

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского»

На правах рукописи

ЮРЧЕНКО КСЕНИЯ АНДРЕЕВНА

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

3.3.3. Патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор биол. наук, доцент

Оберемок Владимир Владимирович

Симферополь, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Злокачественная меланома и методы ее лечения	15
1.1.1. Адьювантная терапия	19
1.1.2. Неoadьювантная терапия.....	22
1.1.3. Хирургическое лечение опухоли.....	23
1.2. Роль глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при онкологических заболеваниях	25
1.3. Антисмысловые олигонуклеотиды как перспективное средство блокировки мРНК при терапии онкологических заболеваний	28
1.3.1. Доставка антисмысловых олигонуклеотидов в клетку	33
1.3.2. Фармакокинетика тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов	36
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1. Материалы.....	38
2.1.1. Оборудование	38
2.1.2. Клеточная культура.....	39
2.1.3. Лабораторные животные	40
2.2. Методы	41
2.2.1. Культивирование клеточной линии Clone M-3.....	41
2.2.2. Дизайн и синтез тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов	47
2.2.3. Исследование влияния антисмысловых олигонуклеотидов на пролиферацию клеток Clone M-3 с помощью системы xCelligence .	48
2.2.4. Оценка признаков апоптоза и клеточного цикла после воздействия антисмысловыми олигонуклеотидами.....	48

2.2.5. Перевивка клеточной линии Clone M-3 мышам для создания опухолевой модели.	50
2.2.6. Расчет площади опухолей, образовавшихся в процессе перевивки культуры клеток Clone M-3 модельным животным	50
2.2.7. Взятие образцов опухоли и внутренних органов для проведения иммуногистохимического исследования.....	51
2.2.8. Иммуногистохимическое исследование опухолевой ткани и внутренних органов мышей.	52
2.2.9 Клинический и биохимический анализ крови мышей	53
2.2.10. Перевивка клеток меланомы из образовавшейся опухоли в культуру клеток.....	54
2.2.11. Исследование влияние антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 на миграционную активность опухолевых клеток.....	55
2.2.12. Выделение суммарной клеточной РНК из культуры клеток.....	55
2.2.13 Обратная транскрипция.....	57
2.2.14. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	57
2.2.15. Электрофорез в агарозном геле	58
2.2.16. Приготовление гомогената клеток	58
2.2.17. Исследование стабильности антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 в сыворотке крови мышей и в гомогенате клеток.....	59
2.2.18. Трансфекция опухолевых клеток тиофосфатными антисмысловыми олигонуклеотидами.....	59
2.2.19. Колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток	61
2.2.20. Статистический анализ.....	63
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	64
3.1. Особенности культивирование клеточной линии меланомы мышей Clone M-3.....	64

3.2. Дизайн и результаты исследования влияния антисмысловых олигонуклеотидов на пролиферацию опухолевых клеток в режиме реального времени с помощью системы xCelligence	67
3.2.1. Результаты исследования антипролиферативной активности антисмысловых олигонуклеотидов на клеточную линию меланомы мышей Clone M-3	69
3.2.2. Результаты исследования антипролиферативной активности антисмысловых олигонуклеотидов на клеточную линию карциномы человека HEP-2	71
3.3. Апоптотические процессы в клетках меланомы Clone M-3 после воздействия антисмысловым олигонуклеотидом Skeen-11	72
3.4. Влияние антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 на клеточный цикл культуры клеток Clone M-3.....	74
3.5. Результаты исследования методом зарастания царапины	75
3.6. Сравнение влияния на жизнеспособность клеток Clone M-3 антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 с помощью трансфекции и без трансфецирующих агентов.....	76
3.7. Снижение экспрессии гена мРНК глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках меланомы мышей линии Clone M-3 под действием фрагмента антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11	78
3.8. Результаты выполнения колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток.....	79
3.9. Нуклеазная активность антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 в сыворотке крови мышей и в гомогенате клеток линии Clone M-3	81
3.10. Результаты исследования эффектов антисмысловых олигонуклеотидов Skeen-11 и OligoA-11 на опухолевой модели мышей	83
3.11. Получение сублинии клеток из опухоли меланомы мышей Clone M-3.....	87
3.12. Результаты иммуногистохимического исследования опухолей после терапии антисмысловыми олигонуклеотидами	89

3.13. Анализ токсичности тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов Skeen-11 и OligoA-11 после влияния на организм модельных животных.....	91
3.13.1. Результаты иммуногистохимического исследования внутренних органов мышей после терапии антисмысловыми олигонуклеотидами.....	91
3.13.2. Результаты биохимического анализа сыворотки крови мышей после терапии антисмысловыми олигонуклеотидами на оценку токсичности.....	96
3.13.3. Результаты клинического анализа крови мышей после терапии антисмысловыми олигонуклеотидами.....	100
РАЗДЕЛ 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	102
ВЫВОДЫ	108
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	110
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ.....	111
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	112

ВВЕДЕНИЕ

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 меланоцитарной системы организма человека [1]. Меланома кожи относится к числу высокоагрессивных злокачественных опухолей. В структуре общей онкологической заболеваемости в России МК представляет лишь 2 %. При этом данная патология составляет 12 % среди злокачественных новообразований кожи, но 65 % всех случаев смерти, вызванных онкологическими заболеваниями кожи, приходится на ее долю.

Основные инновационные разработки подходов к лечению 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 [2]. Причем поиск новых и использование современных препаратов для лечения меланомы (ниволумаб, пембролизумаб, ипилимумаб и др.), механизм действия которых направлен на торможение процесса диссеминации клеток, связан с проблемой высокой токсичности препаратов и негативного влияния на другие системы организма. Это требует проведения дальнейших исследований, направленных на новые мишени и создание более эффективных и менее токсичных 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 [3]. 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 [4]. Трансформированным клеткам злокачественных новообразований часто требуется высокий уровень NADPH для борьбы с повышенным уровнем ROS, поддержания антикатаболических процессов и синтеза биомассы опухоли. Некоторые опухолевые клетки демонстрируют “редоксовые уязвимости”: при пониженном NADPH они хуже справляются с ROS, чем нормальные клетки [5]. 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 [6].

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 [7]. Повышенная активность ПФП у раковых клеток, включая меланому, необходима для компенсации окислительного стресса и обеспечения строительными блоками их метаболизма [8].

Как и другие опухолевые 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 [9].

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

ремонттировать ДНК, синтезировать липиды и нуклеотиды, привести к гибели раковых клеток через апоптоз и активацию клеточной смерти. Таким образом, в условиях повышенного ROS ингибирование *Г6ФД* может усилить клеточный стресс и увеличить вероятность гибели раковых клеток [10]. 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 химиотерапевтические препараты). В настоящий момент исследования по ингибированию *Г6ФД* в меланоме ограничены, а поиск ингибиторов *Г6ФД* для меланомы продолжается. В основном поиск ведется в направлении малых молекул, нацеленных на активный сайт *Г6ФД*, или целевых ингибиторов, которые могут влиять на регуляцию ПФП [11].

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 формировать нестандартные изоформы белка. Учитывая преимущества АСО-подхода, которые заключаются в возможности таргетинга специфических участков мРНК *Г6ФД* и их адаптации под различные изоформы и регуляторные участки, данный подход можно считать перспективным и требующим экспериментального изучения [12].

Целевое лечение МК является актуальной задачей, направленной на коррекцию низкой избирательности действия химиотерапии и уменьшение негативных влияний на организм. Модифицированные АСО обладают возможностью программирования определенного эффекта, выраженного в блокировке экспрессии целевого гена. Исследования показывают [13], что пентозофосфатный путь и его ключевые ферменты является удобной мишенью для действия АСО, вызывая редукцию опухоли. АСО, благодаря своему исключительно целенаправленному действию, позволяют исследовать

механизмы, лежащие в основе патогенеза меланомы и на этой базе разработать эффективные препараты для ее таргетной терапии. В последнее время модифицированные АСО проявили свой потенциал в лечении разного рода заболеваний, включая онкологические.

В данной работе разрабатывается новый путь патогенетической терапии меланомы с участием модифицированных АСО 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 АСО.

Объект исследования – механизмы целевого воздействия на клеточную линию меланомы мышей Clone M-3.

Предмет исследования – эффект тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 против мРНК гена *Г6ФД*.

Цель исследования – Установить в эксперименте на культуре клеток меланомы и на лабораторных животных (мыши) механизмы действия и эффективность применения разработанной экспериментальной олигонуклеотидной терапевтической конструкции, направленной на блокировку экспрессии гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Задачи исследования

1. Изучить экспрессию целевого гена *Г6ФД* под влиянием тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 и его влияние на клеточное дыхание.

2. Определить динамику клеточной пролиферации и интенсивность апоптоза под влиянием разработанного тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11.

3. Исследовать влияние тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида 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 экспериментальной олигонуклеотидной терапевтической конструкции 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 M-3.

Была продемонстрирована эффективность тАСО Skeen-11, который приводил к значительному снижению пролиферации раковых 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 рака, ревматоидный артрит и др.).

Полученные результаты будут важными для следующих областей исследований:

- получение новых таргетных препаратов для терапии меланомы и других разновидностей рака кожи;

- развитие эффективных подходов 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.

Соблюдение этических стандартов

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целях и одобрено этическим комитетом Крымского федерального университета (протокол № 8 от 17 сентября 2020 г.).

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 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 VCl-2 показывают на улучшение прогноза лечения.

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

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.3.3. Патологическая физиология. Методы и результаты проведенного исследования соответствуют пунктам:

1. Исследование особенностей этиологических факторов, вызывающих развитие повреждения, и характера их воздействия на уровне клеток, органов и систем организма.

2. Изучение механизмов развития заболеваний, типовых патологических процессов и реакций организма на воздействие патогенных факторов, в том числе механизмов формирования патологических систем и нарушений информационного процесса, обуславливающих развитие заболеваний.

11. Разработка новых путей этиотропной и патогенетической терапии с учетом взаимодействия лечебных мероприятий с защитно-приспособительными реакциями организма.

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). 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.)

Внедрение результатов работы в практику

Имеются внедрения разработок в образовательную и научную деятельность. Отдельные положения, вошедшие в диссертационное исследование, внедрены в образовательные программы и используются в учебном процессе студентов, ординаторов, аспирантов кафедры общей и клинической патофизиологии; онкологии Ордена Трудового Красного знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», г. Симферополь. Методологические подходы культивирования и создания моделей на животных используются в научно-исследовательской работе Центральной научно-исследовательской лаборатории Ордена Трудового Красного знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», г. Симферополь.

Публикации автора по теме диссертации

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.

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Злокачественная меланома и методы ее лечения

Меланома – это злокачественное новообразование кожи, вызванное опухолевой трансформацией меланоцитов. Наряду с плоскоклеточным и базальноклеточным раком кожи относится к злокачественным опухолям кожи. Меланома не является раком, так как она происходит не из эпителиальных клеток, а из меланоцитов – высокоспециализированных клеток, которые продуцируют пигмент меланин и имеют происхождение из клеток нервного гребня [14]. Злокачественная меланома является наиболее быстро прогрессирующим и распространяющимся злокачественным новообразованием у представителей европеоидной расы. Во всем мире меланома является относительно редким заболеванием, которым страдают только 22,1 человека из 100 000 в США и 8,15 человек на 100 000 в Российской Федерации. Среднегодовой темп прироста заболеваемости меланомой составляет 3,66 %, что можно считать одним из самых высоких среди всех злокачественных опухолей, кроме рака легкого [15].

На ранних стадиях развития меланома может быть успешно вылечена хирургическим вмешательством с высокими показателями выживаемости. Но после метастазирования выживаемость пациентов значительно снижается. Для лечения метастатической меланомы, за последние 10 лет было разработано несколько новых препаратов, которые значительно улучшили краткосрочный прогноз, однако у большинства пациентов не наблюдается длительного ответа на эти методы лечения. Таким образом, для повышения точности диагностики и лечения меланомы необходимы, как новые биомаркеры, так и лекарственные мишени и таргеты, воздействующие на них [16]. По данным ВОЗ, во всем мире ежегодно регистрируется 132 000 случаев заболевания злокачественной меланомой и 66 000 смертельных исходов от злокачественной меланомы и

других форм рака кожи. Заболеваемость меланомой выражена, прежде всего, в регионах с высоким уровнем инсоляции и наличием европеоидного населения, в частности в южных районах Российской Федерации, включая Республику Крым. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями населения России в 2023 г меланома кожи встречалась примерно в 5 раз реже, чем рак кожи и составляла около 2 % в общей структуре злокачественных новообразований человека. Основная проблема в лечении меланомы заключается в том, что резекция опухолевой ткани, включая большой запас здорового участка кожи вокруг опухоли, не гарантирует отсутствие рецидива. Это связано с особенностями биологических свойств клеток, которые чрезвычайно активно мигрируют за пределы первичного очага опухоли и формируют опухоль в новом месте (метастазы) [17].

Необходимо делать упор на врождённые механизмы иммунной защиты пациента, так как именно иммунитет является гарантом устойчивой защиты от опухолевого роста. Однако опухолевые клетки приобрели успешные стратегии борьбы с иммунитетом: в частности, мимикрию со здоровыми клетками, постоянную генетическую изменчивость в ходе деления, "инактивацию" Т-киллеров. В рамках борьбы с данными стратегиями необходимо максимально ослабить опухолевые клетки путем комплексных и целенаправленных воздействий и активировать клетки иммунной системы [18].

В клинической практике внимание уделяется признакам активизации невусов, которые свидетельствуют об усилении пролиферативной активности клеток невуса или его малигнизации. В клетках меланомы кожи наиболее часто подвергаются клинически значимым изменениям приблизительно 30 генов. При этом наиболее часто подвергаются скринингу соматические мутации в гене BRAF, в частности V600E, с частотой встречаемости около 40 % [19].

Несколько факторов определяют людей с повышенным риском злокачественной меланомы кожи, это лица с меланомой в семейном анамнезе и с родинками, имеющими ряд характерных неблагоприятных признаков. Приблизительно 6-12 % меланом являются семейными, и примерно 12 %

пациентов с семейной меланомой имеют множественные первичные меланомы [20]. Помимо эндогенных факторов риска, таких как светлый тип кожи или генетическая предрасположенность (мутация гена BRAF V600E) к образованию множественных невусов, воздействие ультрафиолетового света является наиболее важным экзогенным фактором риска [21]. Последние данные в патологии и молекулярной диагностике указывают на то, что злокачественная меланома представляет собой группу различных новообразований с переменным этиопатогенезом, биологическим поведением и прогнозом [22]. Правильное хирургическое первичное вмешательство на ранней стадии достигает излечения в 80-90 %, а рецидивы возникают у 10-20 %. Лечение метастатической злокачественной меланомы значительно изменилось за последние 1-2 года в результате клинического опыта применения новых препаратов [23]. Заболеваемость первичной меланомой кожи продолжает увеличиваться с каждым годом [24]. Для лечения меланом путем удаления локальных микрометастазов используют широкое иссечение вместе с нормальной тканью. Это происходит потому, что нормальная ткань может скрывать генотипически аномальные клетки в окружающей коже или поверхностных лимфатических сосудах [25]. Радикальное вмешательство при меланоме часто сопровождается косметическим дефектом и функциональными нарушениями, связанными с распространенной глубокой раной. Тем не менее, при раннем обнаружении многие меланомы можно лечить хирургическим путем. Клетки меланомы высокоинвазивны, быстро метастазируют, а при прогрессировании заболевания прогноз выживаемости неблагоприятен [26].

Способность опухолевых клеток к инвазии в ткань дермы является критическим событием в развитии меланомы кожи и в итоге индикатором плохого прогноза для пациентов. Изучение некоторых молекулярно-биологических параметров меланоцитарных образований кожи и молекулярных процессов, связанных с приобретением инвазивного фенотипа, может способствовать раскрытию новых звеньев патогенеза меланомы и поиску дополнительных диагностических критериев [27].

Обращение к терапевтическим возможностям, таким как поиск новых мишеней для лечения метастатической меланомы, остается проблемой, требующей быстрого решения [28]. Большая часть того, что в настоящее время известно об эволюции злокачественных новообразований, получено благодаря наблюдению за клеточными изменениями в биоптатах опухоли или изменениями в ДНК опухолевых клеток [29]. Линии раковых клеток можно легко использовать для открытия лекарств и связывания геномных изменений с реакцией на лекарство.

Чтобы выбрать наилучшую терапию, клиницисты должны учитывать эффективность, побочные эффекты и физическое состояние. Комбинированная терапия более эффективна для улучшения общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования, чем монотерапия при лечении распространенных форм меланомы, хотя и ценой высокой токсичности [30].

Молекулярно-генетическое исследование меланоцитарных поражений кожи проводится для дифференциальной диагностики меланомы с невусами и другими опухолями не меланоцитарной природы, а также для определения активирующих мутаций в гене BRAF. Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) с определением состояния генов RREB1(6p25), MYB(6q23), CCND1(11q13), CEP6 устанавливает генетические нарушения, позволяет улучшить диагностику меланоцитарных поражений кожи, выявить предмеланомные процессы (невусы с пограничными диспластическими изменениями), а также провести дифференциальный диагноз между меланомой и не меланоцитарными новообразованиями. Несмотря на революционные открытия последних лет в области медикаментозной терапии метастатической меланомы, основным лечением до сих пор остается хирургическое. Это обусловлено и тем, что стоимость современного курса таргетной терапии исчисляется порой сотнями тысяч долларов. В последние годы также обнаружено, что к некоторым моноклональным препаратам клетки меланомы приобретают резистентность за счет мутаций в генах BRAF и NRAS, KIT.

Эффективность стандартной химиотерапии при метастатических формах увеальной меланомы невысокая [31].

В 2009 году было проведено обновление данных TNM Американского объединенного комитета по раку (AJCC) — система стадирования опухоли, лимфатических узлов и метастазов, и были добавлены новые прогностические факторы, имеющие клиническое значение [32]. На уровне первичной опухоли критически важными являются три фактора: толщина первичной опухоли (по шкале Бреслоу), изъязвление и скорость митозов [33]. Глубина опухоли (толщина опухоли Бреслоу) является важным фактором при стадировании. Показатели выживаемости снижаются с каждым миллиметром увеличения толщины опухоли; например, 10-летняя выживаемость снижается с 92 % при опухолях T1 (толщина ≤ 1 мм) до 50 % при меланоме T4 (толщина > 4 мм) [34]. Лекарственное лечение меланомы можно разделить на две основные группы: адьювантное и неадьювантное лечение, которые в свою очередь делятся на: таргетную терапию, иммунотерапию и химиотерапию.

1.1.1 Адьювантная терапия

Хирургическое иссечение является методом выбора для большинства пациентов с локорегионарной меланомой кожи и в большинстве случаев является излечивающим. Однако у некоторых пациентов впоследствии возникает рецидив с диссеминированным заболеванием. Специфические клинические особенности первичной опухоли и регионарных лимфатических узлов связаны с повышенным риском рецидива заболевания [35].

Системная терапия играет важную роль в адьювантной терапии и при неоперабельных опухолях. В зависимости от показаний и молекулярного профиля опухолевой ткани можно использовать ингибиторы иммунных контрольных точек или целевые ингибиторы киназ, что может привести к значительному увеличению времени жизни больных меланомой [21]. Также при адьювантном лечении можно использовать различные методы, такие как:

лечение интерфероном альфа, биохимиотерапия, иммунотерапия с помощью вакцин; лекарственные препараты, которые можно принимать как одиночно, так и в виде комбинированной терапии и конечно же радиационная терапия [36].

Лечение меланомы с помощью адьювантной терапии стало актуальным в 2010 году благодаря успешной блокаде иммунных контрольных точек (ICB) с помощью антител против CTLA-4 и анти-PD-1 и одновременным результатам селективного ингибирования пути киназы MAP с помощью ингибиторов BRAF и MEK. Эти методы лечения (сначала в виде монотерапии, а затем и в виде комбинаций) впервые показали безопасность и клиническую активность у пациентов с нерезектабельной стадией III и метастатической стадией IV [37, 38].

Предшествующими препятствиями для разработки адьювантной терапии меланомы на ранних стадиях были предельная эффективность адьювантной терапии интерфероном- $\alpha 2b$ (ИФН) и значительная токсичность этого интерферона и других видов лечения, таких как ипилимумаб с антителом против CTLA4. Кроме того, относительно более низкая частота прогрессирования заболевания на более ранних стадиях заболевания по сравнению с заболеванием на стадии III требует уровня эффективности, исторически считавшегося недостижимым для системных препаратов [39]. Высокие дозы интерферона-альфа-2b — единственный подход, одобренный для адьювантной терапии меланомы; улучшение безрецидивной выживаемости отмечено почти во всех опубликованных исследованиях и метаанализах [33]. Интерферон-альфа-2b следует применять только для пациентов с изъязвленной меланомой, и с меланомой без метастазов, в крайнем случае с небольшим количеством метастазов [40].

Адьювантные препараты ипилимумаб (анти-CTLA-4) и ниволумаб (анти-PD-1) улучшают безрецидивную выживаемость пациентов с меланомой III стадии [35]. Пембролизумаб (ингибитор PD-1) показал хорошие результаты по параметрам DMFS и RFS у пациентов с удаленной меланомой II стадии [41].

Доклиническая работа предполагает, что неоадьювантное применение ингибиторов контрольных точек может быть лучше, чем адьювантная терапия [42, 43].

Что касается лечения метастатической меланомы, то за последние 10 лет было разработано несколько новых препаратов, которые значительно улучшили прогноз пациентов с метастатической меланомой, однако у большинства пациентов не наблюдается стойкого ответа на эти методы лечения. Таким образом, необходимы новые биомаркеры и лекарственные мишени для повышения точности диагностики и лечения меланомы [44]. Многие из этих препаратов проходят испытания у пациентов с более ранними стадиями заболевания, а недавние адьювантные исследования продемонстрировали улучшение безрецидивной выживаемости после операции по поводу меланомы III стадии [45] (рис. 1.1).

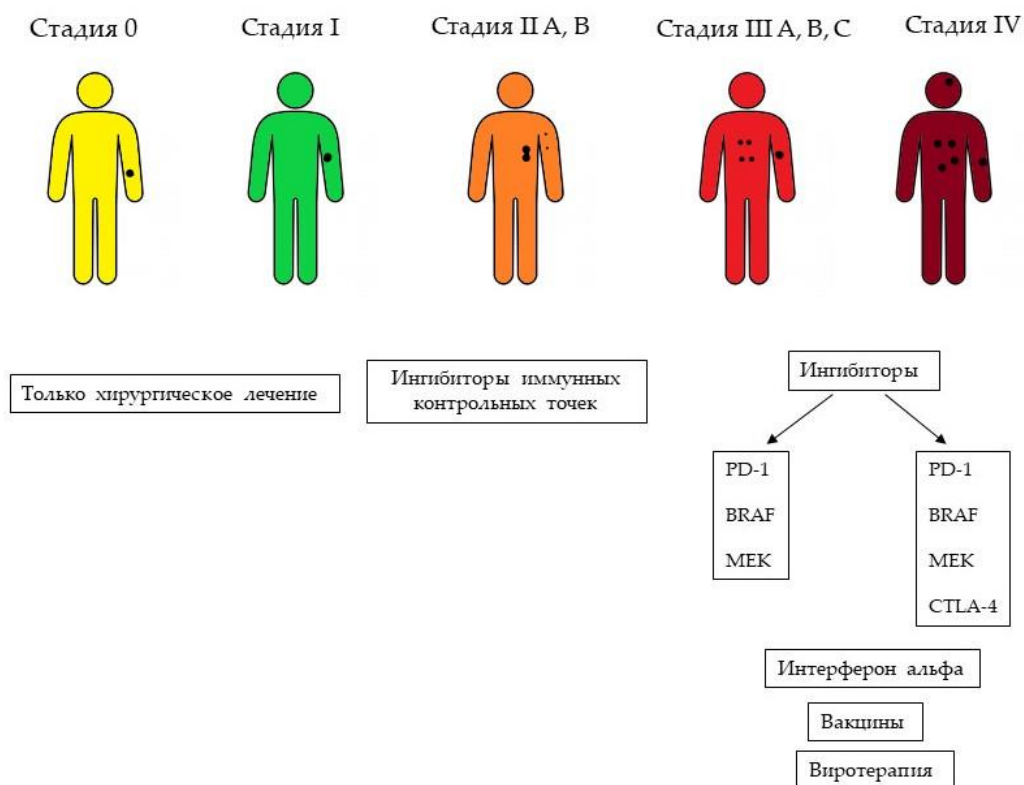


Рисунок 1.1 – Основные лекарственные агенты для лечения меланомы на разных стадиях.

Первым препаратом, который в рандомизированных исследованиях показал принципиальную возможность увеличения продолжительности жизни пациентов с метастатической меланомой, стал ипилимумаб. Этот препарат является представителем нового направления в биотерапии опухолей, нацеленным на преодоление толерантности иммунной системы. Препарат является рекомбинантным человеческим моноклональным антителом, селективно связывающимся с антигеном 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA-4), который является одним из ключевых регуляторов (рецептором) активации Т-лимфоцитов. Результаты исследований ипилимумаба были подробно представлены профессором Л.В. Демидовым [46]. Однако, препарат обладает выраженной токсичностью для иммунной системы, пищеварительного канала, органов нервной и эндокринной систем [47].

1.1.2 Неoadьювантная терапия

Неоадьювантная терапия меланомы является областью активных исследований, изучающих терапевтические вмешательства с использованием различных схем лечения [48]. Неоадьювантное лечение может улучшить результат и хирургического вмешательства, но баланс между эффективностью лечения и токсичностью уже вызывает затруднения при использовании комбинированных ингибиторов контрольных точек иммунного ответа до операции [49]. Неоадьювантная терапия в настоящее время является общепринятым стандартом лечения многих пациентов с раком молочной железы [50], колоректальным раком [51] и раком желудка [52], и имеет преимущества перед адьювантным. Во-первых, он обеспечивает оценку противоопухолевой эффективности посредством окончательной резекции образца. Во-вторых, неоадьювантная терапия потенциально устраняет клинически скрытое заболевание, предотвращая или отсрочивая его рецидив. Наконец, у неоадьювантной терапии есть потенциал для уменьшения нерезектабельной опухоли, для возможности хирургического вмешательства, которое, кроме того,

может быть не инвалидизирующим и даст возможность частично сохранить часть прилежащих тканей и органов [53]. Если брать во внимание пациентов с III метастатической стадией меланомы, адьювантная терапия имеет плохие прогнозы в лечении, в то время как неоадьювантная терапия улучшает лечение пациентов за счет более раннего начала системной терапии [54]. Результаты лечения пациентов, участвовавших в серии исследований, показали высокую эффективность неоадьювантной терапии. Данные свидетельствуют о том, что неоадьювантная терапия интерфероном-альфа-2b проявляет свои эффекты через иммуномодулирующие, а не прямые цитотоксические механизмы у пациентов с меланомой стадии ПИВ-С, и оказывает противоопухолевое действие у большей части пациентов с регионально распространенным заболеванием, что доказано в исследованиях отдаленных метастазов [55]. Перспективность неоадьювантной иммунотерапии подтверждается высокими показателями патологического ответа опухоли (лекарственного патоморфоза), а также устойчивостью этих ответов, что делает излечение более достижимым по сравнению с другими формами системной терапии. Кроме того, исследования неоадьювантной терапии позволяют оценить радиологические и патологические реакции и эффект биопрепаратов до и во время системной терапии [56].

1.1.3 Хирургическое лечение опухоли

Различают 2 этапа диагностики и хирургического лечения меланомы. Сначала выполняют биопсию для получения гистологического подтверждения диагноза; это может быть пункционная или биопсия с узким полем 1-2 мм. Окончательный выбор хирургического подхода будет зависеть от результатов гистологического исследования. Хирургическое иссечение ранее морфологически верифицированной меланомы выполняется путем повторного иссечения с хирургическими краями 0,5–2 см, в зависимости от толщины по Бреслоу [57, 58]. Однако многие авторы не рекомендуют частичную биопсию у пациентов с меланомой из-за более высокого риска ошибочного диагноза [59].

Хирургия остается лучшим вариантом лечения локализованной инвазивной меланомы с общей 5-летней выживаемостью 92% [60]. При проведении широкого местного иссечения образец должен доходить до уровня подлежащей мышечной фасции. В настоящее время нет доказательств того, что иссечение подлежащей фасции приводит к улучшению исхода [61]. Для крупной меланомы хирургические края *in situ* > 0,5 см могут быть необходимы для получения гистологически отрицательных краев (когда в краях резекции не обнаруживаются опухолевые клетки). Полость в 0,5 см при лентиго-меланоме *in situ* на голове и шее часто приводит к неполному иссечению [62]. Глубина иссечения, включая подкожный жир, обычно достаточна для меланомы *in situ* [63, 64].

Наиболее часто при иссечениях меланомы применяется хирургия Мооса. В литературе существуют разногласия относительно использования операции Мооса для лечения меланомы *in situ*. Операция Мооса дает преимущество полной оценки края; однако различия в используемых хирургических и лабораторных методах затрудняют сравнение результатов [43]. Операция по методу Мооса подходит для лечения рака кожи с высоким риском рецидива и когда сохранение тканей имеет важное эстетическое и функциональное значение [65, 66]. Выполняется путем удаления тонкого края ткани по окружности вокруг и вглубь клинических краев кожной опухоли. Образец обычно удаляют со скосом под углом 45 градусов для облегчения обработки ткани. Затем его быстро замораживают и делают срезы в криостатном микротоме, что позволяет быстро уплотнить ткани и сделать срезы для быстрой (срочной) оценки гистологического строения (от 15 до 30 минут). Срез ткани в горизонтальном направлении позволяет исследовать под микроскопом практически 100% края ткани (периферийный и глубокий края). Процесс повторяется до тех пор, пока у опухоли не появятся отрицательные гистологические края [67].

