптотическому пути и элиминации апоптотических клеток лейкоцитами, о чем свидетельствуют обширные области лейкоцитарной инфильтрации.

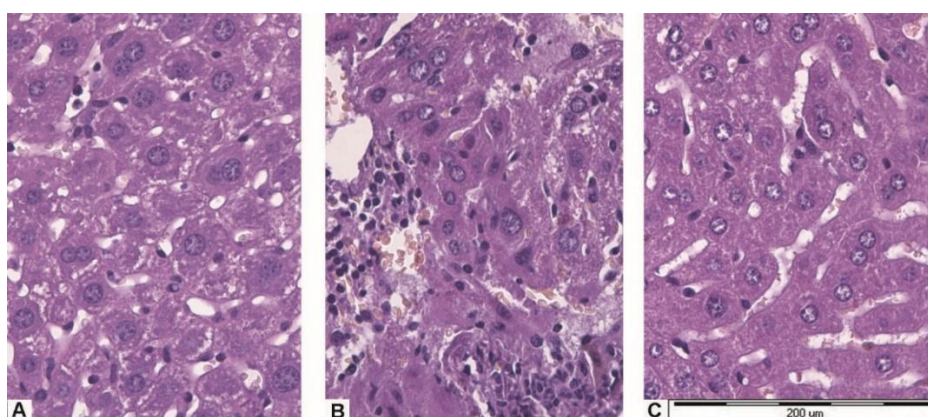


Рисунок 12 – Печень мыши. Гематоксилин-эозин. Об. 40х. А – контрольная группа, В – группа oligoA-11, С – группа Skeen-11.

Морфометрические показатели почек животных контрольной группы имеют типичное строение. В корковом веществе расположены почечные тельца, проксимальные и дистальные извитые канальцы и собирательные трубочки. Мозговое вещество представлено одной пирамидой из элементов петли Генле и

собирательных трубочек. Эпителий всех элементов имеет типичное строение. Крупные сосуды и капилляры имеют нормальное кровенаполнение.

В почках животных их группы OligoA-11 мочевое пространство большинства почечных телец расширено. В большинстве проксимальных извитых канальцев клетки эпителия дистрофичны, просвет канальцев заполнен предположительно белковыми массами, встречаются апоптозные тельца (рисунок 13, В), аналогичное содержимое встречается в собирательных трубочках. Эпителий проксимальных извитых канальцев проникает глубоко в капсулу почечного тельца. Наблюдается периваскулярная лимфоидная инфильтрация, микроабсцессы. В сосудах как крупных, так и капиллярах, наблюдается стаз эритроцитов.