Разница в частоте местных рецидивов в пользу микрографической хирургии Мооса справедлива для первичного плоскоклеточного рака кожи и губы (3,1 % против 10,9 %), для плоскоклеточного рака уха (5,3% против 18,7 %),

для локально рецидивирующего (ранее леченного) плоскоклеточного рака (10,0 % против 23,3 %), для плоскоклеточного рака с периневральным поражением (0 % против 47 %), для плоскоклеточного рака размером более 2 см [68].

Послеоперационные осложнения могут вызвать нежелательную задержку последующего лечения, поскольку такие осложнения, как расхождение швов раны и инфекция, могут быть противопоказаниями к адьювантной терапии. Недавние исследования показали, что послеоперационные осложнения могут не только отсрочить дальнейшее запланированное лечение, но даже сделать его невозможным [69 - 72]. В этих исследованиях клиницисты пришли к выводу, что своевременное начало соответствующего лечения способствует общей выживаемости [70, 71].

1.2. Роль глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при онкологических заболеваниях

Дифференциальный метаболизм глюкозы между нормальными и опухолевыми клетками наблюдал Отто Варбург в начале 19-го века, что раскрыло исследования метаболизма рака [73]. Ген, кодирующий *Г6ФД*, принадлежит X-хромосоме и локализован вблизи теломерной области дистального плеча [74].

Основной характеристикой многих раковых заболеваний являются процессы, связанные с энергетическим обменом, такие как гликолиз и повышенное поглощение глюкозы, а также снижение окислительного метаболизма. Пентозофосфатный путь также является важным метаболическим путем наряду с гликолизом. Пентозофосфатный путь генерирует пентозофосфаты, которые поддерживают высокую скорость синтеза нуклеиновых кислот, что имеет решающее значение для раковых клеток. Он также обеспечивает НАДФН, необходимый как для синтеза жирных кислот, так и для выживания клеток в стрессовых условиях с высоким уровнем внутриклеточных активных форм кислорода. Как и в случае с гликолизом,

большинство ферментов пентозного пути в клетках злокачественной опухоли не регулируются [75, 76].

Одним из центральных ферментов пентозофосфатного пути (ПФП) является *Г6ФД* [77]. Недавние исследования с полидактином (природная молекула, обнаруженная в *Polygonum cuspidatum* и других растениях) продемонстрировали, что полидактин напрямую ингибирует *Г6ФД*, вызывая окислительно-восстановительный дисбаланс. Это, в свою очередь, приводит к стрессу эндоплазматического ретикулума, остановке клеточного цикла и апоптозу и вызывает значительное снижение выживаемости раковых клеток наряду со снижением уровня НАДФН [78]. Данные исследования клеток *in vitro* показали, что подавление *Г6ФД* нарушает миграцию клеток, инвазию и эпителиально-мезенхимальный переход. Кроме того, нокдаун *Г6ФД* активирует путь JNK, который затем блокирует ось АКТ/GSK-3 β /Snail, индуцируя экспрессию E-кадгерина и транскрипционно регулируя экспрессию MGAT3, тем самым способствуя N-гликозилированию E-кадгерина [79]. Кроме того, было показано, что экспрессия и активность *Г6ФД* положительно коррелирует с экспрессией мРНК и белков циклинов D1 и E, p53 и S100A4. Эти данные свидетельствуют о том, что *Г6ФД* может регулировать клеточный цикл посредством влияния на эти факторы, тем самым косвенно регулируя рост меланомы. Повышенная экспрессия p53 наблюдается у клеточной линии A375, что коррелирует с высокой активностью *Г6ФД* и позволяет предположить, что белок p53 стимулируется *Г6ФД* [78]. Снижение уровня *Г6ФД* в клеточных линиях меланомы приводит к снижению фосфорилированного STAT5, важного для неконтролируемого роста клеток. Экспрессия белка при соотношении STAT3/5 и фосфорилированном соотношении STAT3/5 снижена в клетках меланомы с дефицитом *Г6ФД*. Отсутствие *Г6ФД* в клетках меланомы мыши усиливает апоптоз за счет повышения уровня FAS и снижения уровней Bcl-2 и Bcl-xL [80]. Таким образом, *Г6ФД* играет чрезвычайно важную роль в управлении клетками меланомы, участвуя во многих каскадах биохимических

реакций, включая антиапоптоз и быстрый рост, что обеспечивает формирование агрессивных биологических свойств опухоли.

Растет количество исследований, демонстрирующих, что экспрессия *Г6ФД* активируется при некоторых типах рака и способствует прогрессии опухоли [81]. Ингибирование *Г6ФД* стало потенциальной терапевтической стратегией для лечения рака, например, применение низкомолекулярного ингибитора *Г6ФД* RRX-001 в клетках колоректального рака и злокачественной опухоли печени [82 - 84]. *Г6ФД* находится под сложным регуляторным контролем и имеет центральное значение для многих клеточных процессов [85].

Снижение активности *Г6ФД* или дисфункция ПФП препятствует нормальной пролиферации клеток [78, 86 - 88]. Быстрорастущие опухолевые клетки развили множество механизмов активации *Г6ФД* для поддержки клеточных потребностей в продукции NADPH и синтезе жирных кислот и нуклеиновых кислот. Например, активация проонкогенных путей усиливает активность *Г6ФД*, включая Ras, Src и PI3K/Akt [89 - 91]. NAD-зависимая деацетилаза Sirtuin 2, кодируемая геном SIRT2, способствует продукции NADPH и росту лейкозных клеток за счет деацетилирования *Г6ФД* [92]. Белок теплового шока 27 (HSP27 или HSPB1) усиливает связывание между *Г6ФД* и SIRT2, что приводит к деацетилированию и активации *Г6ФД*. HSPB1 активирует *Г6ФД* через SIRT2 для поддержания клеточной продукции NADPH и пентозы в клетках глиомы [93].

Активация *Г6ФД* является ответом первой линии против окислительного стресса в раковых клетках [94]. Опухолевые клетки, полученные от пациентов с плоскоклеточным раком грудной клетки пищевода, используют ПФП для удовлетворения потребности в быстром росте и для развития устойчивости к химиотерапии [95, 96]. Окисление *Г6ФД*, посттрансляционная модификация или аллостерические взаимодействия являются прямым результатом ингибирования NADPH во время острого перенаправления глюкозы, вызванного стрессом [90, 97]. Это может объяснить, почему *Г6ФД* важен для окислительно-восстановительного метаболизма и необходим для быстро пролиферирующих

клеток. В метаболизме клеток рака мочевого пузыря наблюдается повышенная экспрессия *Г6ФД* и синтазы жирных кислот. Это способствует усилению метаболизма глюкозы с помощью ПФП и усилению синтеза жирных кислот [98]. Гиперактивация ПФП может действовать проканцерогенно на клетки рака мочевого пузыря [99]. Ослабление пути *Ras-TAp73-Г6ФД* с помощью ЗА приводит к ингибированию *Г6ФД*, что приводит к замедлению пролиферации клеток рака мочевого пузыря. Это указывает на то, что путь *Ras-TAp73-Г6ФД* может быть мишенью для ингибирования *Г6ФД*. Гиперэкспрессия *Г6ФД* коррелирует с неблагоприятным прогнозом и была определена в качестве нового биомаркера острого миелоидного лейкоза, как определено анализом базы данных АТЛАС генома рака. Ингибирование *Г6ФД* индуцирует химиотерапевтическую цитотоксичность *in vitro* и *in vivo* в клетках ОМЛ, демонстрируя, что высокая экспрессия *mTORC1* может быть мишенью для ингибирования *Г6ФД*. В отличие от исследований раковых клеток, метаболический переключатель также важен для развития нейронов [100].

Однако роль *Г6ФД* в развитии рака в основном зависит от его метаболической функции по выработке НАДФН для снижения АФК. Вопрос о том, способствует ли *Г6ФД* развитию рака независимо от его метаболической и ферментативной функции [54].

1.3. Антисмысловые олигонуклеотиды как перспективное средство блокировки мРНК при терапии онкологических заболеваний

В настоящее время все большую популярность приобретает сравнительно новый класс низкомолекулярных препаратов, состоящих из антисмысловых олигонуклеотидов. Антисмысловые олигонуклеотиды – короткие одноцепочечные полимеры, основанные на структуре ДНК или РНК и синтезированные *in vitro*, подавляют экспрессию целевых генов путем связывания со специфичной для данной последовательности РНК-мишенью. Функциональная активность и селективность в действии АСО в значительной

степени зависят от комплементарности азотистых оснований между целевой мишенью и АСО. Это простое и природное свойство нуклеиновых кислот создает интересные перспективы, в рамках которых ученые могут разрабатывать различные методы терапии на основе АСО. За последние 50 лет запланированные и реализованные приложения в области нанотехнологий антисмысловых нуклеиновых кислот дали потрясающие результаты и бросили новые вызовы для дальнейших разработок, иллюстрируя сущность постгеномной эры [101, 102].

Антисмысловые олигонуклеотиды обещают терапевтический эффект с небольшими токсическими эффектами благодаря их высокой селективности. Доклинические исследования предоставили доказательства антисмысловых эффектов *in vitro* и *in vivo*, а клинические испытания фазы I продемонстрировали безопасность, осуществимость и активность антисмысловых олигонуклеотидов для лечения рака.

В настоящее время перспективным направлением лечения различных заболеваний является использование препаратов на основе антисмысловых технологий. Несколько препаратов на основе антисмысловых технологий (мипомерсен, нусинерсен, этеплирсен и др.) уже разработаны и одобрены к применению [103, 104]; однако, в то время как еще несколько препаратов проходят клинические испытания [90], на рынке таких препаратов для лечения рака нет. Активное изучение патогенеза различных заболеваний, в том числе рака, и лежащих в их основе молекулярных путей открывает множество мишеней для терапевтического вмешательства. Большое преимущество антисмысловых технологий заключается в их специфичности, поскольку АСО избирательно блокируют или разрушают мРНК-мишень, тем самым снижая экспрессию белка [105, 106]. Правильный подбор длины и модификаций АСО приводит к высокой эффективности и стабильности [107], а в нашей предыдущей работе с насекомыми было показано, что 11-мерные АСО являются наиболее оптимальными и эффективными [102, 108, 109]. АСО, они специфически нацелены на генетическую основу рака и особенно полезны для ингибирования

экспрессии онкогенов, белковые продукты которых недоступны для малых молекул или ингибирующих антител [110].

Молекулярные и биологические эффекты антисмысловых олигонуклеотидов зависят от сиквенса азотистых оснований и их последующего комплементарного спаривания с мишенью, что позволяет, таким образом, учитывать генетику среднестатистического пациента, основываясь на консервативных последовательностях. В настоящее время один антисмысловой препарат против различных злокачественных образований находится в III фазе клинических исследований, а ещё несколько – на более ранних стадиях разработки. Кастирсен – химерный 2'-МОЕ-модифицированный антисмысловой препарат, показал многообещающие результаты в нескольких исследованиях фазы II, и в настоящее время изучается в фазе III клинического испытания при раке предстательной железы и раке лёгкого [106].

Растущее количество доказательств продемонстрировало, что экспрессия *Г6ФД* активируется при некоторых типах рака и способствует прогрессированию опухоли [111]. Повышенные уровни экспрессии мРНК *Г6ФД* являются предикторами неблагоприятных клинических исходов у онкологических больных, включая повышенную лекарственную устойчивость, миграцию или пролиферацию опухолевых клеток [112]. Ингибирование *Г6ФД* стало потенциальной терапевтической стратегией для лечения рака, например, применение низкомолекулярного ингибитора *Г6ФД* RRX-001 в клетках колоректального рака и гепатокарциномы [84, 111 - 113].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый на сегодняшний день в области лекарственного лечения метастатической меланомы (таргетная терапия, иммунотерапия), основным методом лечения регионарного метастазирования остается хирургический [114].

Безусловно, нужно понимать, что достичь регионарного контроля посредством только одного метода можно далеко не всегда. Тем не менее из-за отсутствия надежных средств профилактики регионарного метастазирования хирургический метод лечения часто используется самостоятельно. В настоящее

время до пор сих нет четких рекомендаций в вопросе оптимальных границ резекции при первичной меланоме области, неправильно подобранная ширина и глубина резекции может привести к неблагоприятному исходу [115]. Подобные исследования не осуществимы в принципе, так как практически невозможно отследить миграцию раковых от места локализации первичной меланомы и которые способны вызвать диссеминацию опухоли [25].

В настоящее время известные нам противомеланомные препараты местного действия практически не разработаны. По нашему мнению, совокупный эффект предлагаемого тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида в сочетании со специальной формулой мази обеспечит выраженный терапевтический эффект в сочетании с низкой токсичностью [26]. Кроме того, применение АСО-препаратов на основе консервативных последовательностей не требует обязательного иммунофенотипирования пациента, что также дает преимущество, поскольку взятие биопсийного материала при меланоме не всегда представляется возможным.

Как итог, смертность от меланомы происходит чаще всего после нескольких хирургических операций. Следовательно, на лечение есть время, которое можно потратить более эффективно. По нашему мнению, АСО, которые можно использовать в виде целевых мазей или кремы, дают особую надежду на устранение раковых клеток в области вблизи очага опухоли, как до, так и после операции, чтобы задержать или даже предотвратить развитие первичной опухоли в метастазы и проникновение их в лимфатические узлы. На более поздних стадиях антисмысловые олигонуклеотиды обязательно будет необходимо комбинировать с другими методами лечения.

Кожная доставка антисмысловых олигонуклеотидов обеспечивает более простую и менее стрессовую альтернативу внутривенным инъекциям с перспективным потенциалом при лечении кожных заболеваний. Кожу удобно обрабатывать и она является идеальной целью для сайленсинга целевых генов, разработанных для лечения кожных заболеваний, включая рак кожи, псориаз и атопический дерматит [116]. Кроме этого, по сравнению с другими органами,

происходящие с кожей изменения легче и намного быстрее оценить визуально или при помощи биопсии кожи. Кроме того, по сравнению с другими способами доставки, кожа имеет относительно меньше нуклеаз.

Применение препаратов антисмысловой терапии в форме кожных мазей весьма комфортно для пациента и актуально также тем, что позволяет ограничиваться зоной поражения, уменьшая вероятность локальной или системной токсичности [77]. Местное использование тиофосфатных АСО позволяет ограничить ее пораженным участком, снижая вероятность, например, тромбоцитопении, вызванной тиофосфатными олигонуклеотидами [116].

Схема действия тиофосфатных олигонуклеотидов показана на рисунке 1.2.

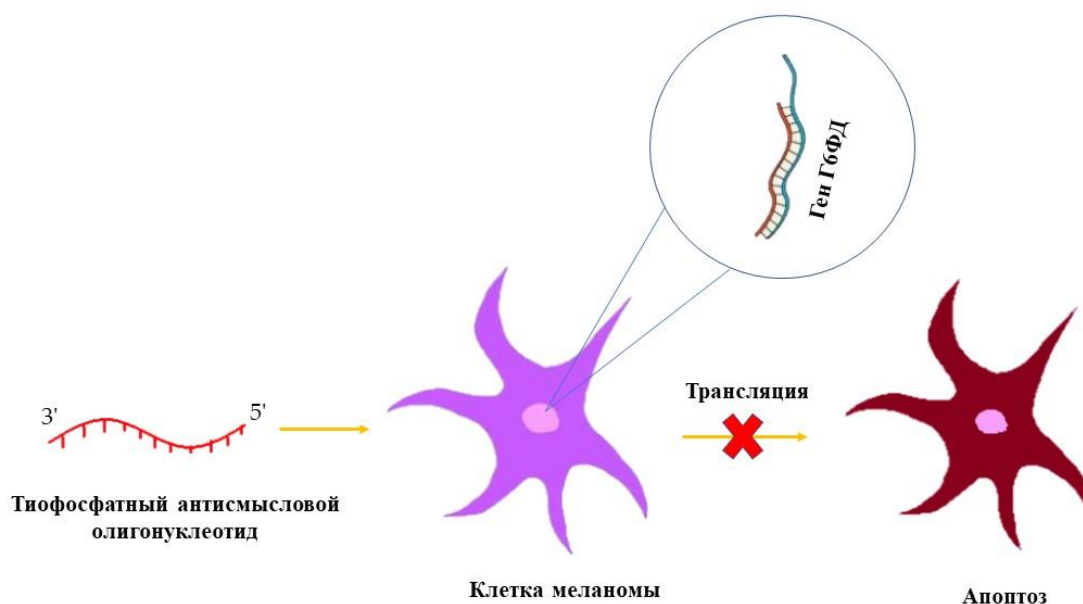


Рисунок 1.2 – Схема действия антисмысловых олигонуклеотидов.

Антисмысловые олигонуклеотиды могут явиться перспективным средством блокировки анти-апоптозного гена сурвивина, который экспрессируется только в клетках злокачественных опухолей, жировой ткани и на этапе эмбрионального развития и является одним из белков необходимых раковой клетке для избегания апоптоза и иммунного надзора [117]. Наконец,

АСО способны разрушать 5,8S рибосомальную РНК, необходимую для биосинтеза белка, сверхэкспрессия гена которой наблюдается при многих видах онкологии [118]. Большинство клинически протестированных антисмысловых противоопухолевых тиофосфатных олигонуклеотидов показано, что они имеют приемлемый профиль безопасности и начальную противоопухолевую эффективность у людей. Предполагается, что с созданием и тестированием новых поколений антисмысловых препаратов ожидается, что терапевтическая эффективность и профили безопасности этих новых агентов в будущем будут значительно улучшены [119].

1.3.1 Доставка антисмысловых олигонуклеотидов в клетку

Долгое время было принято считать, что олигонуклеотиды и ДНК не проникают через мембраны эукариотических клеток. Однако, первые эксперименты с клеточными культурами, а позднее – и *in vivo* – показали, что при добавлении к клеткам нуклеиновых кислот (НК), в отсутствие каких-либо трансфицирующих агентов, способны проявлять специфическую биологическую активность, воздействуя на функции клеточных РНК и ДНК. Известно, что клетки злокачественных опухолей имеют генные мутации и развивающуюся способность к эндоцитозу. Их поглощение ДНК может отличаться от нормальных клеток; они могут получать ДНК непосредственно из окружающей среды [120].

Несмотря на активные исследования в области фармакокинетики и биологической активности нуклеиновых кислот до сих пор нет единого мнения в вопросе о механизмах их проникновения через мембраны клеток. Хотя для доставки генетического материала к клеткам можно применять системный внутривенный путь, чаще используются местные методы доставки, такие как хирургический, кожный, с помощью катетеров с ультразвуковым и компьютерным томографическим контролем [121].

Было высказано предположение, что олигонуклеотиды проникают в клетки по пути эндоцитоза. Олигонуклеотиды получают доступ к своим внутриклеточным мишеням в основном посредством эндоцитоза, но только часть из них достигает своих целей, поскольку доставка требует функциональной синергии клеточного захвата и внутриклеточного переноса, если говорить о рецепторно-опосредованном эндоцитозе. Поэтому считается необходимым повышение концентрации и дозы терапевтических олигонуклеотидов, для достижения нужного эффекта [122].

Процесс клеточного поглощения тиофосфатных АСО состоит в основном из двух стадий: 1) адсорбции на клеточной поверхности (в данном случае на клеточных мембранах); 2) внутриклеточного переноса груза [123]. Согласно современным представлениям жидкофазный эндоцитоз соответствует поглощению клеткой крупных объемов внеклеточной жидкости, при этом концентрация растворенных веществ, попадающих в образуемую эндосому, остается неизменной по отношению к концентрации во внеклеточном пространстве. Этот процесс принято считать малоэффективным и неспецифическим [124]. В случае адсорбционного эндоцитоза перед интернализацией происходит концентрирование поглощаемых соединений на поверхности клетки.

Основным преимуществом АСО является их гидрофобность и взаимодействие с поверхностными белками, что позволяет им проникать в клетки независимо от наночастиц, липосом или конъюгации с проникающими в клетку пептидами [125].

С точки зрения доставки НК в клетки их попадание в полость лизосом нежелательно, поскольку в этом случае наиболее вероятно большая часть поглощенных клеткой НК будет гидролизована под действием лизосомальных ферментов. Таким образом, одной из стратегий повышения эффективности терапевтических олигонуклеотидов является усиление эндолизосомального ускользания, что также может обеспечить эффективную активность олигонуклеотидов в более широком диапазоне типов клеток [122].

При использовании внутрикожных инъекций, кератиноциты и дендритные клетки способны эффективно поглощать ДНК *in vivo*, поэтому кожная ткань тоже представляет собой привлекательную мишень для генной терапии [126].

Проникновение антисмысловых олигонуклеотидов в клетку осуществляется посредством эндоцитоза (рис. 1.3).

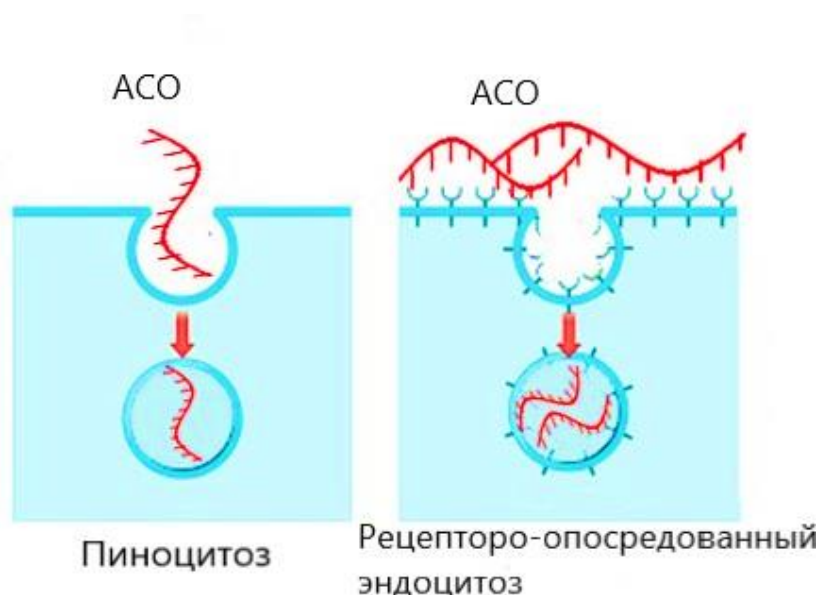


Рисунок 1.3 – Проникновение антисмысловых олигонуклеотидов в клетку посредством эндоцитоза.

Если говорить о модифицированных одноцепочечных олигонуклеотидах, вводимых интеркальными инъекциями в цереброспинальную жидкость, они широко распределяются в центральную нервную систему (ЦНС). Подавляющее большинство внутриклеточных олигонуклеотидов системно или в ЦНС распределяются быстро, всего через несколько часов после введения, и этому способствуют механизмы быстрого эндоцитозного поглощения. Как системно, так и в тканях ЦНС клетки по-разному поглощают олигонуклеотиды. Было показано, что конъюгация трехантенных GalNAc-лигандов, которые направляют АСО или siRNA к клеточно-специфическим эндоцитотическим рецепторам на гепатоцитах, изменяет распределение и усиливает активность мишеней в гепатоцитах. Дальнейшее понимание везикулярной сортировки и внутриклеточный трафик олигонуклеотидов может обеспечить существенное

улучшение дизайна и конечной эффективности антисмысловых олигонуклеотидов в будущем. Большая часть внутриклеточного распределения олигонуклеотидов после системного или местного введения происходит быстро всего через несколько часов после введения, чему способствуют механизмы быстрого эндоцитотического поглощения. Дальнейшее понимание внутриклеточного переноса олигонуклеотидов может обеспечить дальнейшие усовершенствования конструкции и максимальной эффективности антисмысловых олигонуклеотидов в будущем [127].

1.3.2 Фармакокинетика тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов

Фармакокинетика АСО широко изучалась, они быстро распределяются по всем тканям *in vivo* [127, 128]. Тиофосфатные антисмысловые олигонуклеотиды (тАСО) первого и второго поколения широко распространены во всех периферических тканях. Самые высокие концентрации тАСО обнаруживаются в печени, почках, селезенке, лимфатических узлах и костном мозге без заметного распределения в головном мозге [129]. Более того, они не только распределяются по тканям, но и накапливаются внутри клеток в тканях [130]. Не тАСО, которые не, по-видимому, быстро выводятся с мочой [131]. Эта разница в распределении в тканях, по-видимому, в значительной степени обусловлена взаимодействием с белками плазмы.

Таким образом, фармакокинетические исследования тАСО показывают, что они хорошо всасываются при парентеральном введении, широко распределяются во всех периферических тканях, не проникают через гематоэнцефалический барьер и выводятся в основном за счет медленного метаболизма. В целом их фармакокинетические свойства зависят скорее от химического взаимодействия со средами, чем от последовательности [132].

АСО, содержащие тиофосфатный остов, в значительной степени связываются с белками плазмы ($\geq 85\%$) [96, 133], при этом альбумин является белком, который, по-видимому, связывает наибольшее количество препарата у большинства видов, включая человека. Это предотвращает потерю препарата при почечной фильтрации и, тем не менее, способствует поглощению тканями [134]. Связывание с белками плазмы важно учитывать при расчете клинически значимых доз АСО.

Фармакокинетические свойства и биораспределение олигонуклеотидов в значительной степени зависят от химии остова и, таким образом, не зависят от последовательности в пределах химического класса. Подавляющее большинство внутриклеточных олигонуклеотидов системно или в ЦНС распределяются быстро, всего через несколько часов после введения, и этому способствуют механизмы быстрого эндоцитозного поглощения. Как системно, так и в тканях ЦНС клетки по-разному поглощают олигонуклеотиды [135].

Антисмысловые препараты первого и второго поколения метаболизируются нуклеазами, а не системами оксидаз типа цитохрома Р450, с помощью которого метаболизируются обычные липофильные низкомолекулярные препараты. АСО не являются ни субстратом изоферментов цитохрома Р450, и не индуцируют или ингибируют его активность в клинически значимых концентрациях. Опосредованное экзонуклеазами расщепление АСО, которое является основным путём метаболизма и клиренса тиофосфатных олигодеоксинуклеотидов первого поколения, вторично для АСО второго поколения. Ограничивают экзонуклеазную активность два фрагмента: один метоксиэтил на 3'-конце и другой метоксиэтил на 5'-конце [136].

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

2.1.1 Оборудование

Оборудование для синтеза ДНК-олигонуклеотидов: ДНК-синтезатор ASM-800 (Биоссет, Россия), Спектрофотометр NanoDrop (ThermoFisher Scientific, США), Роторный испаритель Concentrator Plus (Eppendorf, Германия), Препаративный высокоэффективный жидкостной хроматограф Azura P6.1L с UVD-детектором (Knauer, Германия).

Оборудование для проведения полимеразной цепной реакции и проведения клеточных исследований: ПЦР-анализатор LightCycler96 (Roche, Швейцария), Проточный цитофлуориметер Guava Muse (Luminex, США), УФ-трансиллюминатор ECX-F20.M (Vilber Lourmat, Франция), Бокс микробиологической безопасности II класса Neoteric (Ламинарные системы, Россия), Модуль анализа цитотоксической активности в реальном времени xCELLigence RTCA DP Analyzer (ACEA Biosciences, Inc., США; MALDI-TOF масс-спектрометр VastoSCREEN (Литех, Россия); Модуль мультиплексной флуоресцентной визуализации клеточных культур с регистрацией изображения CELENA S (Logos Biosystems, Южная Корея), Спектрофотометр NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, США), Счётчик клеток Luna-II (Logos Biosystems, Южная Корея), Холодильник глубокой заморозки Forma 900 Series -86 °C Upright Ultra-Low Temperature Freezers (Thermo Scientific, США), Лиофилизатор FreeZone 2,5L с вакуумным насосом (Labconco, США), Модуль получения воды I типа Direct-03 UV (Merck Millipore, США), Автоклав 2540EL (Tuttnauer, Израиль), CO₂-инкубатор 5810E (Nuair; США), Инвертированный микроскоп СКХ 53 (Olympus, Япония), Центрифуга SL8 (Thermo Scientific, США), Планшетный ИФА ридер Infinite® F50 and Magellan™ (Tecan, USA).

Для проведения микроскопических исследований: Специализированный компьютерный комплекс MICRO-C4-2200: микроскоп OlympusCX-31 с объективами^{^^} 4x Plan 10x x/0,25, Plan 40x x/0,65, ^{^/0,17}, цифровой фотоаппарат Olympus C 5050Z, персональный компьютер и принтер для получения, обработки, архивирования и печати цифровых микрофотографических изображений, Электронный микроскоп ПЭМ-125 Selmi, Ультратом УМТП-7 (Суммы).

Для выполнения иммуногистохимических исследований: станция вырезки с верхней системой освещения и нижней вытяжной системой, Leica EG1150 модульный центр для заливки в парафин, ротационный микротом с ручным приводом Leica RM2255, держатели для образцов и стандартных кассет, водяная баня для расплавления срезов Leica HI1210, микроскоп сканирующий Leica Aperio CS2, криостат Leica CM1950 UV со встроенной УФ лампой.

2.1.2 Клеточная культура

Клетки меланомы мышей линии Clone-M3 были получены в Дальневосточном федеральном университете, школе биомедицины, лаборатории биомедицинских клеточных технологий города Владивосток.

Морфология: эпителиоподобная.

Способ культивирования: монослойный (рис. 2.1.).

Условия культивирования: среда – DMEM F-12, сыворотка – эмбриональная бычья 10%; процедура посева – снятие клеток, используя трипсин 0,25% и раствор Версена 0,02% (1:3), кратность посева 1:2 – 1:3, оптимальная плотность $2-3 \times 10^4$ клеток/см³.

Контроль видовой идентичности осуществляется кариологическим и изоферментным (ЛДГ и Г6ФД) анализом. Кариология: $2n=40$, пределы изменчивости по числу хромосом 76-78, модальное число хромосом 83, количество маркеров – 2 (рутинная окраска), в некоторых клетках имеются микрохромосомы.

Эффективность клонирования: менее 1%.

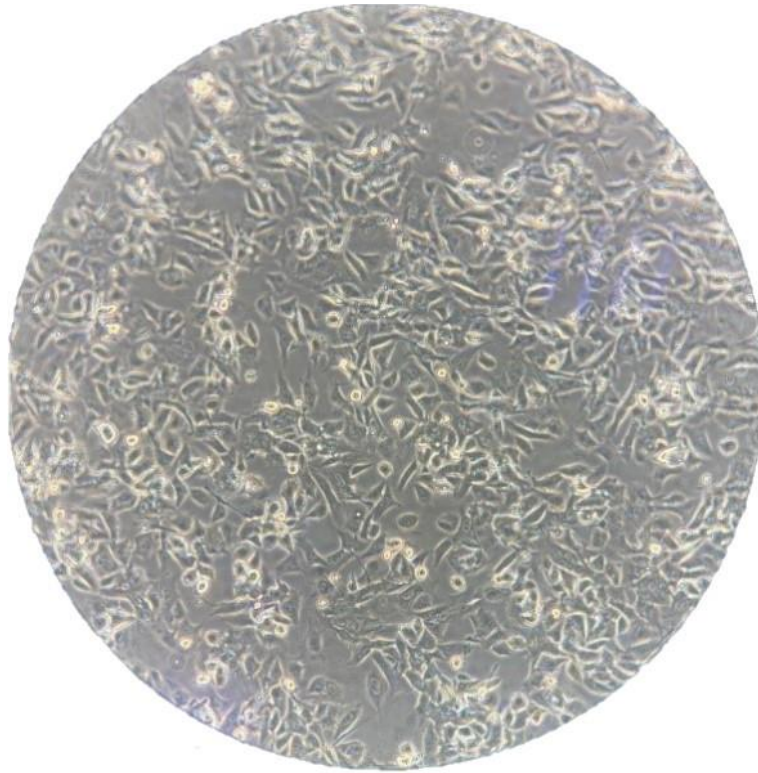


Рисунок 2.1 – Внешний вид культуры клеток меланомы мышей Clone M-3 (увеличение 20х).

2.1.3 Лабораторные животные

Эксперименты проводились на белых лабораторных мышах (*Mus musculus*) линии BALB/c 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.).

2.2. Методы

2.2.1 Культивирование клеточной линии Clone M-3

Культивирование осуществляли согласно рекомендациям по стандартным протоколам, адаптированным под условия экспериментальной линии.

Культивирование клеток *in vitro* проводили в культуральных средах, которые содержали все компоненты, необходимые для нормального функционирования и пролиферации клеток вне организма (табл. 2.1.). Для нормальной жизнедеятельности клеток в культуре необходимо, чтобы рН среды находился в достаточно узком диапазоне 7,2-7,5, что достигается в большинстве случаев с помощью системы бикарбонат натрия/СО₂. При концентрации 5% СО₂ в воздухе эта буферная система обеспечивает рН среды 7,4. Важным фактором, влияющим на жизнедеятельность клеток, является также температура культивирования, которая зависит от вида животного, из которого выделены клетки. Оптимальной для клеток холоднокровных животных считается температура около 25° С, а для теплокровных - 37° С. Большинство клеток теплокровных животных (в том числе и те, с которыми предполагается работать на занятиях практикума) культивируют в СО₂-инкубаторах, поддерживающих необходимую температуру (37° С), 100% влажность и заданную концентрацию СО₂ (5%). Для контроля состояния среды в нее добавляли индикатор, феноловый красный. Феноловый красный при рН 7,4 имеет насыщенный красный цвет, который изменяется на пурпурный при защелачивании среды, и желтеет ее закислении.

Среду меняли на следующий день после пересадки клеток, чтобы убрать мертвые (не пережившие пересадку клетки), а также каждые 3-4 дня при формировании монослоя.

Для этого сливали старую среду и добавляли аккуратно новую в том же объеме.

Таблица 2.1 – Состав ростовой среды

Компонент	Содержание	На 50 мл среды
FBS	10%	5 мл
Антибиотики (p/s)	1%	0,5 мл
ПВК	1%	0,5 мл
DMEM F-12	88%	44 мл

Сыворотка – FBS (Fetal bovine serum) - для нормального роста клетки, помимо содержащихся в культуральной среде аминокислот, нуждаются также в специфических ростовых факторах. Поэтому в культуральную среду, используемую в работе, добавляют сыворотку крови млекопитающих (чаще всего, крупного рогатого скота). Для ведения данной культуры, использовалась эмбриональная бычья сыворотка.

Другой ее функций является нейтрализация трипсина, после открепления клеток, в противном случае от фермента можно было бы избавиться, только осаждая клетки и удаляя всю надосадочную жидкость. В больших концентрациях – выше 20% она становится токсичной для клеток. Нормальная концентрация для обычной среды 10-15%, и 15% делается, если культура плохо растет.

Антибиотики/антимикотики (p/s) – клеточную культуру Clone M-3 можно выращивать, как без антибиотиков, так и с их помощью. Они помогают предотвратить «заращение» культуры клеток различными бактериями, но не предотвращает заражения грибками. Используют пенициллин и стрептомицин в готовой смеси и концентрации.

ПВК (пировиноградная кислота) является добавкой к среде, особенно для раковых клеток, ведь им необходимо много энергии. Благодаря интенсивному делению, гликолиз происходит быстрее. Глюкозы содержащейся в среде может быть не достаточно.

DMEM F-12 – наиболее подходящая среда для выращивания эпителиальных клеток. Была использована в концентрации глюкозы 1 г/л. Культуральная среда представляет собой раствор аминокислот, витаминов, глюкозы и множества других веществ. Среда составляет на основе сбалансированных буферных солевых растворов, которые служат источником 19 некоторых физиологически важных ионов и обеспечивают необходимое осмотическое давление. В организме клетки находятся в изотонических условиях - они окружены межклеточной жидкостью, через которую происходит обмен веществ, позволяющий клеткам поддерживать постоянство внутренней среды. Клетки, выделенные *in vitro*, также должны культивироваться в изотонических условиях.

Пересадку клеточной культуры Clone M3 осуществляли по общим правилам согласно рекомендациям. Когда клетки сформировали монослой, т.е. достигли конfluenceности 80-90%, их необходимо пересадить в новые флаконы для дальнейшего роста, а для этого их нужно дезинтегрировать. Для того, чтобы снять клетки со стекла и перевести в состояние суспензии, используют ферменты или хелатные соединения, диссоциирующие клетки и нарушающие связь клеток с подложкой: 0,25% раствор трипсина, раствор Версена (натриевая соль ЭДТА, приготовленная на физиологическом фосфатном буфере) либо их смесь в различных, экспериментально подобранных соотношениях. После, остается только определить количество клеток и рассадить их в новые флаконы.

Последовательность действий:

1. Определить плотность монослоя. Пересадка клеток из культурального флакона осуществляется при конfluenceности в 80-90%.
2. Слить среду.
3. Добавить PBS или DPBS буфер (важно добавить его не повредив клетки). Объем зависит от типа флакона – 5 мл для T25, 15 мл для T75 и т.д.
4. Аккуратно омыть буфером клетки и слить его.
5. Добавить трипсин. Концентрация зависит от особенностей культуры клеток, а объем от флакона – 500 мкл в T25, 1500 мкл в T75 и т.д.

6. Флакон с трипсином инкубируется 5 мин при 37°C.
7. Проверить состояние клеток под микроскопом. Если клетки не отделились повторить пункт «4», но не дольше 10-15 минут.
8. Нейтрализовать трипсин средой (DMEM+FBS+p/s+ПВК). Объем согласно флакону – 5 мл для T25, 15 мл для T75 и т.д.
9. Аккуратно суспендировать клетки.
10. Отобрать аликвоту на подсчет клеток.
11. Посчитать количество клеток и разделить их для новых флаконов с учетом плотности посадки клеток.
12. Подписать новые флаконы.
13. Поставить флаконы с клетками в инкубатор для формирования монослоя.

Для заготовки запаса клеток для дальнейших экспериментов осуществляли криоконсервацию (заморозку) клеточной линии Clone M-3.

Клетки замораживают на пике их роста с конfluenceностью 80% и более. Первые этапы криоконсервации такие же, как при пересадке клеток, сначала монослой дезинтегрируют и считают количество клеток. Некоторая часть клеток не переживет процесс заморозки даже при соблюдении всех требований, однако известно, что наиболее оптимальная концентрация для заморозки 2 млн кл/мл. Можно менее, но не более. Исходя из этих данных определяют, какое количество среды нужно добавить к клеткам. Сама среда отличается составом от той, в которой клетки растут. Для того, чтобы формирующиеся в процессе криоконсервации кристаллы льда не разрушили клетки, к DMEM F-12 добавляют криопротекторы - глицерин, диметилсульфоксид (DMSO), либо культуральную сыворотку в больших концентрациях (возможно использование комбинации нескольких криопротекторов) (табл. 2.2.). Такой состав помогает с наименьшими потерями замораживать клетки и сохранять их жизнеспособными на годы, а возможно и века. Когда среда добавлена к клеткам их ресуспендируют и оставляют на 15-30 минут при комнатной температуре. Только после этого криопробирки в специальном штативе помещают в холодильник на -80 °C.

Штатив для криоконсервации сделан таким образом, что температура в нем падает со скоростью 1 градус в минуту. После 12-24 ч в холодильнике клетки готовы к более глубокой заморозке в жидком азоте при -196°C . На 2 мл клеток, требуется 1 мл среды для заморозки.

Таблица 2.2 – Состав среды для криоконсервации

Компонент	Содержание	На 50 мл среды
DMEM F-12	60%	29 мл
Антибиотики (p/s)	1%	0,5 мл
ПБК	1%	0,5 мл
FBS	30%	15 мл
DMSO	10%	5 мл

Последовательность действий:

1. Слить среду.
2. Добавить PBS или DPBS буфер (важно добавить его не повредив клетки).
3. Аккуратно омыть буфером клетки и слить его.
4. Добавить трипсин.
5. Флакон с трипсином инкубируется 5 мин при 37°C .
6. Проверить состояние клеток под микроскопом. Если клетки не отлипли повторить пункт «4», но не дольше 10-15 минут.
7. Нейтрализовать трипсин средой (с 10% FBS). Для полного отлипания клеток, можно аккуратно смыть их механическим способом (пипетированием).
8. Отобрать аликвоту на подсчет клеток.
9. Остаток слить в пробирку для центрифугирования объемом 25 мл.
10. Центрифугировать 5-10 мин 100 g
11. Пока клетки осаждаются, посчитать их концентрацию и сколько среды нужно будет к ним добавить.

12. Убрать надосадочную жидкость.
13. Добавить необходимое количество среды с 30% FBS и DMSO.
14. Ресуспендировать.
15. Перенести суспензию клеток в криопробирки.
16. Инкубировать клетки в таком виде в течение 15-30 мин (среднее 20, 30 может быть опасно) при комнатной температуре 20-25 °С.
17. Поместить криопробирки в штатив для заморозки клеток. Штатив должен быть тоже комнатной температуры.
18. Поместить штатив с пробирками в холодильник на 12-24 часа при -80 °С. В таких условиях клетки могут храниться до полугода.
19. Перенести криопробирку в жидкий азот (-196 °С).

Процесс размораживания клеток должен быть максимально быстрым. Этого можно добиться, поместив ампулу из жидкого азота непосредственно в водяную баню (температура +37°С). Как только клеточная суспензия оттает, ее следует немедленно развести предварительно прогретой культуральной средой соответствующего состава и перенести во флаконы для культивирования. После прикрепления клеток к субстрату (приблизительно через 2-4 часа после перенесения клеток в культуральный флакон) среду необходимо заменить на свежую для удаления криопротекторов и мертвых клеток.

Последовательность действий:

1. Греть пробирку в руке или на водяной бане при 37 °С около 2 минут, пока не растает весь лед. Долго нельзя т.к. необходимо избавиться от DMSO.
2. Центрифугировать 5 мин 100 g.
3. Убрать супернатант
4. Добавить нормальную среду и ресуспендировать.
5. Перенести клетки в культуральный флакон и добавить среду до нормального объема.

Подсчет клеток осуществлялся на приборе Luna II™ Logos Biosystems. Перед подсчетом, клетки открепляли от флакона, переливали в стерильную пробирку, ресуспендировали и отбирали 20 мкл в другую пробирку. Клетки

смешивали с красителем трипановый синий в количестве 10 мкл и помещали в специальные кассеты для подсчета. В итоге получали количество живых и мертвых клеток на мл суспензии клеток.

2.2.2 Дизайн и синтез тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов

Дизайн тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов и праймеров был осуществлён самостоятельно на основе геномной последовательности мыши, имеющихся в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Тиофосфатные антисмысловые олигонуклеотиды синтезированы с помощью стандартного фосфорамидитного метода, используя в качестве сульфурлирующего реагента 3-((N, N-диметил-аминометилиден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-5-тион (ДДТТ). Смешение компонентов происходит в коммуникационных линиях синтезатора в процессе доставки реагентов в колонку, содержащей твердофазный носитель. Синтез осуществляется в направлении от 3'- к 5'-концу. После завершения всех циклов синтеза требуется снятие полученного целевого олигонуклеотида с твердофазного носителя, удаление защитных групп в течение ночи при 55 °С в концентрированном растворе аммиака и последующая очистка при помощи ВЭЖХ.

Очистку синтезированного олигонуклеотида осуществляли при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (ОФ-ВЭЖХ) выполняли на колонке Jupiter 5µm C18 300 Å (4.6 мм × 250 мм) с использованием препаративной системы ВЭЖХ (Azura P6.1 L, детектор UVD 2.1S). Для очистки использовали буферы: (А) 0,1 М ацетата триэтиламония в воде, (В) 50% MeCN/буфер А. Градиент 30%. Поток 1 мл/мин. После сбора целевой фракции содержащей очищенный олигонуклеотид, ее упаривали до сухого состояния на ротационном испарителе под вакуумом для удаления растворителя и буфера, который также является летучим соединением.

Синтезированные олигонуклеотиды наносятся на мишень прибора, на образец капают 1 мкл раствора матрицы, для которой использовалась 3-гидроксипиколиновая кислота (3-НРА-матрица). Соотношение массы (m) к заряду (z) олигонуклеотидов измеряли в виде положительных ионов с 3-гидроксипиколиновой кислотой в качестве матрицы на приборе LaserToFLT2 Plus (Великобритания) в соотношении 2:1. Теоретическое отношение m/z рассчитывали в программе ChemDraw 18.0.

2.2.3 Исследование влияния антисмысловых олигонуклеотидов на пролиферацию клеток Clone M-3 с помощью системы xCelligence

Для оценки жизнеспособности клеточной линии Clone M-3, клетки открепляли от флакона, переливали в стерильную центрифужную пробирку, отбирали аликвоту и считали на приборе Luna II™ Logos Biosystems. Клетки, в количестве 6000, капали в лунки 16-тилуночного планшета, далее доливали ростовую среду для клеток и добавляли АСО. Количество жидкости в одной лунке планшета не должно превышать 80 мкл.

Планшет подключали к прибору Xcelligence Real time cell analysis и с помощью компьютерной программы Biosensor RTCA происходит отслеживание состояния клеток и подсчет клеточного индекса (пролиферации).

2.2.4 Оценка признаков апоптоза и клеточного цикла после воздействия антисмысловыми олигонуклеотидами

Апоптотические процессы в клеточной культуре Clone M-3 оценивались с помощью реагентов Muse™ Annexin V и Dead Cell на проточном цитофлуориметре Guava Muse (Luminex).

На начальных этапах, клеточную культуру, обработанную антисмысловыми олигонуклеотидами, а также контрольные клетки, ничем не

обработанные, открепляли от флаконов с помощью трипсинизации. При этом клеточная культура должна содержать не менее 10% FBS в ростовой среде. В пробирку эппендорф добавляем 100 мкл раствора Annexin V и Dead Cell и к нему добавляем 100 мкл суспензии клеток (содержащего 5×10^5 клеток). После раствор перемешивается и инкубируется при комнатной температуре в течении 20 минут. По истечению этого времени, полученный раствор отправляется в анализатор для получения результатов.

Влияние антисмысловых олигонуклеотидов на клеточный цикл оценивалось при помощи набора реагентов Muse™ Cell Cycle Kit.

Порядок пробоподготовки:

1. Клетки откреплялись от флаконов при помощи трипсинизации.
2. В пробирку эппендорф добавлялась суспензия клеток (1×10^6) в количестве 100 мкл.
3. Клетки центрифугировались при 300 g в течении 5 минут.
4. После центрифугирования, надосадочная жидкость отбиралась и клетки промывались в 1X DPBS.
5. Клетки ресуспендировали и добавляли 1 мл 70% холодного этанола.
6. Инкубировать клетки не менее 3 часов при температуре -20°C .
7. После инкубации, клетки в объеме 200 мкл, переливают в новую пробирку.
8. Повторение пункта 3 и 4.
9. К промытым клеткам добавляется 200 мкл Muse™ Cell Cycle Kit.
10. Инкубировать полученный раствор при комнатной температуре в течении 30 минут.
11. Далее пробирки отправляются в клеточный анализатор.

2.2.5 Перевивка клеточной линии Clone M-3 мышам для создания опухолевой модели

Перевивка клеточной линии модельным животным осуществляется в несколько этапов:

1. Выращивание клеточной культуры до нужного количества клеток необходимого для одного эксперимента ($4-6 \times 10^6$ клеток).
2. Открепление клеток от флакона, путем трипсинизации.
3. Подсчет клеток.
4. Расчет необходимого числа клеток на одну мышь.
5. Перемещение клеток в центрифужную пробирку с дальнейшим центрифугированием.
6. Отбираем надосадочную жидкость (ростовая среда).
7. К осадку клеток добавляем раствор Хенкса, с расчетом 500 мкл на одну мышь.
8. Набираем полученный раствор клеток в шприцы объемом до 1 мл.
9. Вводим подкожно в область холки (межлопаточная область), под углом от 15 до 25 градусов.

2.2.6 Расчет площади опухолей, образовавшихся в процессе перевивки культуры клеток Clone M-3 модельным животным

В результате перевивки культуры клеток мышам, образовались подкожные опухоли округлой формы, с неровными контурами. Площадь их высчитывалась по формуле: $S = \pi \times r^2$, где r — это радиус, π — это константа, которая выражает отношение длины окружности к диаметру, она приблизительно равна 3,14.

В процентном соотношении высчитывалось увеличение или уменьшение опухолей после воздействия антисмысловых олигонуклеотидов по дням.

2.2.7 Взятие образцов опухоли и внутренних органов для проведения иммуногистохимического исследования

На седьмые сутки животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом. Эвтаназию модельных животных (мышей) осуществляли с помощью эфирного наркоза. После этого, животное помещали на препаровальный лоток и фиксировали опухолью кверху. Опухоль обрабатывали антисептическими средствами, и вдоль нее проводили надрез кожного покрова. Опухоль инкапсулирована и хорошо поддается изъятию из под кожи при вскрытии. Фрагменты опухоли помещали в гистологическую кассету и фиксировали 16-18 часов в формалине.

После эвтаназии и забора опухоли, вскрытие осуществлялось в несколько этапов:

1. Фиксация конечностей животного препаровальными иглами на препаровальном лотке спиной вниз.
2. Пинцетом захватить и приподнять кожу, сделать продольный надрез по белой линии живота от паховой области до области нижней челюсти. Брюшная стенка при этом остается неповрежденной.
3. Отодвинуть кожу по краям брюшной стенки и зафиксировать.
4. Сделать разрез брюшной стенки от паховой области до средней линии живота.
5. Сделать надрез грудной клетки ножницами.
6. Аккуратно извлечь печень и почки.
7. Поместить целевые органы в гистологические кассеты (правую почку надрезаем сверху).
8. Фиксировать органы в формалине 16-18 часов.

2.2.8 Иммуногистохимическое исследование опухолевой ткани и внутренних органов мышей

Исследования проведены с использованием оборудования ЦКП «Молекулярная биология» Центральной научно-исследовательской лаборатории Ордена Трудового Красного Знамени Медицинского института им. С.И. Георгиевского» ФГАОУ ВО «КФУ им. В. И. Вернадского».

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 (Milestone, 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 Polymer 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 (Novokastr, 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.

Что касается внутренних органов, то сначала отделяли один из сегментов печени, а также обе почки. Органы фиксировали в 10% формалине в течение 24 часов, после чего дегидратировали и пропитывали парафином, как указано выше. Из парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 4 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Просматривали препараты под микроскопом DM2000 (Leica, Германия) с цифровой камерой DFC295. В печени оценивали состояние кровеносного русла, наличие лимфоидной инфильтрации, состояние гепатоцитов. Делали фотоснимки не менее чем 10 полей зрения, на которых в программе ImageJ измеряли площадь и диаметр гепатоцитов и их ядер, вычисляли ядерно-цитоплазматическое соотношение. Так же определяли относительные площади, занимаемые гепатоцитами и синусоидными капиллярами.

В почке также оценивали состояние коркового вещества, сосудистого компонента, измеряли такие структурные элементы нефрона, как сосудистый клубочек, капсула Боумена-Шумянского, диаметр проксимальных и дистальных канальцев, выносящих трубочек и высоту эпителия в них.

2.2.9 Клинический и биохимический анализ крови мышей

Кровь у мышей брали при декапитации в чистые центрифужные пробирки. Кровь ставили в термостат при температуре 37°C на 30-60 мин., затем переносили в холодильник на 1-2 часа. Сыворотка в виде прозрачной жидкости отделяется от кровяного сгустка. Для лучшего выделения сыворотки образовавшийся сгусток фибрина отделяли от стенок пробирок, обводя стеклянной палочкой. Для лучшего отделения сыворотки от сгустка кровь

центрифугировали при 1500-2500 об/мин. в течение 15-20 минут. Готовую сыворотку отбирали в чистую сухую пробирку.

Клинический анализ крови мышей включал исследование форменных элементов. Для исследования использовали венозную кровь. В пробирку эппендорф добавляли 20 мкл на 1мл крови антикоагулянта ЭДТА. Анализ на форменные элементы выполняли на гематологическом анализаторе Mythic18 (ORPHEE SA, Швейцария) по стандартному протоколу.

Биохимический анализ сыворотки мышей выполняли для выявления ключевых показателей метаболизма и как показатель функционирования жизненно важных органов животных. Образцы сыворотки крови подготавливали для дальнейшего биохимического анализа по таким показателям: ALAT (Аланин-аминотрансфераза), ASAT (Аспартатаминотрансфераза), ALP (щелочная фосфатаза), UREA (Мочевина), CREA (Креатинин), TP (Общий белок).

Подготовленные образцы, калибратор и контроли устанавливали в соответствующие позиции в приборе. После выделения необходимых процедур контроля качества и калибровки, дальнейшим шагом будет регистрация образцов и запуск прибора.

2.2.10 Перевивка клеток меланомы из образовавшейся опухоли в культуру клеток

После выведения мыши из эксперимента под эфирным наркозом, обрабатывали антисептическим раствором место нахождения опухоли и аккуратно надрезали кожу скальпелем по очертанию опухоли. После изъятия опухоли в цельном виде (опухоль инкапсулированная), перемещали в раствор DPBS для промывки. После, все манипуляции проходят в стерильных условиях. Опухоль перемещаем с стерильную чашку Петри и промываем еще 4 раза. После удаления некротизированной, фиброзной и жировой ткани, опухоль измельчали скальпелем на 1-2 мм. Далее промывали кусочки DPBS 5 раз. В

зависимости от размера опухоли, получалось от 15 до 20 кусочков ткани. Кусочки распределяли равномерно в стерильные культуральные флаконы T25 и заливали ростовой средой. Флаконы перемещали в инкубатор при температуре 37°C и концентрации углекислого газа 5 %. Через 12-24 часа, флаконы доставали из инкубатора и проверяли наличие отделившихся клеток под микроскопом. При наличии отдельных клеток, с флакона аккуратно сливали среду и доставали кусочки ткани, промывали 2 раза раствором DPBS и заливали ростовой средой. Клетки отправляли в инкубатор для дальнейшего культивирования.

Если через 24 часа конfluenceность отделившихся клеток меньше 40%, то эксперимент не удался и в дальнейшем клетки не будут делиться в силу того, что клетки располагаются в разных участках флакона и плохо образуют межклеточные контакты.

2.2.11 Исследование влияние антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 на миграционную активность опухолевых клеток

Для исследования миграционной активности клеток меланомы Clone M-3 высаживали во флаконы T25, как описано в 2.2.1. Через 4 часа после их прикрепления ко дну флакона, делали царапину равной 1 мм скребком для клеток и добавляли в тиофосфатные олигонуклеотиды. В течение эксперимента клетки инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °C. Через 0, 24 и 72 часа клетки фотографировали с помощью микроскопа Olympus CKX53 при 4-кратном увеличении. Фотографии клеток обрабатывали с помощью программы ImageJ. Степень зарастания царапины оценивали по формуле $v = (1-x) \times 100\%$, где x - отношение ширины царапины через 24 и 72 часа к ширине царапины в 0 часов.

2.2.12 Выделение суммарной клеточной РНК из культуры клеток

Выделение суммарной клеточной РНК из культуры клеток проводили фенол-хлороформным методом при помощи набора Extract RNA (Евроген,

Россия), в соответствии с инструкцией производителя. Выделение РНК проводилось по рекомендациям к данному типу пробы (культура клеток). Перед началом выделения, клетки открепляли от флакона, подсчитывали и отбирали нужное количество клеток, затем центрифугировали. Осадок в виде клеток использовался для выделения РНК.

Порядок работы:

1. Гомогенизация образца в растворе Extract RNA. Для одного образца 1×10^6 на 500 мкл раствора.
2. Инкубация лизата при комнатной температуре в течении 10 минут
3. Центрифугирование лизата при 12000 g 10 минут.
4. Супернатант переливается в новую пробирку. При отборе супернатанта нужно избегать попадание жировой фракции в новую пробирку.
5. Добавление 100 мкл хлороформа и встряхивание пробирки в течении 10 секунд.
6. Инкубация смеси 5 минут.
7. Центрифугирование образца при 12000 g 15 минут. После центрифугирования, смесь разделена на 3 части, в каждой из них находится белок (интерфаза белого цвета), ДНК (фенол-хлороформная фаза) и РНК (водная фаза).
8. Аккуратно отобрать водную фазу под наклоном пробирки в 45° .
9. Переместить водную фазу в новую пробирку.
10. В водную фазу добавить 250 мкл 100% изопропанола.
11. Инкубировать смесь при комнатной температуре 10 минут.
12. Центрифугирование образца при 12000 g 15 минут.
13. Отобрать супернатант, осадок РНК остается на дне пробирки.
14. По стенке пробирки, аккуратно добавляем 1 мл 75% этанола.
15. Центрифугирование образца при 13000 g 15 минут.
16. Высушить осадок на воздухе в пробирке с открытой крышкой в течении 7 минут.
17. Растворить РНК в 30 мкл свободной от РНКаз воды.

Качество и концентрацию выделенной суммарной РНК оценивали с помощью NanoDrop™ (Thermo Scientific, США). Для получения к-ДНК использовали одинаковую концентрацию РНК (80 нг/мкл) для разных групп эксперимента.

2.2.13 Обратная транскрипция

Для проведения обратной транскрипции, на один образец добавляли в пробирку объемом 0,2 мл, 10 мкл суммарной РНК в концентрации 80 нг/мкл, 1 мкл обратного праймера (5'-A-CAG-TGG-ATG-TCC-TAG-GTG-3'), 10 мкл реакционной смеси, 1 мкл фермента MMLV-RT и 2 мкл воды (Синтол, Россия). Обратную транскрипцию проводили в амплификаторе LightCycler96 (Roche, Швейцария), при температуре 37°C в течении 30 минут. Для инактивации фермента, пробирки выдерживали при 92°C и инкубировали 5 минут.