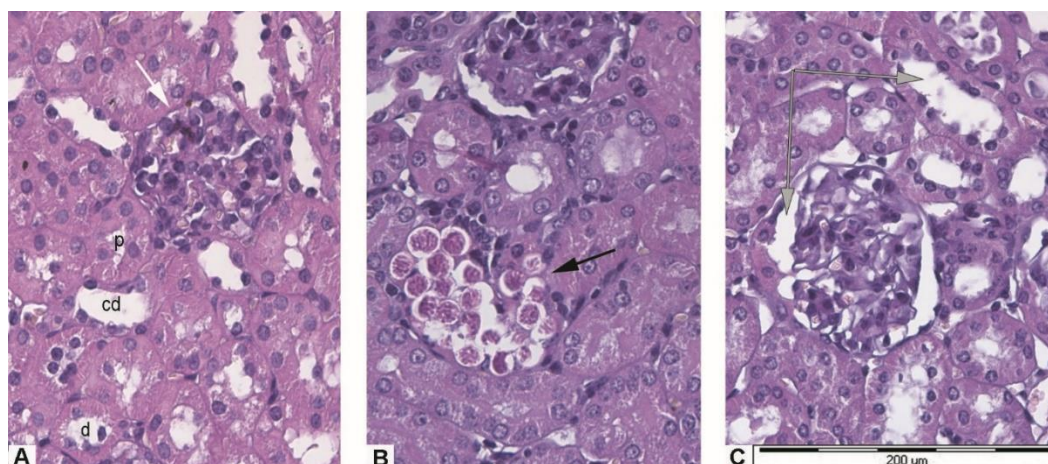


Рисунок 13 – Кортикальное вещество почки. Гематоксилин-эозин. Об. 40х. А – контрольная группа, В – группа OligoA-11, С – группа Skeen-11, p – проксимальный каналец, d – дистальный каналец, cd – собирательная трубочка, белая стрелка – почечное тельце, черная стрелка – десквамация эпителия проксимальных канальцев и скопление лимфоцитов рядом с ним, серая стрелка – расширенное мочевое пространство почечного тельца и просвет дистального канальца.

Известно, что тиофосфатные олигонуклеотиды имеют некоторые недостатки. Главным недостатком являются побочные эффекты, вызванные некоторыми неспецифичными связываниями с белками, например гепарин-связывающими. В низких дозах токсичность обычно не наблюдается, но при высоких возникали эффекты увеличения свертываемости крови, тромбоцитопения и активация иммунного ответа

Токсичность тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов оценивали также посредством биохимического анализа крови. Оценку проводили по шести главным биохимическим показателям крови, которые показывают состояние и функциональную работу внутренних органов, в частности, работу печени и почек.

Сравнительный анализ показал достоверные отличия между опытными и контрольными группами. Эталонными считались результаты анализа положительного контроля для мышей.

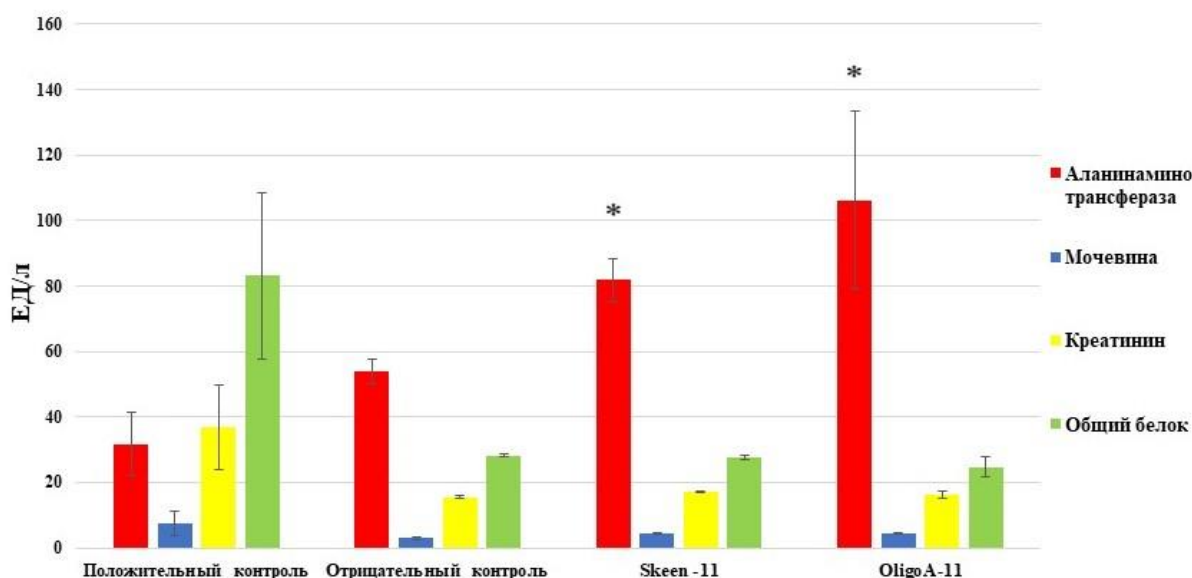


Рисунок 14 – Средние значения по основным биохимическим показателям крови у различных экспериментальных групп мышей, после терапии АСО. * – достоверные отличия между отрицательной контрольной группой и экспериментальными группами (Skeen-11 и OligoA-11) по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