2.2.14 Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ПЦР проводили по протоколу производителя (Синтол, Россия) на амплификаторе в режиме реального времени LightCycler96 (Roche, Швейцария). Расчет на один образец: к 10 мкл реакционной смеси, содержащей 2.5x ПЦР-буфер Б (KCl, TrisHCl, 6,25 mM MgCl₂), SynTaq ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20, добавляли 5 мкл кДНК, 0,5 мкл прямого праймера (5'-CCA-GGC-TGG-TGA-CGA-TTA-C-3') и 0,5 мкл обратного праймера (5'-A-CAG-TGG-ATG-TCC-TAG-GTG-3'), 1 мкл MgCl₂ и 8 мкл деионизированной воды. ПЦР проводили при следующем температурном режиме: 1 цикл денатурации при 95°C 300 секунд, 50 циклов - 95°C 15 секунд, 59 °C 10 секунд, 72 °C 10 секунд. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения LightCycler96 Software.

2.2.15 Электрофорез в агарозном геле

Детекция продуктов амплификации проходила с помощью электрофореза в агарозном геле. Для приготовления геля использовались: агароза, трис-боратный буфер 1X и бромистый этидий.

Порядок работы:

1. 1 грамм агарозы смешать с 55 мл трис-боратного буфера 1X, подогреть.
2. В приготовленный гель добавить 10 мкл бромистого этидия, подогреть до полного растворения бромистого этидия в геле.
3. Залить застывший гель в камеру для электрофореза.
4. 5 мкл продукта амплификации смешать с 10 мкл красителя
5. Добавить в лунки геля. В отдельную лунку нанести 5 мкл маркера молекулярных весов.
6. Подключить камеру для электрофореза к источнику питания на 40 минут.

2.2.16 Приготовление гомогената клеток

Для подготовки к исследованию, клетки в количестве 5×10^5 открепляли от флакона T25 методом трипсинизации, после нейтрализации клеток готовой культуральной средой, к клеткам добавляли 100 мкл TACO Skeen-11 в концентрации 1000 нг\мкл. Спустя 30 минут клетки переливали в пробирки MagNA Lyser Green Beads. После центрифугирования при 300 g, в течении 2 минут сливали надосадочную жидкость. В осадок с клетками добавляли шарики для гомогенизации. Пробирки устанавливали в прибор для гомогенизации MagNa Lyser на 1 мин при скорости 7000 оборотов.

2.2.17 Исследование стабильности антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 в сыворотке крови мышей и в гомогенате клеток

Исследование нуклеазоустойчивости тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 в сыворотке крови мышей осуществляли следующим образом.

Реакционную смесь объемом 100 мкл, содержащую 80 мкл сыворотки крови мышей и 20 мкл тАСО Skeen-11 инкубировали при температуре 37°C. Через 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32 и 42 ч отбирали аликвоты объемом 20 мкл. Аликвоту смешивали с 8М мочевиной в равном объеме. Образцы замораживали при температуре -20°C. Для разделения продуктов реакции использовали электрофорез в 1,8% агарозном геле.

В готовый гомогенат клеток (пункт 2.2.15.1) объемом 100 мкл, добавляли 100 мкл тАСО Skeen-11 в концентрации 1000 нг/мкл. Полученную реакционную смесь выдерживали при температуре 37°C 15, 30, 45, 60, 120, 180 минут. Далее выдерживали при 80 °C 60 минут. Для разделения продуктов реакции использовали электрофорез в 1,8% агарозном геле.

2.2.18 Трансфекция опухолевых клеток тиофосфатными антисмысловыми олигонуклеотидами

Трансфекцию клеток Clone-M3 проводили в присутствии трансфецирующего агента PEI 40K (аналог Lipofectamin), Servicebio, Китай.

Порядок проведения эксперимента:

1. Отобрать клетки с 70-90% конфлюентности.
2. Пересадить клетки в экспериментальный планшет в ростовую среду на ночь для прикрепления.
3. Непосредственно перед экспериментом приготовить растворы для трансфекции. На данном этапе будет происходить формирование липосом с фрагментами ДНК.

4. Смешать в разных пробирках растворы согласно таблице 2.3.
5. Полученные растворы смешать и ресуспендировать.
6. Инкубировать смесь 10-15 мин в комнатной температуре.
7. Достать из инкубатора подготовленные клетки и заменить обычную среду на DMEM F-12 с 1% ПВК (без антибиотиков и сыворотки). Добавить только половину необходимого объема.
8. Добавить нужные смеси в контрольные и опытные группы согласно цели эксперимента.
9. Инкубировать клетки 12-20 часов.
10. Сделать фотографии контрольных и экспериментальных групп.
11. Слить среду из каждой лунки в подписанную пробирку.
12. Перевести клетки в состояние суспензии, после отлипания добавить к ним старую среду.
13. Центрифугировать пробирки с суспензией клеток и старой средой.
14. Убрать надосадочную жидкость, оставив только клетки (осадок).
15. Добавить одинаковый объем нормальной питательной среды.
16. Ресуспендировать суспензию клеток и отобрать аликвоту на подсчет.
17. Посчитать количество живых клеток, а так же их жизнеспособность.
18. Перенести клетки в новый планшет, добавить нормальную питательную среду до необходимого объема
19. Инкубировать клетки еще сутки и повторить пункты 9-16. Если нет необходимости завершить эксперимент на пункте 16.

Распределения и состав контрольных и опытных групп представлены в таблицах 2.4 и 2.5.

Таблица – 2.3. Приготовление компонентов для трансфекции

1 пробирка	2 пробирка
375 мкл среды DMEM F-12 с 1% ПВК (без антибиотиков и сыворотки).	375 мкл среды DMEM F-12 с 1% ПВК (без антибиотиков и сыворотки).
10 мкл PEI 40	12 мкл H ₂ O + ДНК
	30 мкл PEI 40
Растворить хорошо перемешав.	Хорошо перемешать.

Таблица – 2.4. Распределения и состав контрольных групп

Контроль 1.1. Клетки + питательная среда	Контроль 2.1. Клетки + питательная среда + смесь растворов «1» и «2», без ДНК
Контроль 1.2. Клетки + питательная среда	Контроль 2.2. Клетки + питательная среда + смесь растворов «1» и «2», без ДНК
Контроль 1.3. Клетки + питательная среда	Контроль 2.3. Клетки + питательная среда + смесь растворов «1» и «2», без ДНК

Таблица – 2.5. Распределения и состав опытных групп

Опыт 1.1. (так же 2, 3 и т.д.). Клетки + питательная среда + смесь растворов «1» и «2», с ДНК
Опыт 1.2. (так же 2, 3 и т.д.). Клетки + питательная среда + смесь растворов «1» и «2», с ДНК
Опыт 1.3. (так же 2, 3 и т.д.). Клетки + питательная среда + смесь растворов «1» и «2», с ДНК

2.2.19 Колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток

Дыхательную функцию клеток меланомы Clone M-3 оценивали с помощью красителя 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум

бромид (МТТ) живые клетки восстанавливают желтый (МТТ) до фиолетовых гранул формазана.

Тест с использованием красителя ММТ, 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).

Порядок выполнения работ:

1. Пассируем клетки в 96-луночном иммунологическом планшете: 10 000 клеток с добавлением 150 мкл среды. Контрольные ячейки оставляем незасеянными.
2. Инкубируем 37°C при 5% CO₂ в течении ночи.
3. Готовим 5 мл свежего раствора ММТ, концентрацией 5 мг/мл в фосфатно-солевом буфере.
4. Добавляем 20 мкл раствора ММТ в каждую лунку и пипетируем.
5. Инкубируем 37°C при 5% CO₂ 3 часа (для метаболизации ММТ и восстановлению в формазан).
6. Удаляем среду и подсушиваем ячейки.
7. Растворяем образованный формазан в 200 мкл DMSO.
8. Ставим на качающую платформу при 950 грт на 5 минут.
9. Считаем оптическую плотность при 560 нм, вычет фонового значения составляет 670 нм.

Количество восстановленного продукта измеряется фотометрически при длине волны 560 нм. Выживаемость клеток в присутствии тАСО Skeep-11 вычислялась по формуле: $(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды} / \text{ОП контр. лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$, где ОП — оптическая плотность. Концентрация препарата, которая вызывает 50% гибель клеток (LC50), может быть рассчитана графически по дозозависимой кривой.

2.2.20 Статистический анализ

Полученные числовые значения подвергали статистической обработке в ПО STATISTICA 10.0. Для определения нормальности распределения признака использовали метод Шапиро-Вилка. При нормальном распределении вычисляли среднее арифметическое признака, стандартное отклонение. Данные представляли в виде $M \pm Sd$. Отличия между группами определяли по методу Стьюдента. При распределении признака, отличного от нормального, вычисляли медиану, определяли верхний и нижний квартили. Данные представляли в виде $Me [Q1; Q4]$. Отличия между группами выявляли по методу Манна-Уитни.

РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Особенности культивирования клеточной линии меланомы мышей Clone M-3

Трансплантируемые мышинные меланомы являются хорошей моделью для изучения экспериментальных методов лечения рака кожи.

Клетки меланомы мышей Clone M-3 характеризовались чрезмерным ростом. Рост клеток от lag – фазы до субкультивирования занимал около 5 суток. Клеточная линия относится к постоянной, характеризуется стабильным клонированием и дает высокий высокую эффективность посева. Для культуры был подобран свой режим культивирования, исходя из повторяющихся процедур пересева (рис. 3.1).

Кривая роста культуры Clone M-3 представляет собой полулогарифмический участок кривой, отражающий изменение концентрации клеток с течением времени, и показывает, когда следует произвести замену среды и субкультивирование (рис. 3.2.). Она включает в себя log-фазу и lag-фазу.

Клетки характеризуются "чрезмерным ростом", что типично для трансформированных опухолевых клеток и делает их удобной моделью для экспериментов, требующих быстрого получения большого количества биоматериала.

Фаза адаптации (lag-фаза) перед началом активного роста занимает около 5 суток. Это важный параметр для планирования экспериментов, так как указывает на то, что активная пролиферация начинается лишь по истечении этого срока.

Линия является постоянной (иммортилизованной), что подразумевает ее способность к неограниченному числу делений *in vitro*. Это ключевое свойство для долгосрочных исследований и поддержания банка клеток. Линия характеризуется стабильным клонированием, что означает однородность

популяции и воспроизводимость результатов между различными пассажами и экспериментами.

Высокая эффективность посева: Этот параметр указывает на то, что большой процент посеянных клеток успешно прикрепляется к субстрату и выживает, формируя колонии. Это говорит о хорошей жизнеспособности клеток и оптимизированных условиях культивирования (рис. 3.1., рис. 3.2.).

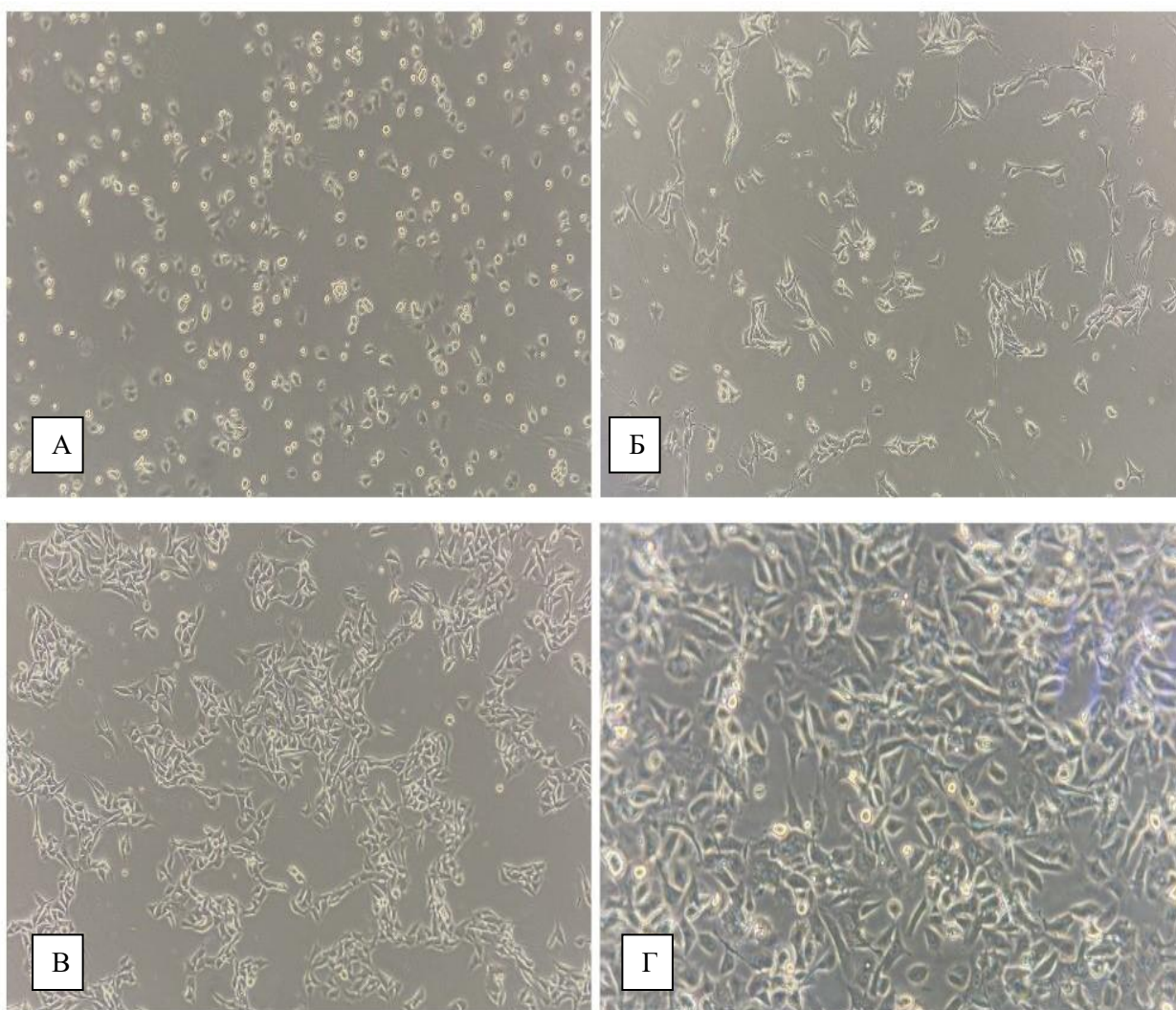


Рисунок 3.1 – Фазы ростового цикла меланомы мышей Clone M-3. Фазовая микроскопия. Увеличение 10х.

А. Свежая монослойная культура через 4 часа после пересадки.

Б. Переход в log – фазу через 18 часов после пересадки.

В. Середина log – фазы через 2 дня после пересадки

Г. Поздняя log – фаза через 4 дня после пересадки. Культура готова к субкультивированию.

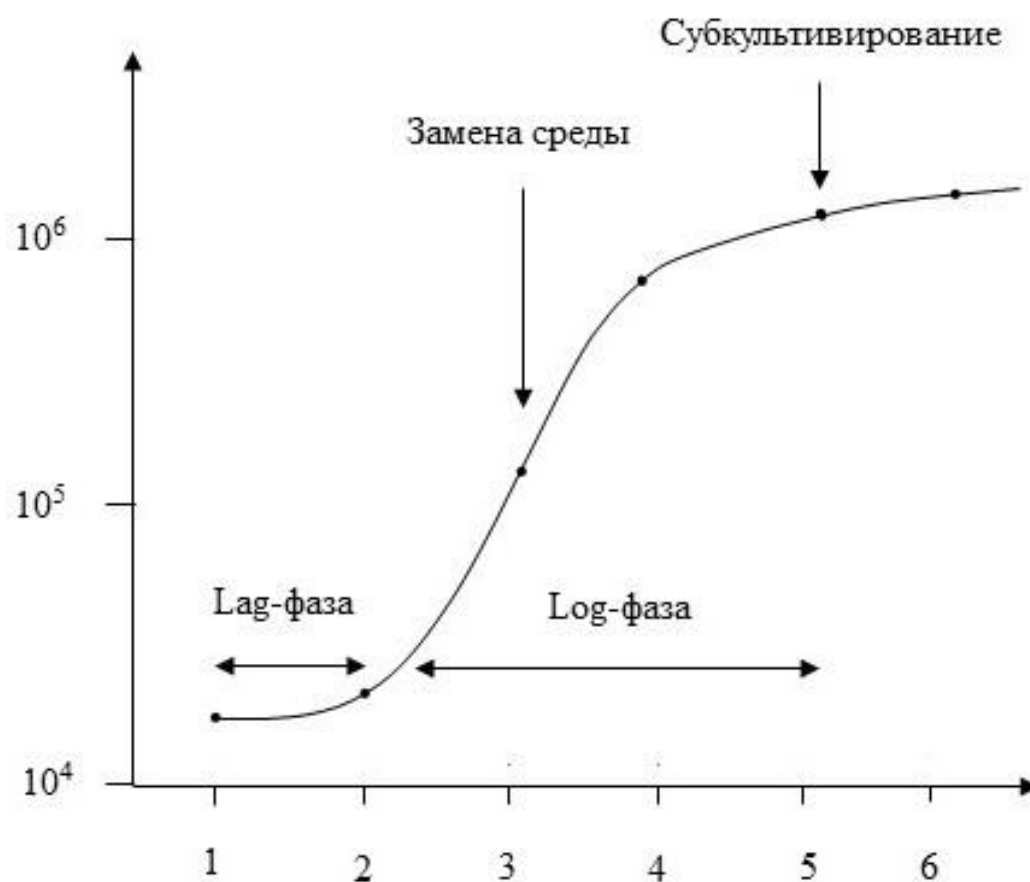


Рисунок 3.2 – Кривая роста культуры Clone M-3. Полулогарифмический участок кривой, отражающий изменение концентрации клеток с течением времени, и показывает, когда следует произвести замену среды и субкультивирование; включает в себя log-фазу и lag-фазу.

Для данной линии был эмпирически подобран индивидуальный режим культивирования (частота и метод пассирования, состав среды, концентрация сыворотки и т.д.), который поддерживает ее стабильный рост и морфологию, что является залогом успешной работы с любой клеточной моделью.

Клеточная линия меланомы мышей Clone M-3 представляет собой стабильную, быстрорастущую и хорошо охарактеризованную модель, пригодную для долгосрочных исследований в области онкологии, тестирования

противоопухолевых препаратов и изучения механизмов канцерогенеза. Оптимизированный протокол ее культивирования обеспечивает воспроизводимость и надежность получаемых экспериментальных данных.

3.2. Дизайн и результаты исследования влияния антисмысловых олигонуклеотидов на пролиферацию опухолевых клеток в режиме реального времени с помощью системы xCelligence

Тиофосфатные антисмысловые олигонуклеотиды представляют собой более совершенную структуру для терапевтических целей, по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами. В такой модификации тиофосфатная структура заменяет в фосфодиэфирных связях один атом серы на один немостиновый атом кислорода. Тиофосфатная модификация характеризуется двумя важными особенностями: устойчивостью к нуклеазам и проникновением в клетку без каких-либо трансфицирующих агентов.

В работе были подобраны и использованы два тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотида, одноцепочечных фрагментов, состоящих из 11 нуклеотидов: 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'-AAAAAAAAAAA-3'.

Соответствие синтезированных фрагментов ДНК определяли с помощью анализатора VastoSCREEN на базе масс-спектрометра MALDI-TOF (Литех, Россия).

Измерение соответствия синтезированных олигонуклеотидов, определенное с помощью метода MALDI-TOF, показало, что все олигонуклеотиды соответствуют своей структуре, и полученное соотношение отличается от теоретически рассчитанного менее чем на 10 единиц (табл. 3.1., рис. 3.3.).

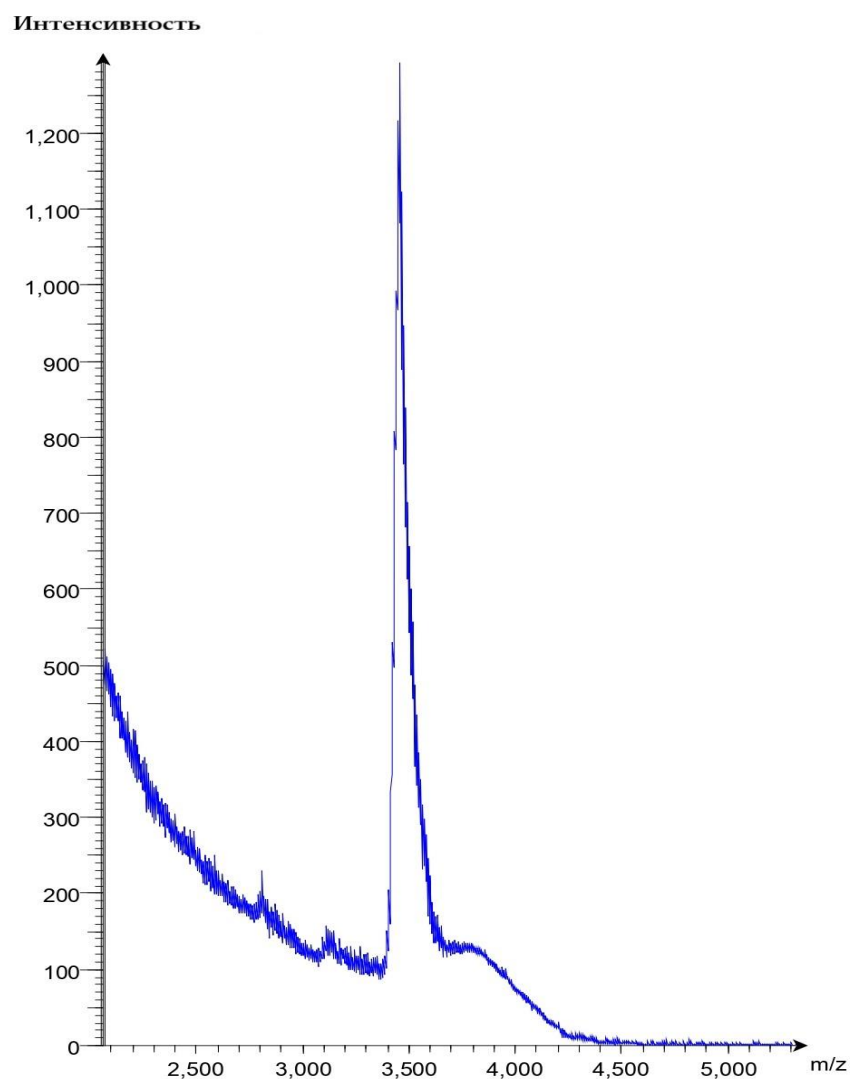


Рисунок 3.3 – Результаты анализа синтезированного олигонуклеотида Skeen-11 методом MALDI-TOF.

Таблица 3.1 – Результаты анализа синтезированных олигонуклеотидов методом MALDI-TOF

Олигонуклеотиды	Полученное соотношение m/z	Теоретическое соотношение m/z
Skeen-11	3362,29	3371,56
OligoA-11	3353,73	3462,65

Продукт представляет собой целевую последовательность с молекулярной массой 3362,29 m/z. Уровень побочных продуктов синтеза незначителен, что

позволяет использовать данный олигонуклеотид для молекулярно-биологических задач без дополнительной очистки.

3.2.1 Результаты исследования антипролиферативной активности антисмысловых олигонуклеотидов на клеточную линию меланомы мышей Clone M-3

Исследование антипролиферативной активности 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. В наших экспериментах была продемонстрирована эффективность тАСО Skeen-11, который приводил к значительному снижению пролиферации раковых клеток в культуре клеток линии Clone M-3 меланомы мышей (рис. 3.4 и рис. 3.5.).

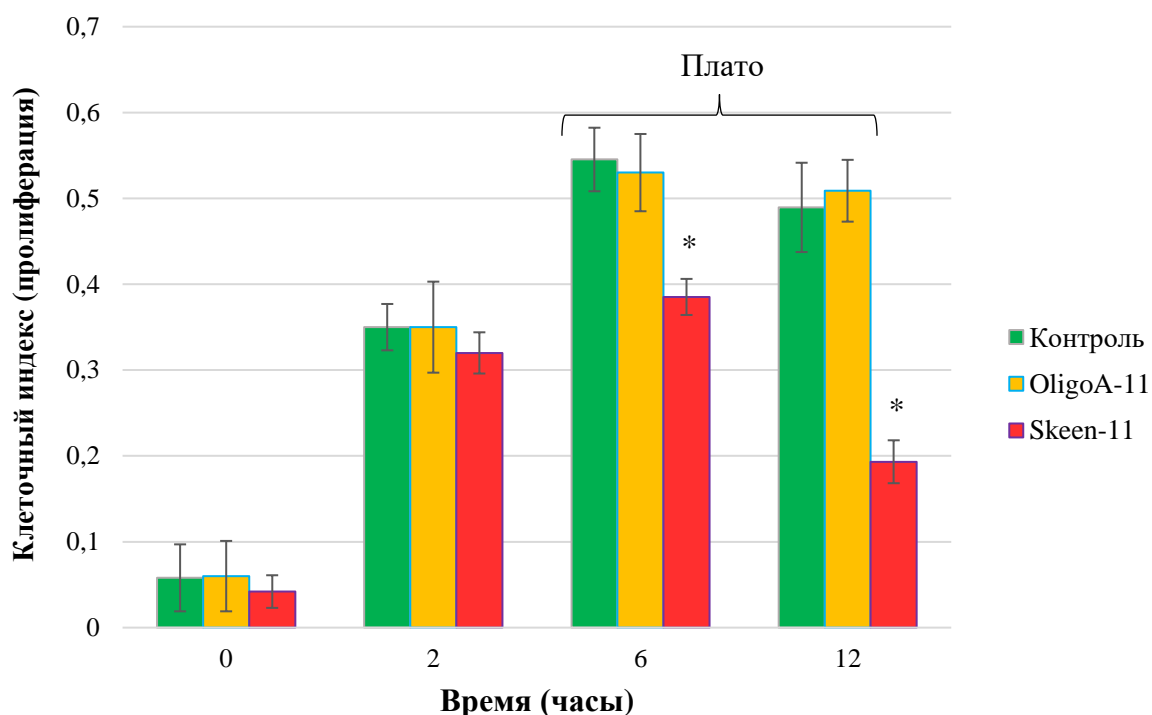


Рисунок 3.4 – Динамика клеточного индекса клеточной линии Clone M-3 в разных экспериментальных группах; *достоверная разница по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$); значения показаны со средними значениями и SE.

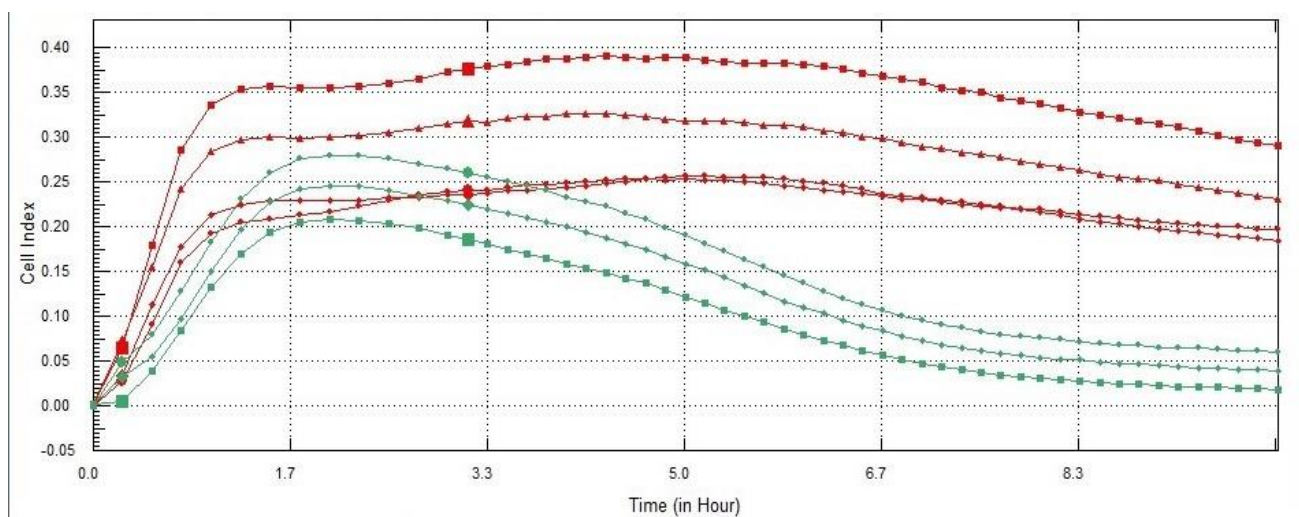


Рисунок 3.5 – Клеточный индекс для контрольной группы (красный) и Skeen-11 по состоянию на 10 часов с начала эксперимента (график построенный прибором Xcelligence).

Наиболее выраженный эффект наблюдался через 6 ч после начала эксперимента, когда клеточный индекс культуры, обработанной Skeen-11, составил $0,38 \pm 0,02$; в течение 6 часов это значение резко уменьшилось до $0,19 \pm 0,02$. В контрольной группе клеточный индекс через 6 часов составил $0,54 \pm 0,03$; через 12 часов он достиг плато роста со значением $0,48 \pm 0,03$. Среднее снижение клеточного индекса через 12 часов в группе, получавшей Skeen-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

Подавление пролиферации, вызванное тАСО Skeen-11, не наблюдается при использовании контрольного олигонуклеотида Oligo-A11. Это указывает на то, что эффект опосредован специфической последовательностью Skeen-11, а не является неспецифической реакцией на введение любого олигонуклеотида.

Стремительное снижение клеточного индекса в первые 6 часов эксперимента и его дальнейшее падение в 2,71 раза по сравнению с контролем через 12 часов свидетельствует о высокой биологической активности соединения и его способности быстро нарушать процессы деления раковых клеток.