По показателю ALAT олигонуклеотиды Skeen-11 и OligoA-11 значительно повышены, по соотношению с контролями «+» и «-». По сравнению с «+» контролем Skeen-11 повышен на 50,08 Ед\Л и на 27,76 Ед\Л по сравнению с «-» контролем. OligoA-11 достоверно различается от «+» контроля и показатель увеличен почти в 3 раза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ингибирование экспрессии Г6ФД антисмысловыми олигонуклеотидами является эффективным средством лечения меланомы, однако следует отметить, что этот метод наиболее подходит как для местного лечения, так и для системного лечения. В свою очередь, системное лечение может вызывать некоторые побочные эффекты, которые можно корректировать дозой. АСО, которые можно использовать в виде таргетных мазей или кремов, или инъекций, как показано в данной работе, дают особую надежду на элиминацию опухолевых клеток в области вблизи очага опухоли, как до и после операции, чтобы отсрочить или даже предотвратить развитие метастазов первичной опухоли и их попадание в лимфатические узлы.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что экспрессия целевого гена *Г6ФД* под влиянием антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 в концентрации 10 мкг снижается в 1,6 раз ($p < 0,05$), а в концентрации 20 мкг – в 3,5 раза ($p < 0,05$).
2. Установлено, что под влиянием антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 показатель апоптотических процессов в клеточной линии Clone M-3 составил $93,9 \pm 0,33$ % ($p < 0,05$), а метаболическая активность раковых клеток снизилась до $63 \pm 1,6$ % ($p < 0,05$), $42,5 \pm 2,1$ % ($p < 0,05$) и $16 \pm 1,2$ % ($p < 0,05$) при использовании олигонуклеотида в концентрациях 2 мкг, 7 мкг и 10 мкг, соответственно.
3. Показано, что под влиянием антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 увеличилось количество клеток меланомы в фазе G0/G1 до 97,7% ($p < 0,05$), а также снизилось до $1,6 \pm 0,96$ % количество клеток в фазе S ($p < 0,05$) и до $0,07 \pm 0,01$ % клеток в фазе G2/M ($p < 0,05$).
4. При изучении динамики клеточной пролиферации установлено, что под влиянием тиофосфатного олигонуклеотида Skeen-11 наиболее выраженный эффект наблюдался через 6 ч после начала эксперимента и составил $0,38 \pm 0,02$ уе ($p < 0,05$), а через 12 часов от начала эксперимента данное значение уменьшилось до $0,19 \pm 0,02$ уе ($p < 0,05$), а клеточный индекс за 12 часов снизился в 2,71 раза ($p < 0,05$). Редукция опухоли в среднем составила 15%/день в течение семи дней эксперимента: с $0,3 \pm 0,04$ см² на 1-е сутки эксперимента до $0,15 \pm 0,05$ см² на 7-е сутки эксперимента ($p < 0,05$).
5. Оценено влияние тиофосфатных олигонуклеотидов Skeen-11 и рандомного OligoA-11 на биохимические показатели и формулу крови *Mus musculus*. Показатель аланинаминотрансферазы в группе Skeen-11 повышен на 50,08 Ед\л по сравнению с положительным контролем и на 27,76 Ед\л по сравнению с отрицательным контролем. Рандомный тиофосфатный олигонуклеотид OligoA-11 достоверно отличался по данному показателю от положительного контроля почти в 3 раза. Активность аспартатаминотрансферазы также была достоверно повышена для Skeen-11 и OligoA-11, тогда как щелочная фосфатаза у опытных групп находилась в пределах нормы. Кроме этого, наблюдается уменьшение креатинина почти в 2 раза в группе Skeen-11 по сравнению с положительным контролем. При исследовании тромбоцитов в разных экспериментальных группах было установлено, что количество тромбоцитов в группе, получавшей Skeen-11, было увеличено на 237 ед по сравнению с положительным контролем. Показатели лейкоцитарной активности у отрицательной контрольной группы превысило референсное значение на $28 \pm 1,2$ % ($p < 0,05$) по сравнению с положительным контролем, а в