3.2.2 Результаты исследования антипролиферативной активности антисмысловых олигонуклеотидов на клеточную линию карциномы человека Нер-2

Клеточная линия карциномы человека Нер-2 была выбрана в качестве нецелевой культуры клеток. Тиофосфатный антисмысловый олигонуклеотид Skeen-11 не приводил к достоверному уменьшению клеточной пролиферации по сравнению с контрольной группой эксперимента. На 6 ч после эксперимента, клеточный индекс у группы Skeen-11 составил $0,61 \pm 0,04$; у группы контроля $0,65 \pm 0,03$. Через 6 часов клеточные индексы двух экспериментальных групп увеличились в 2 раза и достигли постоянного плато. Контрольный олигонуклеотид OligoA-11 также не оказал существенного влияния на пролиферативную активность клеточной линии карциномы человека Нер-2 (рис. 3.6).

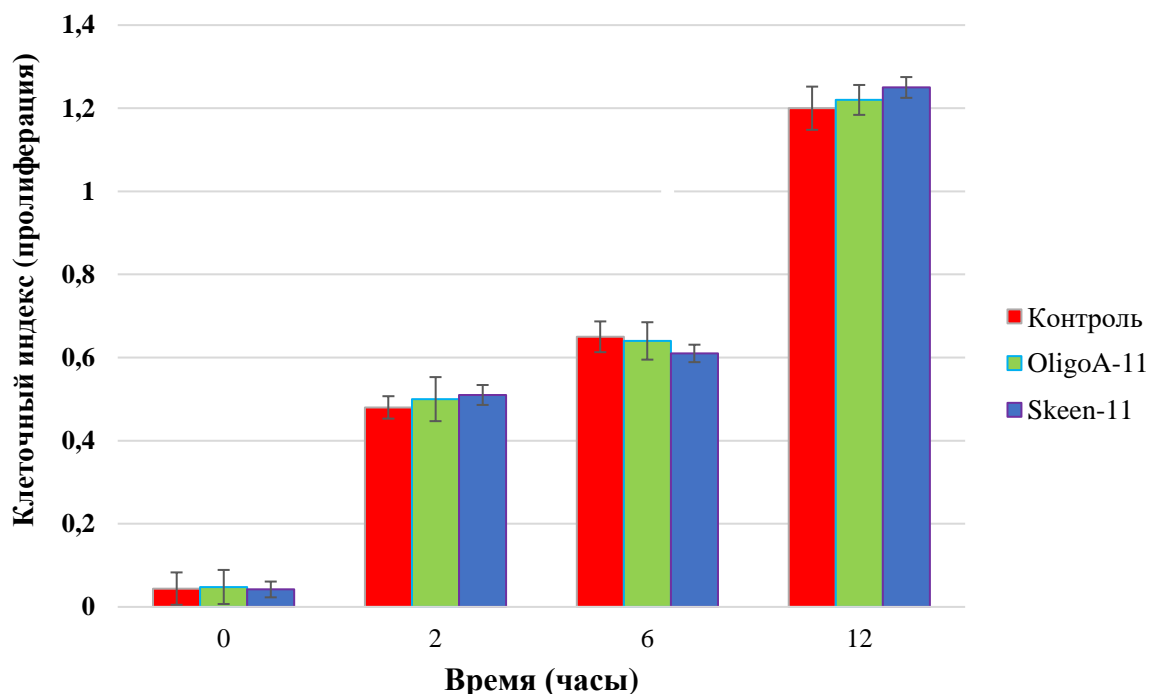


Рисунок 3.6 – Динамика клеточного индекса клеточной линии Нер-2 в разных экспериментальных группах.

Олигонуклеотид Skeen-11 не оказывал достоверного ингибирующего влияния на пролиферацию клеток карциномы человека HEp-2. Кинетика роста клеток в присутствии Skeen-11 практически не отличалась от таковой в контрольной группе и группе с контрольным олигонуклеотидом, демонстрируя нормальное достижение плато роста.

Проведенные эксперименты убедительно доказывают, что тАСО Skeen-11 обладает селективной антипролиферативной активностью, избирательно подавляя рост клеток меланомы, не влияя при этом на жизнеспособность и пролиферативный потенциал других типов раковых клеток (на модели карциномы HEp-2).

3.3. Апоптотические процессы в клетках меланомы Clone M-3 после воздействия антисмысловым олигонуклеотидом Skeen-11

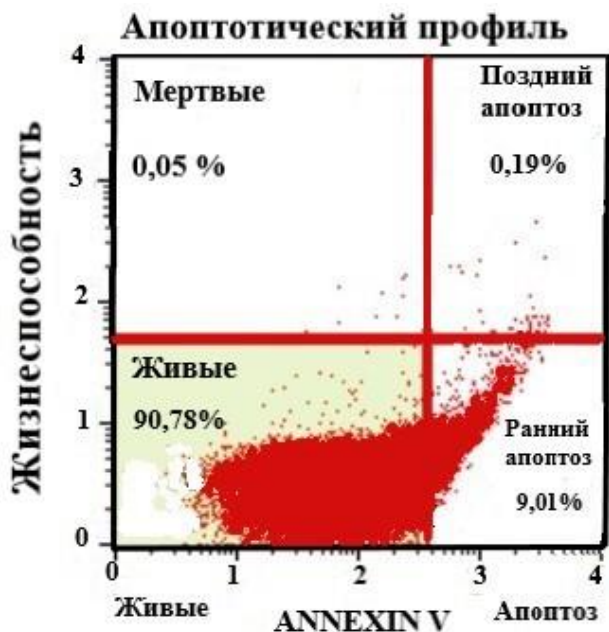
Оценку апоптотических процессов, после воздействия тАСО Skeen-11 проводили через 12 часов, после добавления Skeen-11 в культуру клеток, с концентрацией 300 нг/мкл в объеме 100 мкл на 5×10^5 клеток Clone M-3, путём окрашивания клеток Annexin V.

Эксперимент проводили в пяти повторностях. Показано, что под действием тАСО Skeen-11, на 12 часов эксперимента апоптотические процессы в клетке достигли $93,9\% \pm 0,33$, в это время у контроля было $9,2\% \pm 0,56$ апоптотических клеток. Это достоверно указывает на антиапоптотический эффект тАСО Skeen-11 (рис. 3.7, А, Б).

Выраженный проапоптотический эффект, наблюдаемый в группе Skeen-11 на фоне низкого базового уровня апоптоза в контроле, подтверждает специфичность биологического действия данного олигонуклеотида.

Данный результат является прямым доказательством того, что наблюдавшийся ранее антипролиферативный и противоопухолевый эффект Skeen-11 *in vitro* и *in vivo* реализуется преимущественно через запуск апоптоза, а не просто через цитостатическое торможение деления.

Результаты данного эксперимента устанавливают ключевой молекулярный механизм противоопухолевой активности тАСО Skeen-11 – индукция апоптоза.



А



Б

Рисунок 3.7 – Процент апоптотических клеток меланомы Clone M-3 на 12 часов, после проникновения тАСО в клетки, окрашенных Annexin V. А – Контроль; Б – Skeen-11.

3.4. Влияние антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 на клеточный цикл культуры клеток Clone M-3

Часть клеток (5×10^5), после исследования на апоптоз, была отобрана на анализ клеточного цикла. Было показано ингибирующее действие Skeen-11 с остановкой прогрессирования клеточного цикла. Наши данные показали, что воздействие на клетки с помощью Skeen-11 значительно снижало долю клеток в фазах S и G2/M, и увеличивало долю клеток в фазе G0/G1.

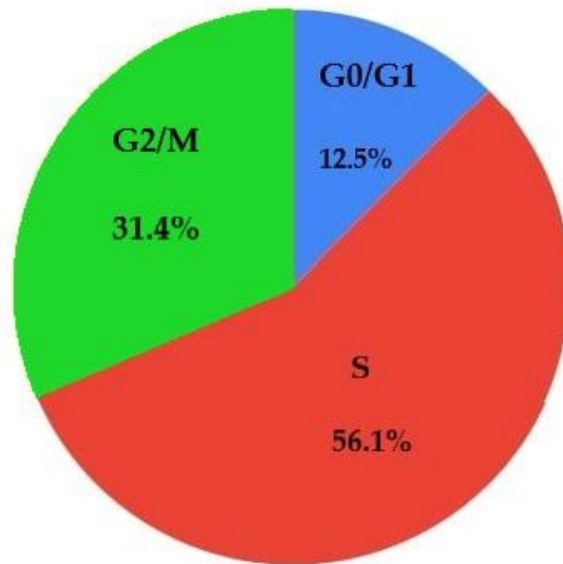
Тиофосфатный олигонуклеотид Skeen-11 вызывает остановку клеточного цикла в клетках меланомы мышей Clone M-3. Чтобы определить, связано ли влияние Skeen-11 на ингибирование пролиферации клеток Clone M-3 с остановкой клеточного цикла, количество клеток в фазах G0/G1, S и G2/M оценивали с помощью проточной цитометрии.

Результаты анализа клеточного цикла показали, что применение Skeen-11 индуцирует достоверное накопление клеток в фазе G0/G1 и составляет 97,7%, по сравнению с контролем. Кроме того, Skeen-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 (рис. 3.8).

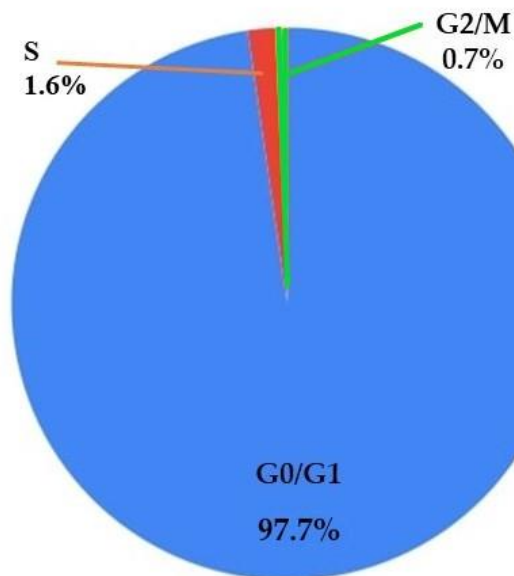
Результаты исследования указывают на то, что олигонуклеотид блокирует переход из фазы G1 в фазу S синтеза ДНК, предотвращая тем самым начало репликации генетического материала и последующее деление клетки.

Данный результат, в сочетании с ранее установленной способностью Skeen-11 индуцировать апоптоз, раскрывает комплексную стратегию подавления роста меланомы:

1. Первичный эффект: Цитостатический — остановка клеточного цикла в G0/G1 фазе, предотвращающая дальнейшее размножение клеток.
2. Вторичный эффект: Цитотоксический — запуск программы апоптоза в остановившихся клетках, приводящий к их окончательной гибели.



А



Б

Рисунок 3.8 – Клеточный цикл культуры клеток меланомы мышей Clone-M3, после воздействия тАСО Skeep-11: А – контроль; Б – Skeep-11.

3.5. Результаты исследования методом зарастания царапины

Исследование миграционной активности клеток меланомы Clone M-3 после воздействия тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeep-11 проводили методом «зарастания царапины» (scratch-test). Этот анализ используется для измерения основных параметров скорости постоянства

миграции клеток. Клетки на краю раны поляризуются и мигрируют в раневое пространство. Как видно из представленных данных, тиофосфатный олигонуклеотид Skeen-11 значительно снижает скорость миграции клеток меланомы: скорость заращения царапин в контроле составила $14,3\% \pm 3,3$ через 24 ч, $17,3\% \pm 3,3$ через 72 ч инкубации, тогда как Skeen-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 ($p < 0,05$) (рис. 3.9).

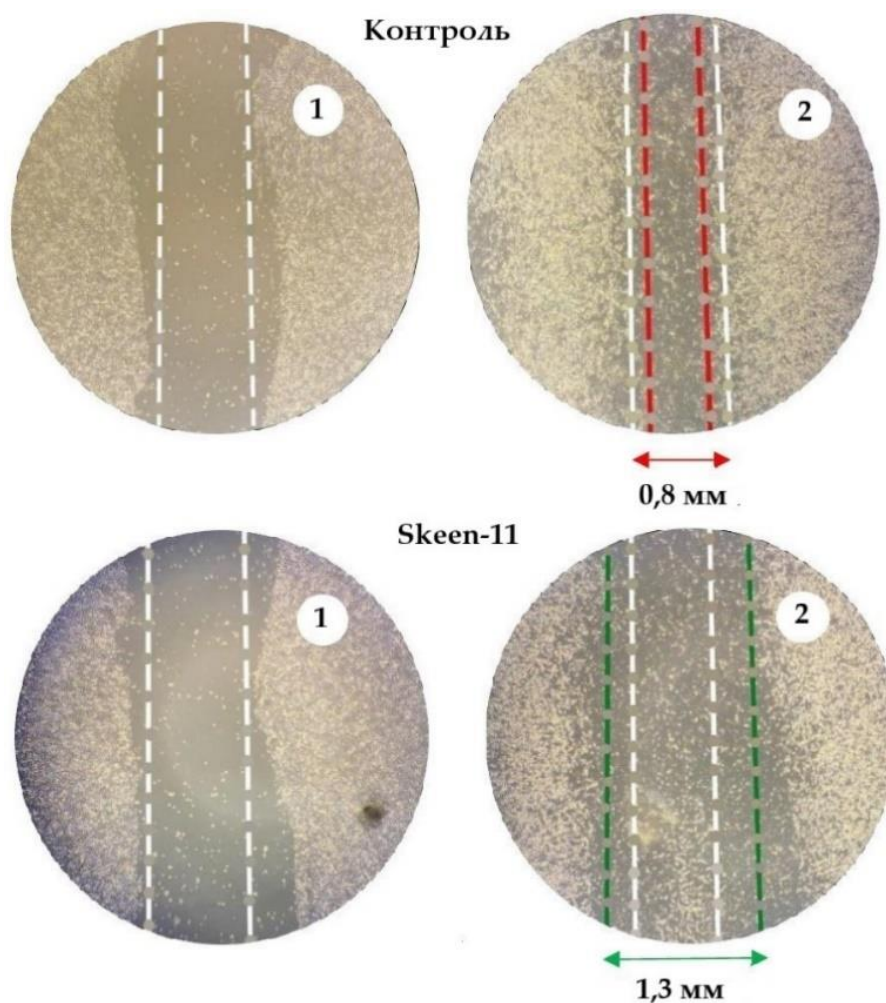


Рисунок 3.9 – Метод заращения царапины (scratch-test) : контроль — 1 — 1-е сутки от начала эксперимента, царапина = 1 мм; 2 — 3-е сутки от начала эксперимента, царапина = 0.8 мм; Skeen-11— 1 —1-е сутки от начала эксперимента, царапина = 1 мм; 2 — 3-сутки от начала эксперимента, царапина = 1.3 мм; фотофиксирование клеток проводили под микроскопом каждые 24 ч в течение 3 суток.

Таким образом, тАСО Skeen-11 может ингибировать и обращать вспять процесс миграции клеток меланомы раскрывает его потенциал в качестве антиметастатического агента. Это фундаментально расширяет его терапевтический профиль: соединение не только подавляет рост первичной опухоли (через апоптоз и остановку клеточного цикла), но и потенциально препятствует диссеминацию клеток.

3.6. Сравнение влияния на жизнеспособность клеток Clone M-3 антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 с помощью трансфекции и без трансфецирующих агентов

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 (аналог Lipofectamin) 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 (табл. 3.2).

Таблица 3.2 – Жизнеспособность клеток Clone M-3 с трансфецирующим агентом и без трансфецирующего агента

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

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

3.7. Снижение экспрессии гена мРНК глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клетках меланомы мышей линии Clone M-3 под действием фрагмента антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11

Для изучения подавления экспрессии гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клеточной линии меланомы мышей Clone M-3, в культуральную среду в виде свободного олигонуклеотида вводили Skeen-11 в 2-х разных концентрация: 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'-А-СAG-TGG-ATG-TCC-TAG-GTG-3'.

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 ($p < 0,05$) (рис. 3.10).

Результаты данного эксперимента являются ключевым доказательством механизма действия тАСО Skeen-11. Установлено, что его противоопухолевая активность реализуется через подавление экспрессии гена *Г6ФД* в дозозависимой манере.

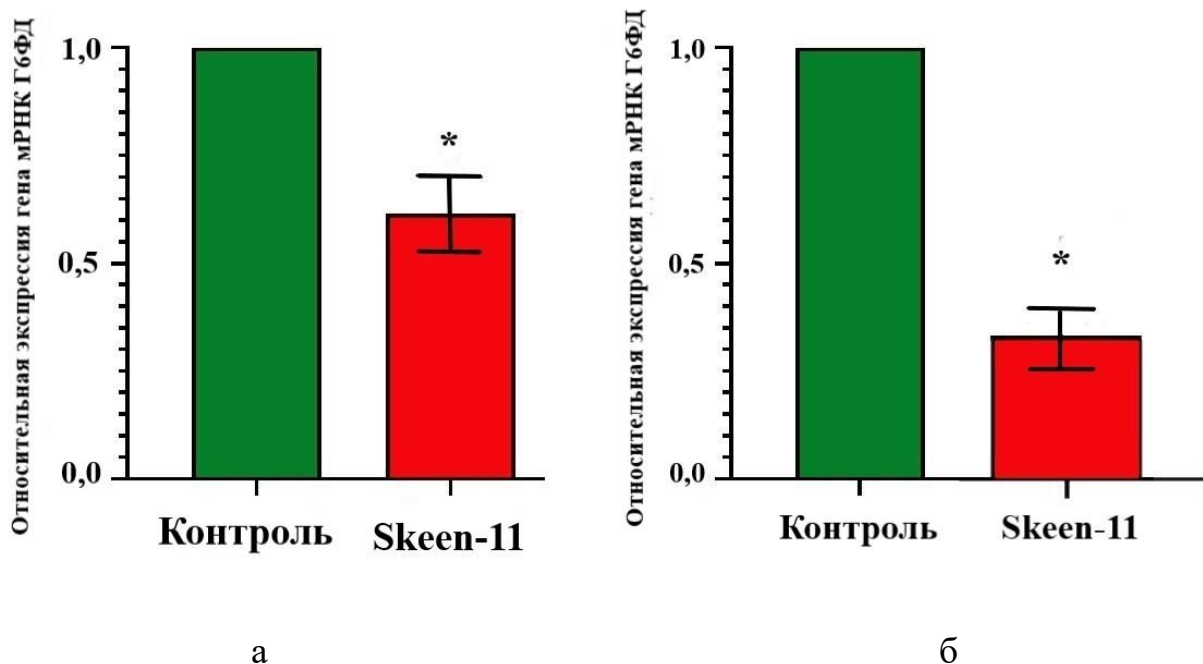


Рисунок 3.10 – Антисмысловый олигонуклеотид Skeep-11 ингибирует экспрессию гена *Г6ФД* в зависимости от концентрации, в клеточной линии меланомы мышей Clone M-3 на 12 часов после обработки тиофосфатным АСО Skeep-11: а – 10 мкг, б – 20 мкг. Данные представляют собой средние значения и стандартные ошибки 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 ($p < 0,05$).

3.8. Результаты выполнения колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток

При процентном расчете метаболической активности контрольную группу клеток (клетки без олигонуклеотида) брали за 100%. При концентрации 2 мкг Skeep-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 LC100 (рис. 3.11).

LC100 – 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 дыхательную активность менее 10% можно условно принять за LC100.

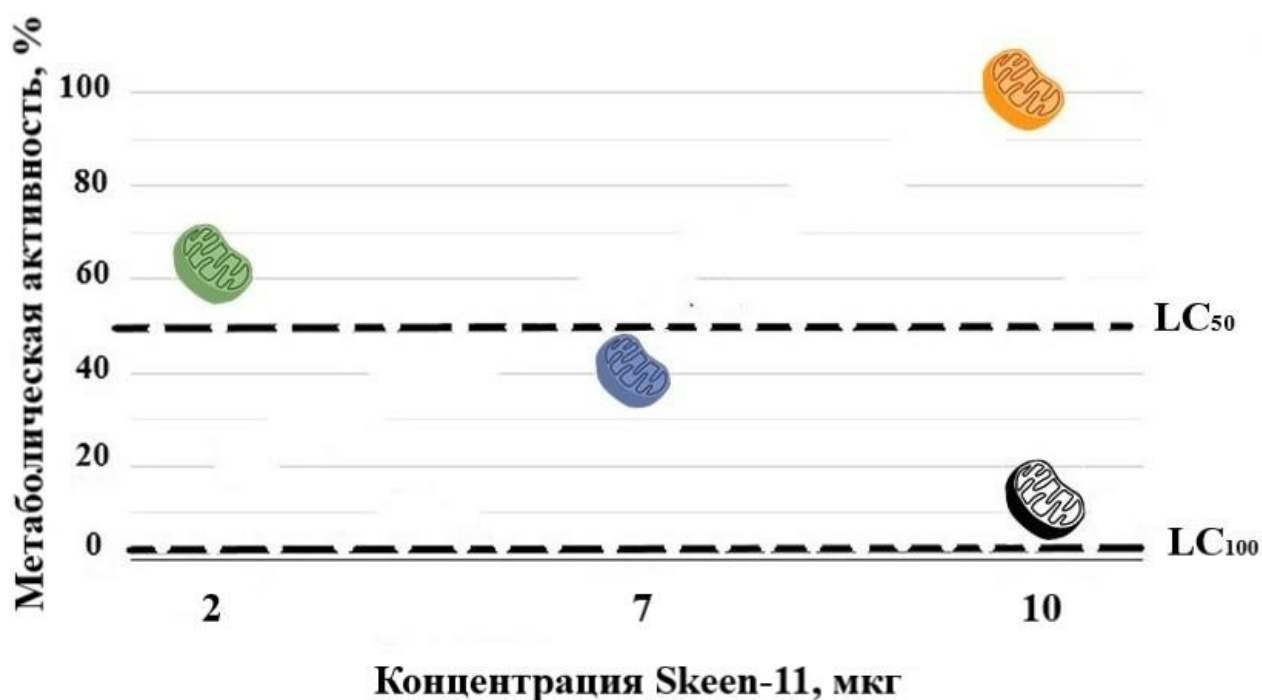


Рисунок 3.11 – Метаболическая активность клеток Clone M-3 после инкубации тАСО Skeep-11 в разных концентрациях на 1×10^3 клеток. Контроль – зеленый цвет, экспериментальная группа обозначена оранжевым цветом.

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

Тиофосфатный антисмысловый олигонуклеотид Skeep-11 оказывает мощное дозозависимое ингибирование митохондриального дыхания в клетках меланомы, что указывает на критическое нарушение энергетического метаболизма как на один из ключевых механизмов его цитотоксического действия.

3.9. Нуклеазная активность антисмыслового олигонуклеотида Skeep-11 в сыворотке крови мышей и в гомогенате клеток линии Clone M-3

Важной особенностью препарата, используемого в терапевтических целях *in vitro* и *in vivo* является его стабильность к действию внутриклеточных и сывороточных нуклеаз. На рисунке показаны результаты анализа стабильности тиофосфатного антисмыслового олигонуклеотида Skeep-11 в гомогенате клеток Clone-M3. 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.

Как видно из представленных на рисунках данных, тиофосфатный олигонуклеотид Skeep-11 подвергается воздействию сывороточных нуклеаз на 36 час после взаимодействия (рис. 3.12). Относительно тиофосфатного олигонуклеотида в гомогенате клеток, то на 36 час инкубации мы видим остаточное свечение Skeep-11 (рис. 3.13).

Проведенный анализ стабильности демонстрирует, что тиофосфатный олигонуклеотид Skeep-11 обладает устойчивостью к действию нуклеаз в биологических средах, что является важным фактором для оценки его терапевтического потенциала.

Данные указывают на начало деградации Skeep-11 сывороточными нуклеазами к 36 часу инкубации. Это характеризует умеренную, но стабильность

молекулы в биологических жидкостях, содержащих высокую активность нуклеаз.

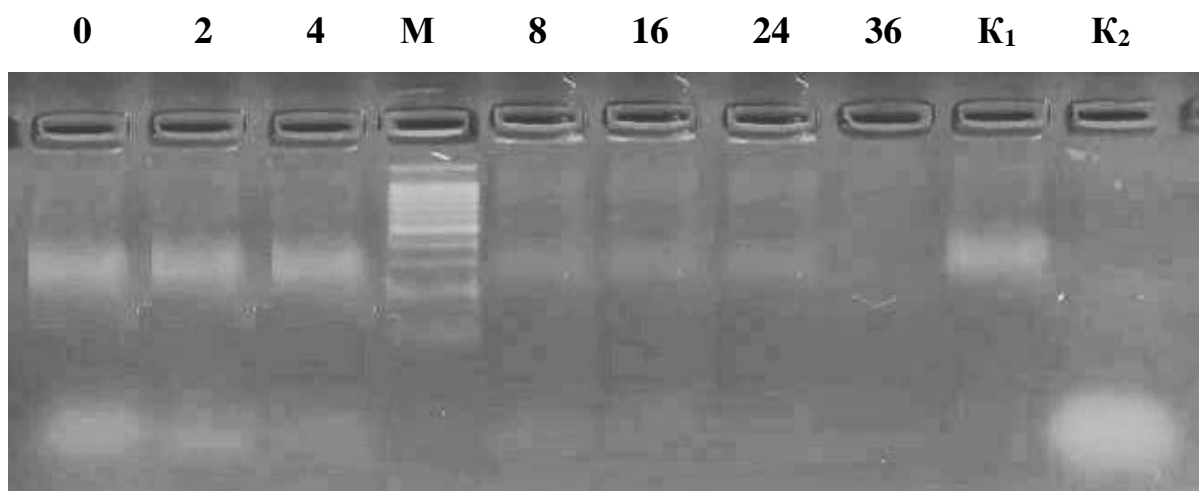


Рисунок 3.12 – Электрофореграмма нуклеазной активности тАСО Skeep-11 в сыворотке крови мышей. 0-36 часы инкубации; М – маркер молекулярного веса; К1 – контроль сыворотка; К2 – контроль тАСО Skeep-11.

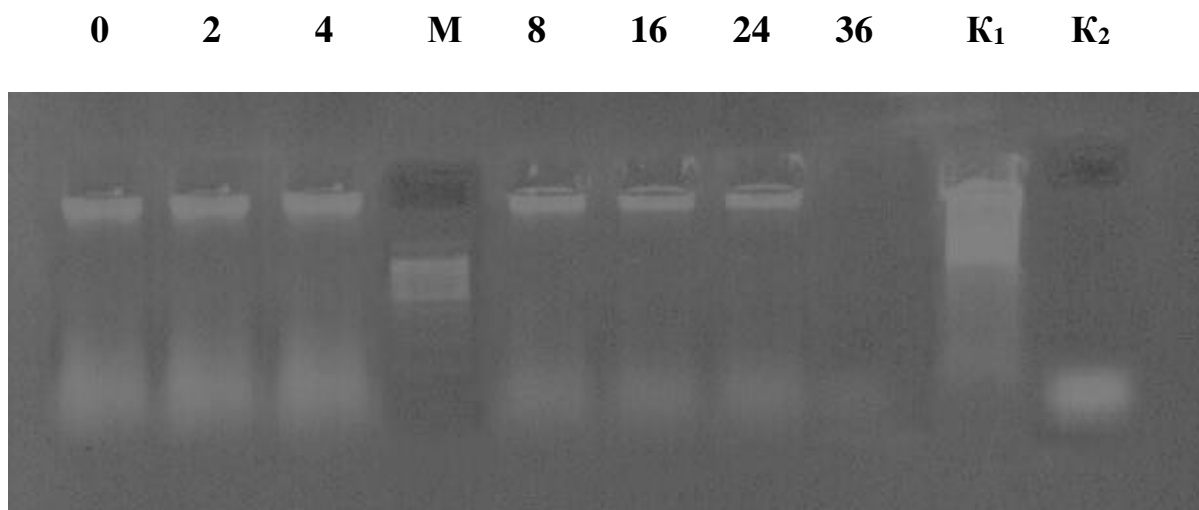


Рисунок 3.13 – Электрофореграмма нуклеазной активности тАСО Skeep-11 в гомогенате клеток линии Clone-M- 3. 0-36 часы инкубации; М – маркер молекулярного веса; К1 – контроль гомогенат клеток; К2 – контроль тАСО Skeep-11.

Наличие "остаточного свечения" Skeep-11 в гомогенате клеток через 36 часов свидетельствует о том, что: тиофосфатная модификация обеспечивает определенную защиту от внутриклеточных нуклеаз по сравнению с немодифицированными олигонуклеотидами.

3.10. Результаты исследования эффектов антисмысловых олигонуклеотидов Skeep-11 и OligoA-11 на опухолевой модели мышей

Для оценки противоопухолевого действия тАСО Skeep-11, мышам были подкожно трансплантированы клетки меланомы мышей Clone M-3. На 16-18-е сутки, после возникновения пальпируемых опухолей, мышам проводили перитуморальные инъекции препарата тАСО каждые сутки, в течении 7-ми дней. После подкожного введения, АСО всасываются быстро и вводятся в кровоток (рис. 3.14).