группах Skeen-11 и OligoA-11 - на $27\% \pm 1,1\%$ ($p < 0,05$) и на 18% ($p < 0,05$), соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В ходе работы были разработаны оригинальные методы исследования действия антисмысловых олигонуклеотидов на культуру клеток меланомы мышей и на модельных животных с перевитой меланомой.
2. Полученные данные демонстрируют ингибиторный эффект тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 против матричной РНК гена Г6ФД меланомы мышей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИСССЕРТАЦИИ

1. Нарушение пролиферативной активности клеток меланомы *in vitro* и *in vivo* после таргетной терапии тиофосфатным антисмысловым олигонуклеотидом Hush-11 // К. А. Юрченко., В. В. Оберемок, И. А. Новиков и др. // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2022. – т. 12, № 3. – С. 72-77. doi:10.29039/2224-6444-2022-12-3-72-77.
2. The Phosphorothioate Antisense Oligonucleotide Hush-11 Shows Substantial Antimelanoma Effect in Mice // К.А. Yurchenko, K.V Laikova, V.V. Oberemok // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal. Plant Posters. – 2022. – A-2015. – P. 34-35. doi:10.1007/s11626-022-00671-0.
3. Efficacy of antisense oligonucleotide Hush-11 with thiophosphate in treatment of melanoma in mice / К.А. Yurchenko, V.V. Oberemok // Фундаментальные исследования - Stopper или Driver современной онкологии? – 2022. – P. 40-41. doi: 10.18137/cardiometry.2022.24.conf.21.
4. Inhibitory Effect of Phosphorothioate Oligonucleotide Complementary to G6PD mRNA on Murine Melanoma / К.А. Yurchenko, K.V Laikova, I.O. Golovkin, I.A. Novikov, A.A. Yurchenko, T.P. Makalish, V.V. Oberemok. Inhibitory Effect of Phosphorothioate Oligonucleotide Complementary to G6PD mRNA on Murine Melanoma // Curr. Issues Mol. Biol. – 2023. – Т.45. – P.3180-3192. doi: 10.3390/cimb45040207.
5. Особенности получения первичной культуры меланомы мышей / К. А. Юрченко // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2023. – т. 13, № 3. – С. 68-72. doi:10.29039/2224-6444-2023-13-3-68-72.
6. Antiproliferative Effect of 11-mer Phosphorothioate Oligonucleotide Skeen-11 on Melanoma Cells In Vitro and In Vivo / К.А. Yurchenko, V.V. Oberemok // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal. Plant Posters. – 2023. –P. 98. – A-2017. doi:0.1007/s11626-023-00795-x.
7. Prospects of targeted therapy for skin melanoma: pronounced apoptotic effect of the Skeen-11 antisense oligonucleotide on G6PD gene expression / К.А. Yurchenko, V.V. Oberemok, A.V. Kubyshekin // Medical News of North Caucasus. – 2025. – Т. 20(2). – P.155-158. doi:10.14300/mnnc.2025.20035.

8. Антисмысловые олигонуклеотиды и культуры клеток: влияние на клеточную линию меланомы и возможности регуляции фибробластов / К. А. Юрченко, Э.Т. Дегирменджи, Н. А. Волкова, Ю.С. Саенко, А. А. Юрченко, А.В. Кубышкин // III Международный форум геномных и биомедицинских технологий «От рождения до активного долголетия». – 2025. –С. 32-34.

Патенты на изобретения:

Юрченко К. А., Оберемок В. В. Применение антисмыслового олигонуклеотида 5'-AGCTATCTCCG-3' из гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы меланомы мышей в качестве противоопухолевого соединения. 2023. № 2798243.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АСО	– Антисмысловые олигонуклеотиды
тАСО	– тиофосфатные АСО
Г6ФД	– глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
АЛАТ	– аланинаминотрансфераза
АСАТ	– аспаргатаминотрансфераза
ТР	– общий белок
UREA	– мочевины
CREA	– креатинин
МК	– меланома кожи