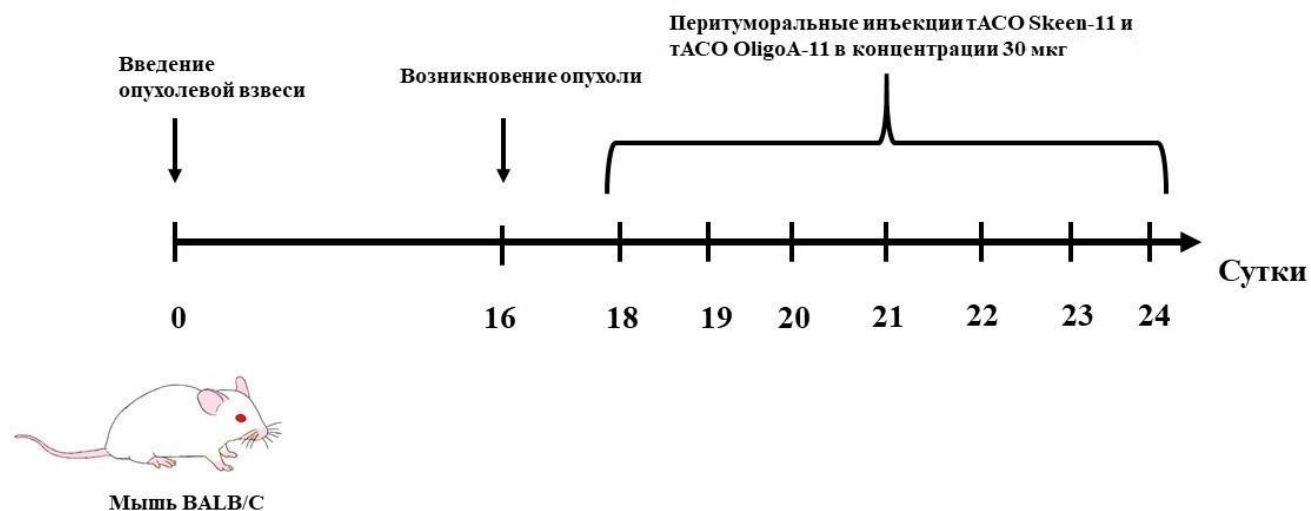


Рисунок 3.14 – Схема *in vivo* эксперимента, включающая подкожную трансплантацию клеток меланомы мышей Clone M-3 мышам линии BALB/c и перитуморальные инъекции тАСО Skeep-11 и контрольного тАСО A-11. Инъекции выполняли на 12, 16, 12, 20 и 24 день после трансплантации опухолевых клеток.

В ходе эксперимента было обнаружено уменьшение размера опухоли в ответ на применение Skeep-11. В среднем размер опухоли уменьшался на 15% в день в группе, получавшей Skeep-11 в течение 7 дней (рис. 3.15, в), тогда как в контрольной группе размер опухоли увеличивался на 7% в день (рис. 3.15, а).

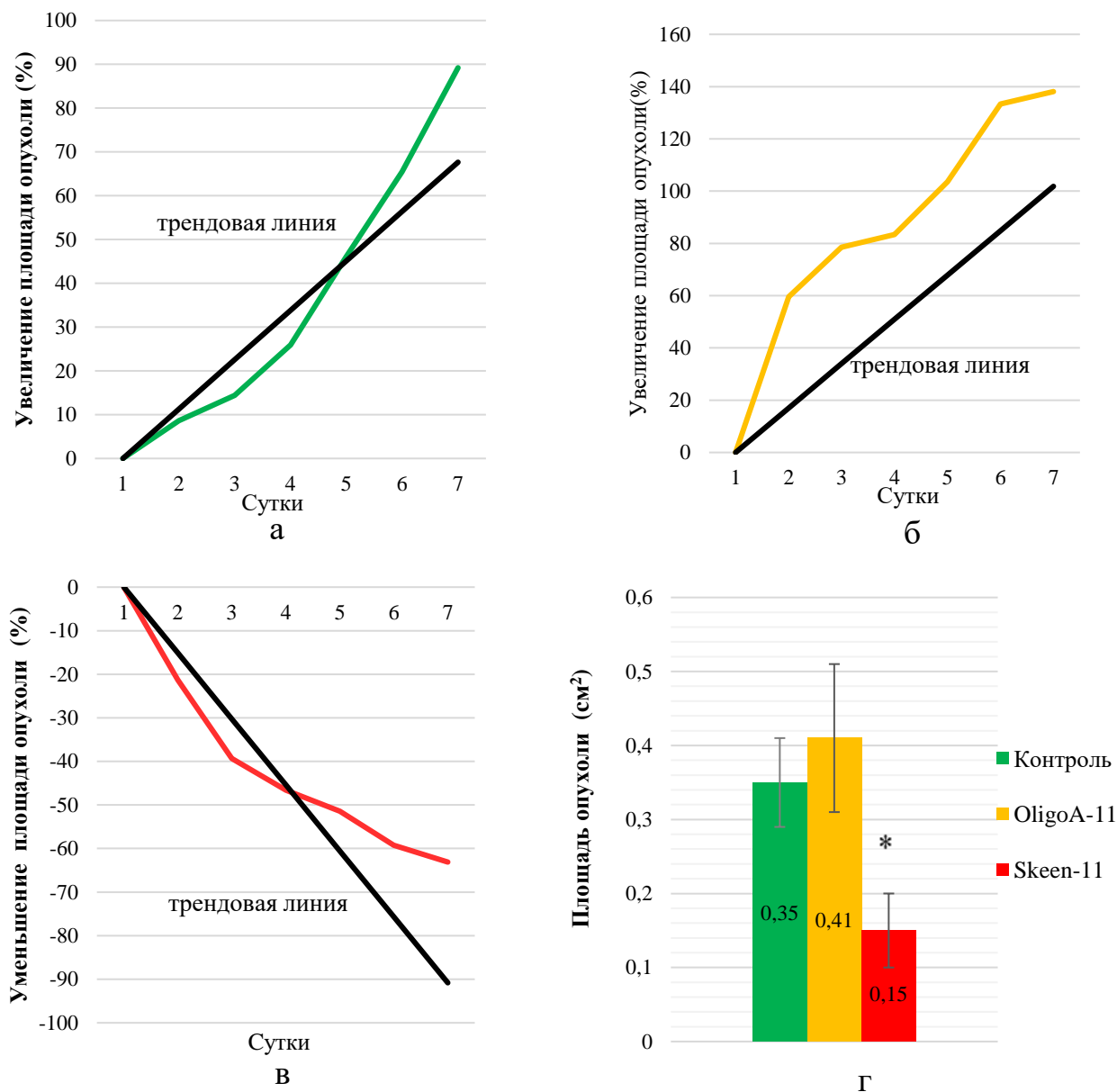


Рисунок 3.15 – Динамика среднего увеличения площади опухоли для разных экспериментальных групп на 7^{-е} сутки эксперимента: а – контроль; б – OligoA11; в – Skeep-11; г – средняя площадь опухоли. Достоверная разница по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) отмечена*; значения показаны со средними значениями и SE.

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 Skeep-11 ($0,15 \pm 0,05 \text{ см}^2$) ($p < 0,05$) (рис. 3.15, 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. Интересно, что когда лечение Skeep-11 было прекращено на 8-й день, площадь опухоли у этих животных достигла размера таковой у контрольных животных через 2 дня, доказывая, что Skeep-11 ингибирует агрессивный рост клеток меланомы. Рисунки 3.16-3.19 демонстрируют внешний вид опухолей, привитых экспериментальным мышам.



Рисунок 3.16 – Асцитная опухоль, развившаяся после подкожной инъекции в брюшину, (2×10^6 клеток).

Опухоль имеет размеры до 1,5 см в диаметре, деформирует заднюю часть туловища животного, имеет неровные внешние контуры и характерную пигментацию, видимую под кожей задней части туловища и брюшной стенкой.

На разрезе при вскрытии животного данное опухолевое образование имеет капсулу, образованную соединительной тканью организма реципиента. Структура опухоли неоднородная, клетки содержат пигмент, в интратуморозных и окружающих участках кровоизлияния и гиперемия артериальных и венозных сосудов (рис. 3.17). Опухоли принципиально не отличаются в зависимости от места их локализации (рис. 3.18).



Рисунок 3.17 – Инкапсулированная опухоль, образовавшаяся после перевивки из культуры клеток.



Рисунок 3.18 – Образовавшаяся опухоль на 18 день после перевивки культуры клеток Clone M-3, подкожно.

При этом отмечен явный видимый эффект от проводимой терапии АСО в эксперименте при использовании его в качестве таргетного препарата (рис. 3.19).



Рисунок 3.19 – Редукция опухоли на 7^е сутки после лечения Skeep-11 в концентрации 30 мкг.

3.11. Получение сублинии клеток из опухоли меланомы мышей Clone М-3

После возникновения опухолей, перевиваемый мышам из клеточной линии меланомы мышей Clone М-3, участки опухоли не леченной группы контроля обирали для дальнейшего пересева в культуру клеток и получения новой сублинии меланомы мышей. Результаты показала механическая дезагрегация ткани с помощью первичного экспланта, выход клеток на первые сутки составил $7 \times 10^5 \pm 7 \times 10^3$, что в свою очередь показывает высокое количество выхода клеток. Полученная сублиния была названа Clone А-11 (рис. 3.20).

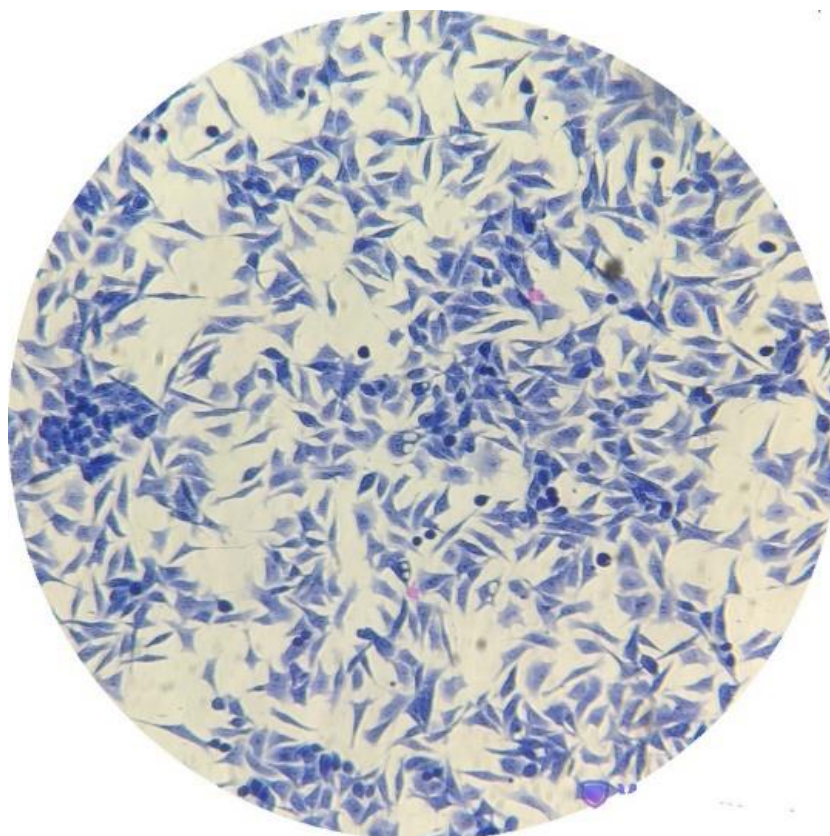


Рисунок 3.20 – Внешний вид сублинии Clone A-11, перевитой из клеточной линии меланомы мышей Clone M-3 (окраска по методу Гимзы). Объектив 40х.

Морфологически культура состоит из клеток с достаточно высоким полиморфизмом, что допустимо для злокачественных опухолей с высоким потенциалом роста. Она представлена полигональными клетками с гиперхромными крупными ядрами.

В дальнейшем был выполнен эксперимент (рис. 3.21). Он включал такие основные этапы: оценка жизнеспособности раковых клеток линии Clone-M3 в реальном времени на анализаторе xCELLigence RTCA DP Analyzer при воздействии ACO Skeen-11; трансплантация культуры клеток Clone-M3 модельным животным (мышам); развитие опухолей в межлопаточном пространстве у мышей через 3 недели после трансплантации клеток; лечение раковых опухолей Skeen-11; инокуляция раковых клеток из участка опухоли обратно в культуру.

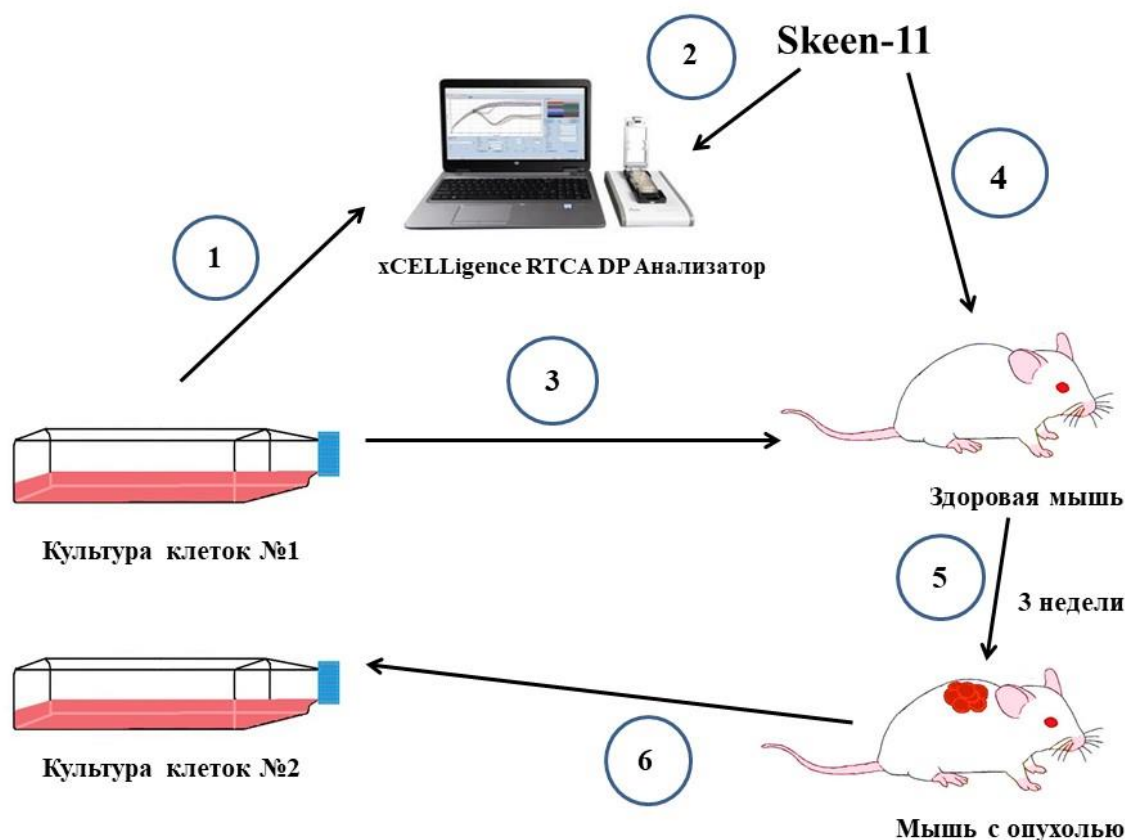


Рисунок 3.21 – Основные этапы эксперимента: 1-2 - оценка жизнеспособности раковых клеток линии Clone-M3 в реальном времени на анализаторе xCELLigence RTCA DP Analyzer при воздействии антисмыслового олигонуклеотида Skeep-11; 3 - трансплантация культуры клеток Clone-M3 модельным животным (мышам); 4 - появление опухолей в межлопаточном пространстве у мышей через 3 недели после трансплантации клеток; 5- лечение раковых опухолей Skeep-11; 6 - инокуляция раковых клеток из участка опухоли обратно в культуру.

3.12. Результаты иммуногистохимического исследования опухолей после терапии антисмысловыми олигонуклеотидами

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 маркер 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 ($p < 0,01$). По маркеру 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 (рис. 3.22).

В данном эксперименте при иммуногистохимическом окрашивании на апоптоз-ассоциированные белки Bcl-2 и FAS дало интересный результат. 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.

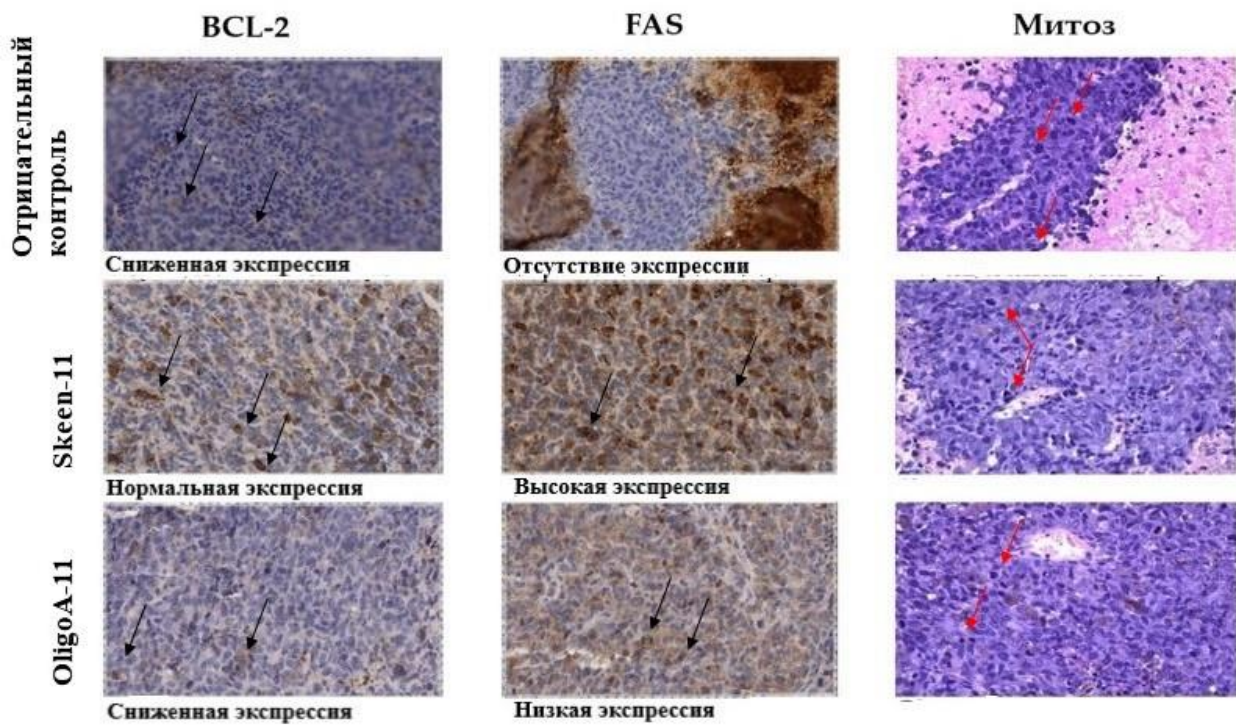


Рисунок 3.22 – Гистологическое исследование опухолей меланомы в разных группах эксперимента (увеличение 400х) *черные стрелки – экспрессирующиеся клетки; красные стрелки – митотические клетки.

3.13. Анализ токсичности тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов Skeen-11 и OligoA-11 после влияния на организм модельных животных

3.13.1 Результаты иммуногистохимического исследования внутренних органов мышей после терапии антисмысловыми олигонуклеотидами

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 (рис 3.23 В). 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 (ЯЦО) (табл. 3.3). 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 апоптозных 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.

Исследовали не только показатели отдельных клеток печени, но и ее структурно-функциональную единицу – печеночную дольку, изменяли такие гистотопографические параметры как относительные площади гепатоцитов и синусов печеночной дольки, также подсчитывали и количество двуядерных клеток (табл. 3.4).

Таблица 3.3 – Морфометрические параметры печени контрольных и опытных животных после терапии АСО (M±Sd)

Показатель	OligoA-11	Skeen-11	Контроль «-»	Контроль «+»
S клетки, мкм	507,04±172,9*	461,05±171,91	381,80±186,43	420±130,04
d клетки, мкм	34,03±6,36*	31,80±6,62* ^Δ	28,11±7,18	30,12±5,56
S ядра, мкм	90,96±28,30*	82,79±33,69	75,64±32,87	79,43±34,22
d ядра, мкм	11,97±1,92*	11,37±2,42	10,92±2,39	11,13±2,02
ЯЦО	0,24±0,10	0,23±0,08	0,27±0,07	0,25±0,06

* - достоверные отличия между контрольной и экспериментальной группой по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$

Δ – достоверные отличия между двумя экспериментальными группами по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$

Таблица 3.4 – Относительные площади гепатоцитов и синусов печеночной доли и количество двуядерных клеток (Me[Q1;Q4])

Показатель	OligoA-11	Skeen-11	Контроль «-»	Контроль «+»
Относительная площадь гепатоцитов, %	85,0 [82.0;88.0]	80,0 [74.0;85.0]	83,5 [80.0;87.0]	81,5 [80.5;82.0]
Относительная площадь синусов, %	15,0 [12.0;18.0]	20,0 [15.0;26.0]	16,5 [13.0;20.0]	20 [14.0;27.0]
Кол-во двуядерных клеток, шт	9,0 [7.0;15.0]	17,0 [11.0;24.0] ^Δ	13,0 [9.0;17.0]	16,0 [9.0;19.0]

Δ – достоверные отличия между двумя экспериментальными группами по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$

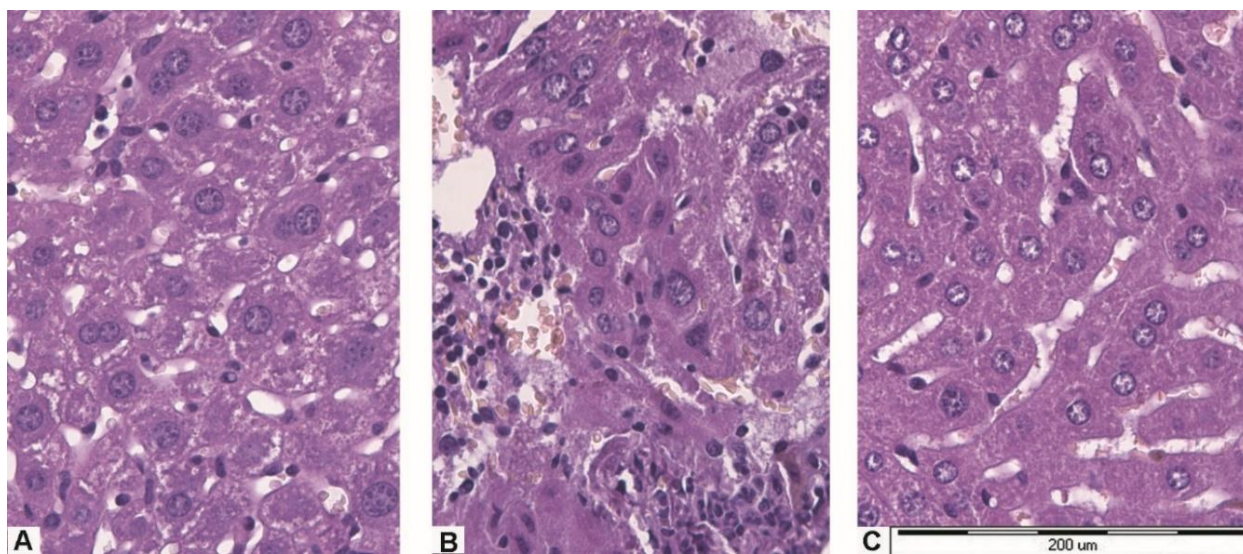


Рисунок 3.23 – Печень мыши. Гематоксилин-эозин. Об. 40х. А – контрольная группа, В – группа OligoA-11, С – группа Skeen-11.

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 (рис. 3.24, 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.

У животных группы Skeen-11 капиллярная сеть клубочков полнокровна. Наблюдается стаз эритроцитов. Стенки капсулы Шумлянско-Боумена часто содержат эпителиоциты проксимальных канальцев. Местами наблюдается лимфоидная инфильтрация периваскулярного пространства и межуточной ткани, а также пространства синуса почки. Мочевое пространство почечных телец расширено (рис. 3.24, С), в юкстамедуллярных нефронах практически отсутствует. Местами встречается дистрофия, некроз эпителиоцитов проксимальных канальцев, их десквамация. Просвет собирательных трубочек значительно расширен, имеется белковое содержимое.

В экспериментальных группах по отношению к контролю отмечается увеличение площади почечного тельца, прирост наружных размеров проксимальных канальцев за счет высоты эпителия, достоверно отличающийся от контроля в группе Skeen-11, что может свидетельствовать о компенсаторных изменениях вследствие активной фильтрации первичной мочи и нарушения реабсорбции органических веществ. В этой же группе увеличен просвет дистального канальца и собирательных трубочек. В группе OligoA-11 размеры отдельных элементов нефрона также увеличены, однако в значительно меньшей степени. При этом повреждения клеток выражены значительно ярче, на основании чего можно предположить о более высокой токсичности вещества.

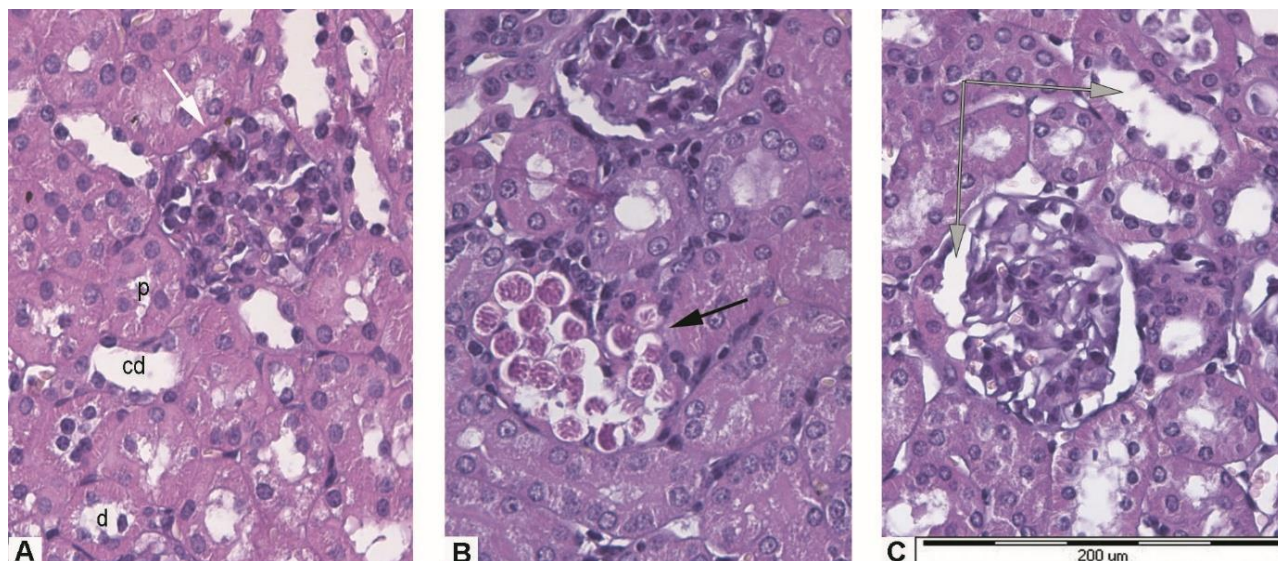


Рисунок 3.24 – Кортикисое вещество почки. Гематоксилин-эозин. Об. 40х. А – контрольная группа, В – группа OligoA-11, С – группа Skeen-11, р – проксимальный каналец, d – дистальный каналец, cd – собирательная трубочка, белая стрелка – почечное тельце, черная стрелка – десквамация эпителия проксимальных канальцев и скопление лимфоцитов рядом с ним, серая стрелка – расширенное мочевое пространство почечного тельца и просвет дистального канальца.

3.13.2 Результаты биохимического анализа сыворотки крови мышей после терапии антисмысловыми олигонуклеотидами на оценку токсичности

Известно, что тиофосфатные олигонуклеотиды имеют некоторые недостатки. Главным недостатком являются побочные эффекты, вызванные некоторыми неспецифическими 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.

Основные показатели описаны ниже.

ALAT (аланинаминотрансфераза) и ASAT (аспартатаминотрансфераза) – ферменты, наиболее активны в печени. Если клетки печени повреждены, ферменты поступают в кровь в большом количестве и служат маркером печеночной дисфункции. ALP (щелочная фосфатаза) – печеночный фермент, уровень которого повышается при онкологии и гепатотоксических препаратах. UREA (мочевина) – основной продукт распада белков. Накапливается при почечной недостаточности. CREA (креатинин) – азотсодержащее вещество, главный показатель деятельности почек. Чем выше его уровень, тем хуже работают почки. TP (общий белок) – используется для оценки белкового обмена. Оценивает все белковые фракции в организме.

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

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 U\L и на 27,76 U\L по сравнению с «-» контролем. OligoA-11 достоверно различается от «+» контроля и показатель увеличен почти в 3 раза (таблица 3.5).

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 U\L и на 27,76 U\L по сравнению с «-» контролем. OligoA-11 достоверно различается от «+» контроля и показатель увеличен почти в 3 раза.

Показатели ASAT также повышены по двум олигонуклеотидам. По сравнению с «+» контролем Skeen-11 повышен на 431,78 U\L и у OligoA-11 на 975,36 U\L. Данные результаты свидетельствуют о тяжелых функциональных

нарушениях в печени у опытных животных. Однако, у «-» контроля есть достоверные различия по отношению к «+» контролю, он повышен 336,36 U/L это может говорить не только о токсическом влиянии АСО на печень, но и о том, что сама опухоль вызывает повышение данных ферментов. ALP у опытных групп находится в пределах нормы, по сравнению с отрицательным контролем, что также свидетельствует о повышении фермента из-за наличия опухоли. Что касается UREA, то у опытных групп наблюдаются достоверные отличия от «-» контроля, показано уменьшение показателей от «+» контроля почти на 2 mmol/L. Уменьшение CREA почти в 2 раза наблюдается у группы Skeen-11, по сравнению с эталонными значениями «+» контроля. По показателю общий белок, достоверных различий между группами не было (рис. 3.25)

Таблица 3.5 – Основные биохимические показатели крови мышей, после терапии тАСО

АСО \ Показатели	Контроль «-»	Контроль «+»	Skeen-11	OligoA-11
Аланинамино-трансфераза	54±3,6	31,68±9,58	81,76±6,5* ^Δ	106,25±27,3*
Аспаргатамино-трансфераза	458±63,8*	124,64±61,01	556,42±88,2*	1100±293*
Щелочная фосфатаза	240±72,2	98,4±39,65	74,2±14,75	31,75±3,03 ^Δ
Мочевина	3,02±0,4	7,5±3,53	4,47±0,37 ^Δ	4,43±0,40 ^Δ
Креатинин	15,5±0,3	36,72±12,89	17,2±0,25 ^Δ	16,15±1
Общий белок	28,2±0,4	83,2±25,37	27,74±0,68	24,65±3,14

* - достоверные отличия между положительной контрольной группой и экспериментальными группами (Skeen-11 и OligoA-11) по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$

Δ – достоверные отличия между отрицательной контрольной группой и экспериментальными группами (Skeen-11 и OligoA-11) по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$

Из этого следует, что тиофосфатные АСО не оказывают особого токсического влияния на почки, в печени опытных групп наблюдаются функциональные нарушения, возможно, связанные с наличием опухолей.

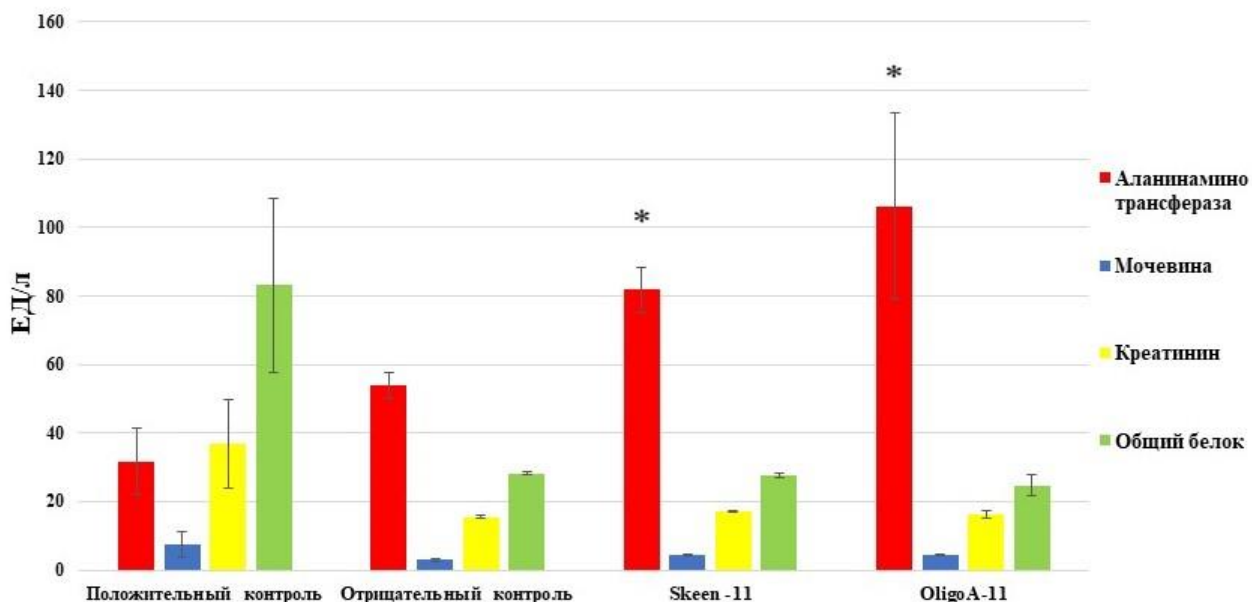


Рисунок 3.25 – Средние значения по основным биохимическим показателям крови у различных экспериментальных групп мышей, после терапии АСО. * – достоверные отличия между отрицательной контрольной группой и экспериментальными группами (Skeep-11 и OligoA-11) по t-критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

После внутривенного введения олигонуклеотидов самые высокие концентрации обнаруживаются в почках. Эти высокие концентрации, видимо связаны с инфильтрацией макрофагов и моноцитов, наряду с внутрицитоплазматическими эозинофильными гранулами и вакуолизацией в почечной ткани. Олигонуклеотиды могут быть использованы для избирательного воздействия на печень. Одной из возникающих морфопатологических особенностей после введения является гипертрофическое изменение клеток Купфера из-за базофильных включений, которые могут быть связаны с дозой.

3.13.3 Результаты клинического анализа крови мышей после терапии антисмысловыми олигонуклеотидами

Воспаление, связанное с меланомой, может играть важную роль в прогрессировании заболевания и исходе заболевания. Для этого, мы исследовали, клетки периферической крови. Сравнительный анализ данных общего анализа крови показал достоверные отличия как между группами опыта, так и между контрольными группами. Для анализа полученных данных мы ориентировались на референсные значения для положительного контроля у мышей (животные без опухолей).

Анализ содержания эритроцитов в крови разных экспериментальных групп показал, что красные кровяные тельца находятся в пределах нормы. Достоверных различий обнаружено не было (рис. 3.26, б). При исследовании тромбоцитов в разных экспериментальных группах было установлено, что количество тромбоцитов в группах Skeen-11 и OligoA-11 было увеличено на 237 ед. по сравнению с положительным контролем, и на 249 ед. соответственно. Это объясняется тем, что тиофосфатные олигонуклеотиды при повышенной дозе, могут увеличивать количество тромбоцитов в крови, это можно контролировать корректировкой дозы. В отрицательном контроле показатель увеличился на 201 единицу, что так же известно, что при наличии онкологических заболеваний этот показатель увеличивается (рис. 3.26, а).

Показатели лейкоцитарной активности у отрицательной контрольной группы превысило нормальное значение на $28\% \pm 1,2\%$ по сравнению с положительным контролем, группами Skeen-11 на $27\% \pm 1,1\%$ и OligoA-11 на 18%. Это говорит о том, что лечение тАСО Skeen-11 значительно снижается воспалительный процесс опухолевой и близлежащих тканей (рис. 3.26, в).

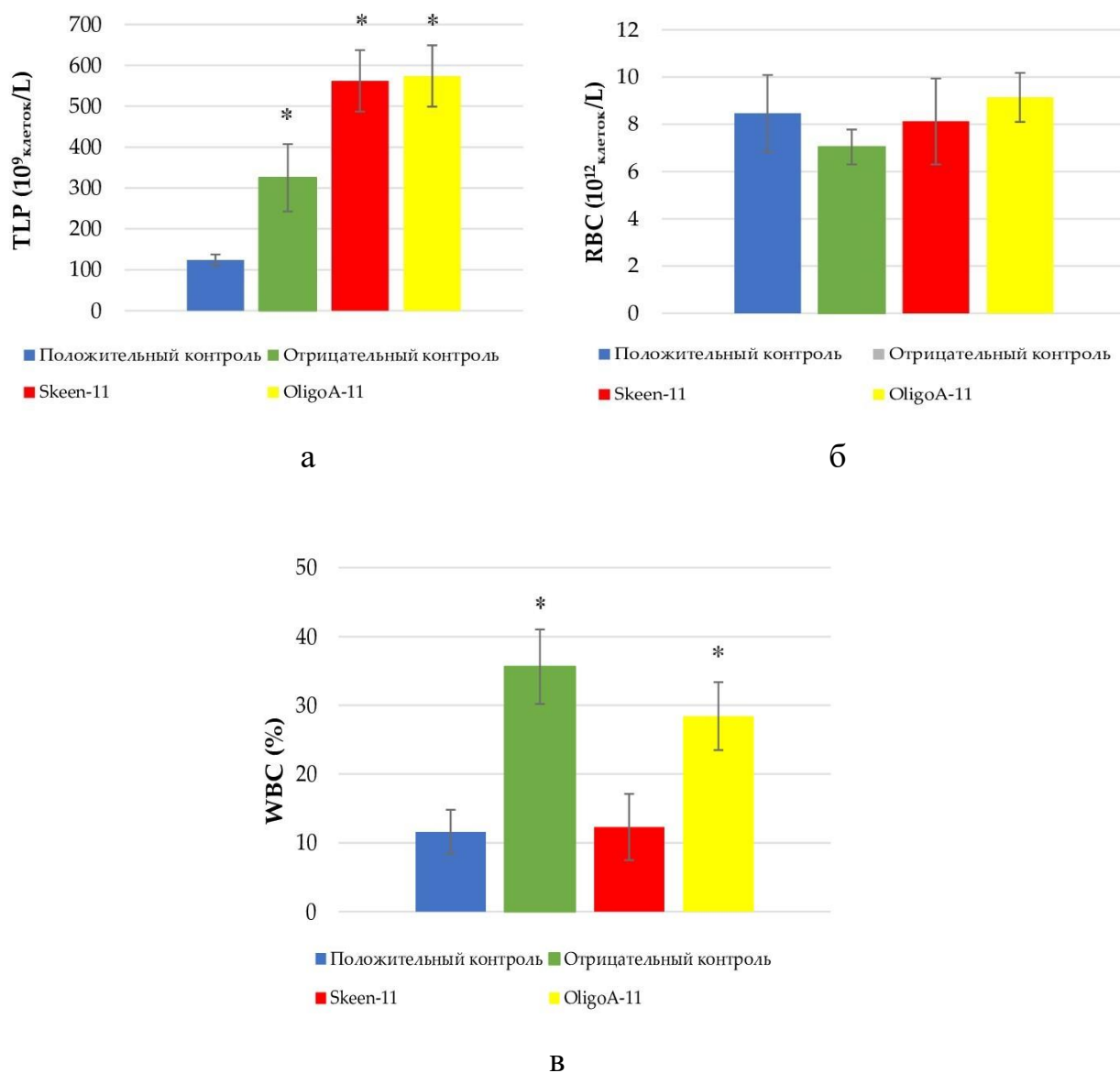


Рисунок 3.26 – Средние гематологические показатели крови мышей после лечения тиофосфатными антисмысловыми олигонуклеотидами; а – тромбоциты, б – эритроциты, в – лейкоциты. *достоверная разница по сравнению с контрольными группами ($p < 0,05$); значения показаны со средними значениями и SE.

Гематологический профиль подтверждает, что тАСО Skeen-11 обладает значимым противовоспалительным действием на системном уровне, купируя опухоль-ассоциированную лейкоцитарную активацию. При этом выявленные побочные эффекты (тромбоцитоз) являются управляемыми и типичными для данного класса соединений, что не отменяет высокого терапевтического потенциала Skeen-11.

РАЗДЕЛ 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Линии раковых клеток можно легко использовать в высокопроизводительном скрининге для обнаружения лекарств и связывания геномных изменений с реакцией на лекарство [137]. Однако некоторые *in vitro* часто трудно или невозможно воспроизвести *in vivo*, и пригодность клеточных линий в качестве моделей опухолей ставится под сомнение [138]. Таким образом, необходимо проверить данные, полученные из линий раковых клеток, на модели животных.

Одним из центральных ферментов пентозофосфатного пути (ПФП) является Г6ФД [77]. Недавно исследования с полидактином (природная молекула, обнаруженная в *Polygonum cuspidatum* и других растениях) показали, что полидактин напрямую ингибирует Г6ФД, вызывая окислительно-восстановительный дисбаланс. Это, в свою очередь, приводит к стрессу эндоплазматического ретикулума, остановке клеточного цикла и апоптозу и вызывает значительное снижение выживаемости раковых клеток наряду со снижением уровня НАДФН [78]. Данные *in vitro* показали, что подавление Г6ФД нарушает миграцию клеток, инвазию и эпителиально-мезенхимальный переход. Кроме того, нокдаун Г6ФД активировал путь JNK, который затем блокировал ось АКТ/GSK-3 β /Snail, индуцируя экспрессию E-кадгерина и транскрипционно регулируя экспрессию MGAT3, тем самым способствуя разделяющему пополам GlcNAc-разветвленному N-гликозилированию E-кадгерина [79]. Кроме того, было показано, что экспрессия и активность Г6ФД положительно коррелирует с экспрессией мРНК и белков циклинов D1 и E, p53 и S100A4. Эти данные свидетельствуют о том, что Г6ФД может регулировать клеточный цикл посредством влияния на эти факторы, тем самым косвенно регулируя рост меланомы. Повышенная экспрессия p53, наблюдаемая *in vitro*, хорошо коррелировала с высокой активностью Г6ФД, что позволяет предположить, что белок p53 стимулируется Г6ФД [78]. Снижение уровня Г6ФД в клеточных

линиях меланомы приводит к снижению фосфорилированного STAT5, важного для неконтролируемого роста клеток. Экспрессия белка при соотношении STAT3/5 и фосфорилированном соотношении STAT3/5 снижена в клетках меланомы с дефицитом *Г6ФД*. Отсутствие *Г6ФД* в клетках меланомы мыши усиливает апоптоз за счет повышения уровня FAS и снижения уровней Bcl-2 и Bcl-xL [80]. Таким образом, *Г6ФД* играет чрезвычайно важную роль в управлении клетками меланомы, участвуя во многих каскадах биохимических реакций, включая антиапоптоз и быстрый рост, что делает возможным их агрессивный характер.

Результаты этих исследований показывают перспективность использования тиофосфатных антисмысловых олигонуклеотидов для нарушения пролиферативной активности клеток меланомы. Однократное применение олигонуклеотидов в течение 12 часов в культуре клеток снижало пролиферацию на 62%, а ежедневное введение олигонуклеотидов привитым мышам с меланомой приводило к уменьшению размера опухоли на 57% по сравнению с размером опухоли в контрольной группе. Иммуногистологическое окрашивание на маркеры Bcl-2 и FAS дало интересный результат. Известно, что при злокачественной трансформации экспрессия этих маркеров снижается. Впоследствии снижение экспрессии Bcl-2 делает опухоль менее привлекательной для иммунной системы [139, 140]. Рецептор FAS играет важную роль в запуске механизма апоптоза извне посредством активации каспаз [141, 142]. Таким образом, снижение экспрессии FAS и Bcl-2 ухудшает прогноз лечения. В нашем эксперименте при иммуногистологическом окрашивании в группе лечения отмечено более интенсивное окрашивание на маркеры FAS и BCL-2, что в свою очередь свидетельствует о повышенной экспрессии этих маркеров и более благоприятном прогнозе лечения. Отдельно следует отметить, что при гистологическом исследовании отмечено достоверное снижение количества амитозов в группе лечения по сравнению с контрольной группой, наряду с наблюдением некроза новообразованных клеток. Обнаруженный апоптотический эффект на ППС от применения Skeen-11 также был

зафиксирован ранее. Недавно было показано, что он блокирует ген *Г6ФД*, вызывая накопление активных форм кислорода и сильное увеличение стресса эндоплазматического ретикулума. После этих процессов происходит блокировка клеточного цикла в S-фазе, около 50% апоптоза и 60% ингибирование инвазии рака языка *in vitro* [77]. В нашем эксперименте путь апоптоза клеток меланомы приводил к уменьшению опухоли у модельных животных. Представленные здесь результаты не объясняют напрямую механизмы гепатотоксичности. Однако мы предполагаем, что гепатотоксический потенциал связан со склонностью олигонуклеотида связываться с определенными белками. Хорошо известно, что олигонуклеотиды могут взаимодействовать со специфическими белками [143], причем эти взаимодействия могут зависеть от последовательности, как в случае с Toll-подобными рецепторами, связывающими олигонуклеотиды, содержащие CG-динуклеотиды [144]. Наиболее часто сообщалось о серьезной дозолимитирующей острой токсичности введения тиофосфатных АСО: транзиторная активация каскада комплемента, удлинение частичного тромбoplastинового времени, тромбоцитопения и повышение уровня трансаминаз в сыворотке. Большинство этих токсических эффектов являются результатом неспецифических взаимодействий между АСО и белками плазмы. [42, 145]. Ограничение токсичности связано с гепатоцеллюлярной дегенерацией, приводящей к снижению уровня общего белка. Несмотря на эту токсичность, которая, как правило, незначительна и легко поддается лечению с помощью доступных стандартных препаратов, клинические испытания ясно показали, что АСО можно безопасно назначать пациентам [42]. Важно отметить, что тиофосфатные АСО, как правило, безопасны в терапевтических дозах. Токсичность, вызванная АСО, возникает при дозах, превышающих терапевтические дозы, обычно используемые в клинических исследованиях [139]. Таким образом, текущие данные показывают ограниченные неблагоприятные эффекты и обратимость тиофосфатных АСО, вызванных повреждением, с многообещающей эффективностью для лечения различных патологий [146]. 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. Можно предсказать, что *ГбФД*, важный фермент для активно делящихся клеток, при центральном применении будет воздействовать на кроветворную, репродуктивную и другие системы, что не делает его лучше, чем химиотерапия. Однако такие АСО могут быть очень полезны в комбинированной терапии. Например, после удаления опухоли для снижения риска рецидива можно было бы обработать края раны, чтобы «добить» вышедшие опухолевые клетки. Мы планируем включить АСО в состав мази, чтобы посмотреть, насколько эффективен этот способ доставки.

Принимая во внимание изучение пролиферативной активности клеток, гистологические, апоптотические и токсические исследования, Skeen-11 является многообещающей антимеланомной тиофосфатной последовательностью АСО, которую можно использовать для снижения пролиферации клеток меланомы. После нескольких операций смерть от меланомы является наиболее распространенной [147]. На наш взгляд, АСО, которые можно использовать в виде таргетных мазей или кремов, или инъекций, как показано в данной работе, дают особую надежду на элиминацию раковых 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.

Результаты данного исследования показывают перспективность использования антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 для инициации интенсивность апоптоза в клетках меланомы. Полученные данные сравнения проникновения этого олигонуклеотида в клетки с трансфекцией и без нее не показали существенной разницы. Основным преимуществом тиофосфатных АСО является их гидрофобность и взаимодействие с поверхностными белками, что позволяет им проникать в клетки независимо от наночастиц, липосом или конъюгации с проникающими в клетку пептидами [148]. Большая часть

внутриклеточного распределения олигонуклеотидов после системного или местного введения происходит быстро, всего через несколько часов после введения, чему способствуют механизмы быстрого эндоцитарного поглощения. Дальнейшее понимание внутриклеточного транспорта олигонуклеотидов может обеспечить дальнейшие улучшения дизайна и максимальную эффективность антисмысловых олигонуклеотидов в будущем [24]. Растущее количество данных продемонстрировало, что экспрессия *Г6ФД* повышается при некоторых типах рака и способствует прогрессированию опухоли [25]. Ингибирование *Г6ФД* стало потенциальной терапевтической стратегией для лечения рака, например, использование низкомолекулярного ингибитора *Г6ФД* RRX-001 при колоректальном раке и клетках гепатомы. В нашем исследовании при изучении подавления экспрессии гена глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в клеточной линии мышинной меланомы Clone M-3 было установлено, что с увеличением концентрации олигонуклеотида экспрессия гена существенно изменялась, что свидетельствует о том, что ингибирование, полученное с использованием антисмыслового олигонуклеотида, было специфичным к последовательности. Также были проведены исследования, где было показано, что снижение экспрессии гена *Г6ФД* уменьшает пролиферацию клеток миеломы и улучшает выживаемость мышей. [26]. Было показано, что Skeep-11 ингибирует прогрессирование клеточного цикла. Обработанные Skeep-11 были в фазе G0/G1 значительно увеличены до 97,7% по сравнению с необработанным контролем. Кроме того, Skeep-11 значительно ($p < 0,05$) снижал процент клеток в S-фазе на $1,6\% \pm 0,96$ и G2/M на $0,07\% \pm 0,01$ по сравнению с необработанной контрольной группой. Блокировка гена *Г6ФД* с помощью природной молекулы полидатына вызвало блокировку 50% клеток в S-фазе и около 50% апоптоза [27]. Сконструированная сверхэкспрессия с лентивирусом показала, что сверхэкспрессия *Г6ФД* индуцировала остановку клеточного цикла в фазе G0/G1, в то время как доля клеток в фазе S была увеличена [26]. Таким образом, тАСО Skeep-11 перспективен для лечения меланомы кожи и согласуется с результатами других ученых.

Таким образом, результаты данного исследования показывают перспективность использования антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 для инициации апоптоза в клетках меланомы. Показано, что Skeen-11 ингибирует прогрессирование клеточного цикла. Доля клеток под воздействием Skeen-11 в фазе G₀/G₁ значительно увеличилась по сравнению с контролем. Кроме того, Skeen-11 снижает процент клеток в S-фазе и G₂/M по сравнению с контрольной группой. Экспрессия целевого гена *Г6ФД* под влиянием антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 снижается в 1,6-3,5 раза в зависимости от концентрации (дозировки). Под влиянием антисмыслового олигонуклеотида Skeen-11 показатель апоптотических процессов в клеточной линии Clone M-3 достигает 93,9%, а метаболическая активность снижается на 16-63% также в зависимости от концентрации (дозировки). Наиболее выраженный эффект наблюдается через 6 ч после обработки Skeen-11 и снижается к 12-му часу.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что экспрессия целевого гена *Г6ФД* под влиянием антисмыслового олигонуклеотида Skeep-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 Skeep-11 показатель апоптотических процессов в клеточной линии Clone M-3 составляет $93,9 \pm 0,33$ % ($p < 0,05$), а метаболическая активность раковых клеток снижается 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 Skeep-11 увеличивается количество клеток меланомы в фазе G0/G1 до 97,7% ($p < 0,05$), а также снижается 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 Skeep-11 наиболее выраженный эффект наблюдается через 6 ч после начала эксперимента и составляет $0,38 \pm 0,02$ уе ($p < 0,05$), а через 12 часов от начала эксперимента данное значение уменьшается до $0,19 \pm 0,02$ уе ($p < 0,05$), а клеточный индекс за 12 часов снижается в 2,71 раза ($p < 0,05$). Редукция опухоли в среднем составляет 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 Skeep-11 и рандомного OligoA-11 на биохимические показатели и формулу крови *Mus musculus*. Показатель аланинаминотрансферазы в группе Skeep-11 повышается на 50,08 Ед\л по сравнению с положительным контролем и на 27,76 Ед\л по сравнению с отрицательным контролем ($p < 0,05$). Рандомный тиофосфатный олигонуклеотид OligoA-11 достоверно отличается по данному показателю от

положительного контроля в 3 раза. Активность аспаратаминотрансферазы также достоверно повышена для Skeen-11 и OligoA-11. Кроме этого, наблюдается уменьшение креатинина почти в 2 раза в группе Skeen-11 по сравнению с положительным контролем. При исследовании тромбоцитов установлено, что в группе, получавшей Skeen-11, их число увеличено на 237 ед по сравнению с положительным контролем ($p < 0,05$). Показатели лейкоцитарной активности у отрицательной контрольной группы превышают 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 Skeep-11 против матричной РНК гена *Г6ФД* меланомы мышей.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

АСО	–	антисмысловые олигонуклеотиды
тАСО	–	тиофосфатные антисмысловые олигонуклеотиды
Г6ФД	–	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
АЛАТ	–	аланинаминотрансфераза
АСАТ	–	аспартатаминотрансфераза
ТР	–	общий белок
UREA	–	мочевина
CREA	–	креатинин
МК	–	меланома кожи
НК		нуклеиновые кислоты

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахматова А.М., Потекаев Н.Н., Решетов И.В., Ткаченко С.Б., Лукашева Н.Н. Прижизненная конфокальная сканирующая лазерная микроскопия в диагностике меланомы кожи. Клиническая дерматология и венерология. 2011;9(5):38-45.
2. Teixido C, Castillo P, Martinez-Vila C, Arance A, Alos L. Molecular Markers and Targets in Melanoma. *Cells*. 2021 Sep 5;10(9):2320
3. Jin L, Zhou Y. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors. *Oncol Lett*. 2019 May;17(5):4213-4221.
4. Xiao W, Zheng S, Yang A, Zhang X, Zou Y, Tang H, Xie X. Breast cancer subtypes and the risk of distant metastasis at initial diagnosis: a population-based study. *Cancer Manag Res*. 2018 Nov 5;10:5329-5338.
5. Brandl, N.; Seitz, R.; Sendtner, N.; Müller, M.; Gülow, K. Living on the Edge: ROS Homeostasis in Cancer Cells and Its Potential as a Therapeutic Target. *Antioxidants* 2025, 14, 1002.
6. Ju HQ, Lin JF, Tian T, Xie D, Xu RH. NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Oct 7;5(1):231.
7. Aurora AB, Khivansara V, Leach A, Gill JG, Martin-Sandoval M, Yang C, Kasitinon SY, Bezwada D, Tasdogan A, Gu W, Mathews TP, Zhao Z, DeBerardinis RJ, Morrison SJ. Loss of glucose 6-phosphate dehydrogenase function increases oxidative stress and glutaminolysis in metastasizing melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Feb 8;119(6):e2120617119.
8. Huang C, Radi RH, Arbiser JL. Mitochondrial Metabolism in Melanoma. *Cells*. 2021 Nov 16;10(11):3197.
9. Tan IJ, Parikh AK, Cohen BA. Melanoma Metabolism: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications in Cutaneous Oncology. *Cancer Med*. 2024 Nov;13(21):e70386.

10. Hayes, John D. et al. *Cancer Cell*, Volume 38, Issue 2, 167 - 197
11. Yang HC, Wu YH, Yen WC, Liu HY, Hwang TL, Stern A, Chiu DT. The Redox Role of G6PD in Cell Growth, Cell Death, and Cancer. *Cells*. 2019 Sep 8;8(9):1055.
12. Crooke ST, Seth PP, Vickers TA, Liang XH. The Interaction of Phosphorothioate-Containing RNA Targeted Drugs with Proteins Is a Critical Determinant of the Therapeutic Effects of These Agents. *J Am Chem Soc*. 2020 Sep 2;142(35):14754-14771.
13. Stanton RC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*. 2012 May;64(5):362-9
14. Молочков В.А., Демидов Л.В. и др. Меланоцитарные невусы и меланома кожи. — М.: Литтера, — 2012
15. Каприна, А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2024 году // А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой / МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России – 2025. – С. 239.
16. Davis, L. E. Current state of melanoma diagnosis and treatment // L. E. Davis, S. C. Shalin, A. J. Tackett / *Cancer Biol Ther*. – 2019. – Vol. 20(11). – P. 1366-1379.
17. Пак, М. Б. Особенности хирургического лечения меланомы кожи головы и шеи. Современный взгляд на проблему // М.Б. Пак, А.М. Мудунов, Л.В. Демидов и др. / *Диагностика и лечение опухолей головы и шеи*. – 2016. – № 6, – С. 19-25.
18. Hanahan, D. Hallmarks of cancer: the next generation // D. Hanahan, R. A. Weinberg / *Cell*. – 2011. – Vol. 144(5). – P. 646-74.
19. Кит, О.И. Ассоциация мутационного статуса гена BRAF и клинико-морфологических особенностей меланомы кожи // О. И. Кит, Д.И. Водолажский и др. / *Кубанский научный медицинский вестник*. – 2016. –№3(158). – С. 67-71.
20. Conrad, N. Multiple primary melanoma // N. Conrad, P. Leis, I. Orengo et al. / *Dermatol Surg*. –1999. – Vol. 25(7). – P. 576-81.

21. Lodde, G. Malignes Melanom [Malignant melanoma] // G. Lodde, L. Zimmer, E. Livingstone et al. / Pathologe. – 2020. – Vol. 10. 41(3). – P. 281-292.
22. Ryška, A. Malignant Melanoma - from Classical Histology towards Molecular Genetic Testing // A. Ryška, O. Horký, J. Berkovcová et al. / Klin Onkol.– 2017. – Vol. 30(3). – P.182-189.
23. Geisler, J. Malignant melanoma--diagnosis, treatment and follow-up in Norway // J. Geisler, I. M. Bachmann, M. Nyakas et al. / Tidsskr Nor Laegeforen. – 2013. – Vol. 133(20). – P. 2154-9.
24. Swetter, S. M. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma // S. M. Swetter, H. Tsao, C. K. Bichakjian et al. // J Am Acad Dermatol / 2019. – Vol. 80(1). – P. 208-250.
25. Moncrieff, M. Excision margins for melanomas: how wide is enough? // M. Moncrieff / Lancet Oncol. 2016. – Vol. 17(2). – P. 127-128.
26. Laikova, K. V. Advances in the Understanding of Skin Cancer: Ultraviolet Radiation, Mutations, and Antisense Oligonucleotides as Anticancer Drugs // K. V. Laikova, V. V. Oberemok, A. M. Krasnodubets et al. / Molecules. – 2019. – Vol. 24. – P. 1516.
27. Queirolo, P. Binimetinib for the treatment of NRAS-mutant melanoma // P. Queirolo, F. Spagnolo / Expert Rev Anticancer Ther. – 2017. – Vol.17(11). – P. 985-990.
28. Merlino, G. The state of melanoma: challenges and opportunities // G. Merlino, M. Herlyn, D. E. Fisher et al. // Pigment Cell Melanoma Res. –2016. – Vol. 29. – P. 404-416.
29. Zhu, X. Cancer evolution: A means by which tumors evade treatment // X. Zhu, S. Li, B. Xu et al. / Biomedicine & Pharmacotherapy. –2021. – Vol. 133. – P. 111.
30. Jing, M. Adjuvant Treatments of Adult Melanoma: A Systematic Review and Network Meta-Analysis // M. Jing, Y. Cai, J. Shi et al. / Front Oncol. – 2022. – Vol. 12. 926242.

31. Водолажский, Д. И. DDPСR-скрининг мутационного статуса генов BRAF и KRAS у пациентов юга России // Д. И. Водолажский, Г. В. Гудков, Е. Ф. Филиппов и др. / Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 1.
32. Balch, C. M. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification // C. M. Balch, J. E. Gershenwald, S. J. Soong et al. / J Clin Oncol. – 2009. – Vol. 27(36). – P. 6199-206.
33. Davar, D. Adjuvant therapy for melanoma // D. Davar, A. A. Tarhini, J. M. Kirkwood / Cancer J. – 2012. – Vol. 18(2). – P. 192-202.
34. Thalanayar, P. M. Melanoma adjuvant therapy // P. M. Thalanayar, S. S. Agarwala, A. A. Tarhini / Chin Clin Oncol. – 2014. – Vol. 3(3). – P. 26.
35. Balch, C. M. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification // C. M. Balch, J. E. Gershenwald, S. J. Soong et al. / J Clin Oncol. – 2009. – Vol. 27(36). – P. 6199-206.
36. Tarhini, A. A. Adjuvant Therapy of Melanoma // A.A. Tarhini / Hematol Oncol Clin North Am. – 2021. – Vol. 35(1). – P. 73-84.
37. Hauschild, A. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial // A. Hauschild, J. J. Grob, L. V. Demidov et al. / Lancet. – 2012. – Vol. 380(9839). – P. 358-65.
38. Testori, A. A. E. Adjuvant Therapy for Melanoma: Past, Current, and Future Developments // A. A. E. Testori, S. Chiellino, A. C. J. van Akkooi / Cancers (Basel). – 2020. – Vol. 12(7). – P. 1994.
39. Prickett, K. A. Mohs Micrographic Surgery // K. A. Prickett, M. L. Ramsey. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – 2023. – Vol.13. – P. 131.
40. DeBerardinis, R. J. Fundamentals of cancer metabolism // R. J. DeBerardinis, N. S. Chandel / Sci. Adv. – 2016. – Vol. 2(5), e1600200.
41. Plunkett, K.R. Tissue-resident memory T cells in the era of (Neo) adjuvant melanoma management // K. R. Plunkett, J. D. Armitage, A. J. Inderjeeth et al. / Front Immunol. – 2022. – Vol.16. – P. 13.

42. Blank, C. U. Neoadjuvant versus adjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma // C. U. Blank, E. A. Rozeman, L. F. Fanchi et al. / *Nat Med.* –2018. – Vol. 24(11). – P. 1655-1661.
43. Kovács S.A. Transcriptomic datasets of cancer patients treated with immune-checkpoint inhibitors: a systematic review // S. A. Kovács, B. Győrffy / *J Transl Med.* – 2022. – Vol. 20(1). – P. 249.
44. Davis, L. E. Current state of melanoma diagnosis and treatment // L. E. Davis, S. C. Shalin, A. J. Tackett / *Cancer Biol Ther.* – 2019. – Vol. 20(11). – P. 1366-1379.
45. Tetzlaff M.T. Pathological assessment of resection specimens after neoadjuvant therapy for metastatic melanoma // M. T. Tetzlaff, J. L. Messina, J. E. Stein / *Ann Oncol.* – 2018. – Vol. 29(8). – P. 1861-1868.
46. Жуликов, Я. А. Механизмы резистентности метастатической меланомы кожи к анти-PD-1 терапии // Я. А. Жуликов, И. В. Самойленко, Н. В. / *Российский биотерапевтический журнал.* – 2018. – №17 (1) – С. 34-46.
47. Нуриев, Р. И. Новые стратегии лечения пациентов с онкологическими заболеваниями: иммунотерапевтический подход // Р. И. Нуриев, А.В Караулов, М.В. Киселевский / *Иммунология.* – 2017. – № 38 (1). – С. 39-48.
48. Kelly, Z. R. The Role of Neoadjuvant Therapy in Melanoma // Z. R. Kelly, V. C. Gorantla, D. Davar / *Curr Oncol Rep.* – 2020. – Vol. 22(8) – P. 80.
49. Silva, C. O. Current Trends in Cancer Nanotheranostics: Metallic, Polymeric, and Lipid-Based Systems // C. O. Silva, J. O. Pinho, J. M. Lopes et al. / *Pharmaceutics.* – 2019. – Vol. 11(1). – P. 22.
50. Zardavas, D. Neoadjuvant therapy for breast cancer // D. Zardavas, M. Piccart / *Annu Rev Med.* – 2015. – Vol. 66. – P. 31-48.
51. Aklilu, M. The current landscape of locally advanced rectal cancer // M. Aklilu, C. Eng / *Nat Rev Clin Oncol.* –2011. – № 8(11). – P. 649-59.
52. Kelsen, D.P. Adjuvant and neoadjuvant therapy for gastric cancer // D. P. Kelsen / *Semin Oncol.* – 1996. – Vol. 23. – P. 379-389.

53. Mauri D. Neoadjuvant versus adjuvant systemic treatment in breast cancer: a meta-analysis // D. Mauri, N. Pavlidis , J. P. Ioannidis // J Natl Cancer Inst. – 2005. – Vol. 97(3). – P. 188-94.
54. Pelster, M. S. Neoadjuvant Immunotherapy for Locally Advanced Melanoma // M. S. Pelster, R. N. Amaria / Curr Treat Options Oncol. – 2020. – Vol. 21(2). – P. 10.
55. Moschos S. J., Edington H. D., Land S. R. Neoadjuvant treatment of regional stage IIIB melanoma with high-dose interferon alfa-2b induces objective tumor regression in association with modulation of tumor infiltrating host cellular immune responses // S. J. Moschos, H. D. Edington, S. R. Land / J Clin Oncol. – 2006. – Vol. 24(19). – P. 3164-71.
56. Kowalczyk, J. T. Exploiting the immunogenic potential of standard of care radiation or cisplatin therapy in preclinical models of HPV-associated malignancies // J. T. Kowalczyk, K. P. Fabian, M. R. Padget et al. / J Immunother Cancer. – 2022. – Vol. –10(12), e005752.
57. Burgess, T. L. The antiproliferative activity of c-myb and c-myc antisense oligonucleotides in smooth muscle cells is caused by a nonantisense mechanism // T. L. Burgess, E. F. Fisher, S. L. Ross et al. / Proc Natl Acad Sci U S A. –1995. – Vol. 92(9). – P. 4051-5.
58. Novoa A. G. Axillary Treatment in Breast Cancer Surgery // A. G. Novoa / Systematic Review of Its Impact on Survival. –2017. – Vol. 95 (9). – P. 503-512.
59. Ribero, S. Ultrasound-based follow-up does not increase survival in early-stage melanoma patients: A comparative cohort study // S. Ribero, S. Podlipnik, S. Osella-Abate / European Journal of Cancer. – 2017. – Vol. 85 – P. 59-66.
60. Torre, L. A. Global cancer statistics, 2012 // L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel et al / CA Cancer J Clin. – 2015. – Vol. 65(2). – P. 87-108.
61. Hunger, R. E. Excision of fascia in melanoma thicker than 2 mm: no evidence for improved clinical outcome // R. E. Hunger, S. M. Seyed Jafari, S. Angermeier et al. / Br J Dermatol. – 2014. – Vol. 171(6). – P. 1391-6.

62. Ethun, C. G. The importance of surgical margins in melanoma // C. G. Ethun, K. A. Delman / *J Surg Oncol.* – 2016. – Vol. 113(3). – P. 339-45.
63. Dawn, M. E. Mohs surgery for the treatment of melanoma in situ: a review // M. E. Dawn, A. G. Dawn, S. J. Miller / *Dermatol Surg.* – 2007. – Vol. 33(4). – P. 395-402.
64. Joyce, K. M. Surgical Management of Melanoma // K. M. Joyce, W. H. Ward, J. M. Farma / *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy.* – 2017. – Vol. 7.
65. Ad, Hoc. AAD/ACMS/ASDSA/ASMS 2012 appropriate use criteria for Mohs micrographic surgery: a report of the American Academy of Dermatology, American College of Mohs Surgery, American Society for Dermatologic Surgery Association, and the American Society for Mohs Surgery // Hoc Ad, S. M. Connolly, D. R. Baker et al. / *J Am Acad Dermatol.* – 2012. – Vol. 67(4). – P. 531-50.
66. Asgari, M. M. Needs assessment for Mohs micrographic surgery // M. M. Asgari, J.M. Olson, M. Alam / *Dermatol Clin.* – 2012. – Vol. 30(1). – P. 167-75.
67. Poklepovic, A. S. Considering adjuvant therapy for stage II melanoma // A. S. Poklepovic, J. J. Luke / *Cancer.* – 2020. – 126(6). – P. 1166-1174.
68. Rowe, D. E. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip // D. W. Rowe, R. J. Carroll, C. L // Day Implications for treatment modality selection / *J Am Acad Dermatol.* – 1992. – Vol. 26(6). – P. 976-90.
69. Hillberg, N. S. Delay of adjuvant radiotherapy due to postoperative complications after oncoplastic breast conserving surgery // N. S. Hillberg, M. A. J. Meesters-Caberg et al. / *Breast.* – 2018. – P. 110-116.
70. Kim, I. Y. Factors Affecting Use and Delay (≥ 8 Weeks) of Adjuvant Chemotherapy after Colorectal Cancer Surgery and the Impact of Chemotherapy // I. Y. Kim, B. R. Kim, Y. W. Kim / *Use and Delay on Oncologic Outcomes. PLoS One.* – 2015. – Vol. 10(9), e0138720.
71. Munkhammar, S. Complications after surgery for malignant melanoma do not delay further treatment // S. Munkhammar, C. Sars, I. Schultz / *Eur J Plast Surg.* – 2022. – Vol. 45(2):337-339.

72. Tevis S. E., Kohlnhofer B. M., Stringfield S. Postoperative complications in patients with rectal cancer are associated with delays in chemotherapy that lead to worse disease-free and overall survival // S. E. Tevis, B. M. Kohlnhofer, S. Stringfield / *Dis Colon Rectum*. – 2013. – Vol. 56(12). – P. 1339-48.

73. Варбург, О. Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise // О. Варбург, В. Кристиан, А. Гризе / *Биохим.* – 1935. – № 282. – С. 157–205.

74. Аллахвердиев, А. М. Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и малярия: метод обнаружения индуцированного примахином гемолиза *in vitro* / А.М. Аллахвердиев, М. Багирова, С. Эльчичек [и др.] // *Дегидрогеназы. ИнтехОткрытый.* – 2012. – № 11. – С. 15-16.

75. DeBerardinis, R. J. Fundamentals of cancer metabolism // R. J. DeBerardinis, N. S. Chandel / *Sci. Adv.* – 2016. – Vol. 2(5), e1600200.

76. Valle-Mendiola, A. Energy metabolism in cancer. The roles of STAT3 and STAT5 in the regulation of metabolism-related genes // A. Valle-Mendiola, I. Soto-Cruz / *Cancers*. – 2020. – Vol. 12(1). – P. 124

77. Mele, L. A new inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase blocks pentose phosphate pathway and suppresses malignant proliferation and metastasis *in vivo* // L. Mele, F. Paino, F. Papaccio et al. / *Cell Death Dis.* – 2018. – Vol. 9. – P. 572.

78. Yang, H.-C. The Redox Role of G6PD in Cell Growth, Cell Death, and Cancer // H.-C. Yang, Y.-H. Wu, W. Yen et al. / *Cells*. – 2019. – Vol. 8. – P. 105.

79. Wang, Y. Suppression of G6PD induces the expression and bisecting GlcNAc-branched N-glycosylation of E-Cadherin to block epithelial-mesenchymal transition and lymphatic metastasis // Y. Wang, Q. Li, L. Niu et al / *Br J Cancer*. – 2020. – Vol. 123. – P. 1315-1325.

80. Hu, T. Variant G6PD levels promote tumor cell proliferation or apoptosis via the STAT3/5 pathway in the human melanoma xenograft mouse model // T. Hu, C. Zhang, Q. Tang et al. / *BMC Cancer*. – 2013. – Vol. 13. – P. 251.

81. Song, J. The Multiple Roles of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Tumorigenesis and Cancer Chemoresistance // J. Song, H. Sun, S. Zhang / *Life* (Basel). – 2022. – Vol. 12. – P. 271.

82. Оронский, Б. RRx-001, новый химиосенсибилизатор, радиосенсибилизатор и иммуносенсибилизатор клинической стадии, ингибирует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу в опухолевых клетках человека // Б. Оронский, Дж. Шицински, Т. Рейд и др. / *Медицина*. – 2016; – № 21(116). – С. 251-265.

83. Оронский, Б. Краткий отчет: RRx-001 представляет собой ингибитор с-Мус, нацеленный на раковые стволовые клетки // Б. Оронский, Т. Р. Рейд, А. Оронский и др. / *Онкотаргет*. – 2018. – № 9(34). – С. 23439-42

84. Cabrales, P. RRx-001 Acts as a Dual Small Molecule Checkpoint Inhibitor by Downregulating CD47 on Cancer Cells and SIRP- α on Monocytes/Macrophages // P. Cabrales / *Transl Oncol*. – 2019. – Vol. 12(4). – P. 626-632.

85. Stanton, R. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival // R. C. Stanton / *IUBMB Life*. – 2012. – Vol. 64(5). – P. 362-9.

86. Li, D. A new G6PD knockdown tumor-cell line with reduced proliferation and increased susceptibility to oxidative stress // D. Li, Y. Zhu, Q. Tang et al. / *Cancer Biother. Radiopharm*. – 2009. – Vol. 24. – P. 81–90.

87. Lin, R. 6-Phosphogluconate dehydrogenase links oxidative PPP, lipogenesis and tumour growth by inhibiting LKB1-AMPK signaling // R. Lin, S. Elf, C. Shan et al. / *Nat. Cell Biol*. – 2015. – Vol. 17. – P. 1484–1496.

88. Tian, W.N. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth // W.N Tian, L.D. Braunstein, J. Pang et al. / *J. Biol. Chem*. – 1998. – Vol. 273. – P. 10609–10617.

89. Cai, T. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase 4 control STAT3 activity in melanoma cells through a pathway involving reactive oxygen species, c-SRC and SHP2 // T. Cai, Y. Kuang, C. Zhang et al. / *Am. J. Cancer Res*. – 2015. – Vol. 5. – P.1610–1620.

90. Ozer, N. Kinetic properties of human placental glucose-6-phosphate dehydrogenase // N. Ozer, Y. Aksoy, I. H Oguş / *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – Vol. 2001. – Vol. 33. – P. 221–226.
91. Santana-Codina, N. Oncogenic KRAS supports pancreatic cancer through regulation of nucleotide synthesis // N. Santana-Codina, A.A Roeth, Y. Zhang. Et al. / *Nat. Commun.*– 2018. – Vol. – P. 94945.
92. Xu, S.N. SIRT2 activates G6PD to enhance NADPH production and promote leukaemia cell proliferation // S.N. Xu, T. S. Wang, X. Li et al. / *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 32.
93. Ye, H. HSPB1 Enhances SIRT2-Mediated G6PD Activation and Promotes Glioma Cell Proliferation // H. Ye, H. Huang, F. Cao / *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11, e0164285.
94. Kuehne, A. Acute Activation of Oxidative Pentose Phosphate Pathway as First-Line Response to Oxidative Stress in Human Skin Cells // A. Kuehne, H. Emmert, J. Soehle et al / *Mol. Cell.* – 2015. – Vol. 59. – P. 359–371.
95. Du, W.T. Ap73 enhances the pentose phosphate pathway and supports cell proliferation // W. Du, P. Jiang, A. Mancuso et al. / *Nat. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 15. – P. 991–1000.
96. Fukuda, S. Pyruvate Kinase M2 Modulates Esophageal Squamous Cell Carcinoma Chemotherapy Response by Regulating the Pentose Phosphate Pathway // S. Fukuda, H. Miyata, Y. Miyazaki et al. / *Ann. Surg. Oncol.* – 2015. – Vol. 22. – P. 1461-1468.
97. Cho, S.W. Characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase isozymes from human and pig brain // S. W. Cho, J. G. Joshi / *Neuroscience.* – 1990. – Vol. 38. – P. 819–828.
98. Massari, F. Metabolic phenotype of bladder cancer // F. Massari, C. Ciccamese, M. Santoni et al. / *Cancer Treat. Rev.* – 2016. – Vol. 45. – P. 46–57.
99. Wang, X. Zoledronic acid inhibits the pentose phosphate pathway through attenuating the Ras-TAp73-G6PD axis in bladder cancer cells // X. Wang, G. Wu, G. Cao et al / *Mol. Med. Rep.* – 2015. – Vol. 12. – P. 4620–4625.

100. Liu, B. Cdh1-Mediated Metabolic Switch from Pentose Phosphate Pathway to Glycolysis Contributes to Sevoflurane-Induced Neuronal Apoptosis in Developing Brain // B. Liu, W. Bai, G. Ou et al. / ACS Chem. Neurosci. – 2019. – Vol. 10. – P. 2332–2344.

101. Афанасьева, О.И., Ежов М.В., Покровский С.Н. Антисмысловые олигонуклеотиды и терапевтические моноклональные антитела - как основа для создания новых поколений биологических липидснижающих препаратов / О. И. Афанасьева, М.В. Ежов, С.Н. Покровский // РКЖ –2018. № 12. – С. 25-26.

102. Oberemok, V. V. DNA insecticide developed from the *Lymantria dispar* 5.8S ribosomal RNA gene provides a novel biotechnology for plant protection // V. V. Oberemok, K. V. Laikova, N. V. Gal'chinsky et al. / Sci Rep. – 2019. – Vol. 9(1). – P. 6197.

103. Stein, C.A. FDA-approved oligonucleotide therapies in 2017 // Stein, C.A.; Castanotto, D. Molecular Therapy. – 2017. – Vol. 25(5). – P. 1069-1075.

104. Wong, E. Mipomersen (kynamro): a novel antisense oligonucleotide inhibitor for the management of homozygous familial hypercholesterolemia // E. Wong, T. Goldberg / P T. – 2014. – Vol. 39(2). – P. 119-122.

105. Havens, M.A. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs // M. A. Havens, M. L. Hastings / Nucleic Acids Research. – 2016. – Vol. 44(14). – P. 6549-6563.

106. Shen, X. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs // X. Shen, D.R. Corey. Nucleic Acids Research. – 2018. – Vol. 46(4). – P. 1584-1600.

107. Oberemok, V.V. A Half-Century History of Applications of Antisense Oligonucleotides in Medicine, Agriculture and Forestry: We Should Continue the Journey // V.V. Oberemok, K.V. Laikova, A. I. Repetskaya / Molecules. – 2018. – Vol. 23. – P. 130.

108. Gal'chinsky, N. A breakthrough in the efficiency of contact DNA insecticides: rapid high mortality rates in the sap-sucking insects *Dynaspidiotus*

britannicus Comstock and Unaspis euonymi Newstead // N. Gal'chinsky, R. Useinov, E. Yatskova et al. / JPPR. – 2020. – Vol. 60(2). – P. 220-223.

109. Useinov, R. Z. To bee or not to bee: creating DNA insecticides to replace non-selective organophosphate insecticides for use against the soft scale insect *Ceroplastes japonicas* Green // R. Z. Useinov, N. Gal'chinsky, E. Yatskova et al / JPPR. – 2020. – Vol. 60(4). – P. 406-409.

110. Wacheck, V. Antisense molecules for targeted cancer therapy // V. Wacheck, U. Zangemeister-Wittke / Crit Rev Oncol Hematol. – 2006. – Vol. 59(1). – P. 65-73.

111. Li, R. G6PD promotes cell proliferation and dexamethasone resistance in multiple myeloma via increasing anti-oxidant production and activating Wnt/ β -catenin pathway // R. Li, M. Ke, M. Qi et al. / Exp Hematol Oncol. – 2022. – Vol. 11(1). – P. 77.

112. Li, R. Exploring the role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in cancer (Review) // R. Li, W. Wang, Y. Yang et al. / Oncol Rep. – 2020. – Vol. 44(6). – P. 2325-2336.

113. Oronsky, B. Brief report: RRx-001 is a c-Myc inhibitor that targets cancer stem cells // B. Oronsky, T. R. Reid, A. Oronsky et al. / Oncotarget. – 2018. – Vol. 9(34). – P. 23439-23442.

114. Matthews, N. H. Epidemiology of Melanoma. Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy // N. H. Matthews, W. Q. Li, A. A. Qureshi et al. / Brisbane (AU): Codon Publications. – 2017. – Vol. 1. – P. 243-244.

115. Ross, M. I. Excision Margins of Melanoma Make a Difference: New Data Support an Old Paradigm // M. I. Ross, C. M. Balch / Ann Surg Oncol. – 2016. – Vol. 23(4). – P. 1053-6.

116. Dokka, S. Dermal delivery of topically applied oligonucleotides via follicular transport in mouse skin // S. Dokka, S. R. Cooper, S. Kelly et al. / J Invest Dermatol. – 2005. – Vol. 124(5). – P. 971-5.

117. Li, F. Cancer therapeutics using survivin BIRC5 as a target: what can we do after over two decades of study? // F. Li, I. Aljahdali, X. Ling / *J Exp Clin Cancer Res.* – 2019. – Vol. 24. 38(1). – P. 368.

118. Vickers, T. A. Kinetic and subcellular analysis of PS-ASO/protein interactions with P54nrb and RNase H1 // T. A. Vickers, M. Rahdar, T. P. Prakash et al. / *Nucleic Acids Res.* – 2019. – Vol. 47(20). – P. 10865-10880.

119. Zhang, U. 6 - Antisense strategies for the development of novel cancer therapeutics // U. Zhang, U. H. Wang / *Novel Anticancer Agents.* – 2006. – P. –191-206.

120. Kong, Y. Uptake of DNA by cancer cells without a transfection reagent // Y. Kong, X. Zhang, Y. Zhao et al. / *Biol Res.* – 2017. – Vol. 50. – P. 2.

121. Mali, S. Delivery systems for gene therapy // S. Mali / *Indian J Hum Genet.* – 2013. – Vol. 19(1). – P. 3-8.

122. Juliano, R. L. The delivery of therapeutic oligonucleotides // R. L. Juliano / *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44(14). – P. 6518-48.

123. Mukherjee, P. Differential Uptake of Antisense Oligonucleotides in Mouse Hepatocytes and Macrophages Revealed by Simultaneous Two-Photon Excited Fluorescence and Coherent Raman Imaging // P. Mukherjee, E. Aksamitiene, A. Alex / *Nucleic Acid Ther.* – 2022. – Vol. 32(3). – P. 163-176.

124. Zenkova, M. A. Complementary addressed alkylation of 16S rRNA of *Escherichia coli* by 2',3'-O-[4-N-methyl-N-(2-chloroethyl)-amino benzylidene derivatives of oligodeoxyribonucleotides. V. Study of the factors affecting selectivity of modification // M. A. Zenkova, G. G. Karpowa, A. S. Levina / *Bioorg Khim.* – 1991. – Vol. 17(4). – P. 470-81.

125. Hiroshi M. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity // M. Hiroshi / *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2015. – Vol. 91. – P. 3-6.

126. Sawamura, D. The majority of keratinocytes incorporate intradermally injected plasmid DNA regardless of size but only a small proportion of cells can

express the gene product // D. Sawamura, K. Yasukawa, K. Kodama et al. / *J Invest Dermatol.* – 2002. – Vol. 118(6). – P. 967-71.

127. Geary, R. S. Pharmacokinetic/pharmacodynamic properties of phosphorothioate 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified antisense oligonucleotides in animal and man // R. S. Geary, R. Z. Yu, A. Siwkowski / *Antisense drug technology.* – 2007. – P. 3-6.

128. Karaki, S. Antisense Oligonucleotides // S. Karaki, C. Paris, P. Rocchi / *A Novel Developing Targeting Therapy.* – 2018.

129. Dirin, M. Influence of diverse chemical modifications on the ADME characteristics and toxicology of antisense oligonucleotides // M. Dirin, J. Winkler / *Expert Opinion on Biological Therapy.* – 2013. – Vol. 13(6). – P. 875-888.

130. Yu, R. Z. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of an antisense phosphorothioate oligonucleotide targeting Fas mRNA in mice // R. Z. Yu, H. Zhang, R. S. Geary / *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 2001. – Vol. 296(2). – P. 388-395.

131. McMahon, B. M. Pharmacokinetics and tissue distribution of a peptide nucleic acid after intravenous administration // B. M. McMahon, D. Mays, J. Lipsky et al. / *Antisense & Nucleic Acid Drug Development.* – 2002. – Vol. 12(2). – P. 65-70.

132. Karaki, S. Antisense Oligonucleotides // S. Karaki, C. Paris, P. Rocchi / *A Novel Developing Targeting Therapy.* – 2018.

133. Yu, R.Z. Cross-species pharmacokinetic comparison from mouse to man of a second-generation antisense oligonucleotide, ISIS 301012, targeting human apolipoprotein B-100Drug // R.Z. Yu, T.W. Kim, A. Hong et al. / *Metab Dispos.* – 2007. – Vol. 35 (3) – P. 460-468.

134. Levin, A. A. Basic principles of the pharmacokinetics of antisense oligonucleotide drugs // A. A. Levin, R. Z. Yu, R. S / Geary *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications.* – 2007. – P. 183-216.

135. Geary, R. S. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides // R. S. Geary, D. Norris, R. Yu et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 2015. – Vol. 87. – P. 46-51.

136. Хаитов, М. Р. Особенности фармакокинетики антисмысловых олигонуклеотидных препаратов // М. Р. Хаитов, В. В. Смирнов / Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2013. – № 1. – С. 3-13.

137. Goodspeed, A. Tumor-derived cell lines as molecular models of cancer pharmacogenomics // A. Goodspeed, L. M. Heiser, J. W. Gray et al. / Mol. Cancer Res. – 2016. – Vol. 14(1). – P. 3-13.

138. Vincent, K. M. Investigating the utility of human melanoma cell line // K. M. Vincent, L-M. Postovit / Oncotarget. – 2017. – Vol. 8(6). – P. 10498-10509.

139. Badr, E. A. A correlation between BCL-2 modifying factor, p53 and livin gene expressions in cancer colon patients // E. A. Badr, M. F. Assar, A.M.A. et al. / Eltorgoman. Biochem Biophys Rep. – 2020. – Vol. 22. – P. 100.

140. Di Martile, M. Melanoma-specific bcl-2 promotes a protumoral M2-like phenotype by tumor-associated macrophages // M. Di Martile, V. Farini, V. F.M. Consonni et al. / J Immunother Cancer. – 2020. – Vol. 8(1), e000489

141. Karapetyan, O. V. The state of local markers of inflammation and apoptosis in endometry in hyperplasia of various degrees of severity // O. V. Karapetyan, I. I. Fomochkina, E. Yu. Zyablitskaya et al. / Med. News North Cauc. – 2020. – Vol. 15(3). – P. 342-347.

142. Wang, W. CD8+ T cells regulate tumour ferroptosis during cancer immunotherapy // W. Wang, M. Green, J. E. Choi / Nature. – 2019. – Vol. 569. – P. 270-274.

143. Monteith, D. K. Preclinical evaluation of the effects of a novel antisense compound targeting C-raf kinase in mice and monkeys // D. K. Monteith, R. S. Geary, R. S. Leeds / Toxicol Sci. – 1998. – Vol. 46(2). – P. 365-75.

144. Krieg, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects // A. M. Krieg / Annu Rev Immunol. – 2002. – Vol. 20. – P. 709–60.

145. Lang, R. Guanosine-rich oligodeoxynucleotides induce proliferation of macrophage progenitors in cultures of murine bone marrow cells // R. Lang, L. Hültner, G. B. Lipford et al. / Eur J Immunol. – 1999. – Vol. 29(11). – P. 3496-506.

146. Iannitti, T. Phosphorothioate oligonucleotides: effectiveness and toxicity // T. Iannitti, J. C. Morales-Medina, B. Palmieri / *Curr Drug Targets*. – 2014. – Vol. 15(7). – P. 663-73
147. Conic, R. Z. Determination of the impact of melanoma surgical timing on survival using the National Cancer Database // R. Z. Conic, C. I. Cabrera, A. A.Khorana / *J Am Acad Dermatol*. – 2018. – Vol. 78(1). – P. 40-46.
148. Geisler, J. Malignant melanoma--diagnosis, treatment and follow-up in Norway // J. Geisler, I. M. Bachmann, M. Nyakas et al. / *Tidsskr Nor Laegeforen*. – 2013. – Vol. 133(20). – P. 2154-9.