

оценивалась методом количественной ПЦР. Сигнальный путь Notch был активирован путем трансдукции клеток лентивирусной конструкцией, несущей NICD — активированный внутриклеточный домен рецептора Notch1. Были сконструированы репортерные люциферазные конструкции для RBPJ, промоторов RUNX2 и SPP1, и мРНК-специфичные шпильки на RBPJ и SNAIL2.

Результаты. Активация сигнального пути Notch в интерстициальных клетках в условиях остеогенной дифференцировки приводила к дозозависимому усилению активности промоторов RUNX2, SPP1 и RBPJ. Ингибирование активности RBPJ и SNAIL2 в интерстициальных клетках клапана в условиях остеогенной дифференцировки приводило к снижению экспрессии проостеогенных маркеров, что выражалось в пониженной эффективности остеогенной дифференцировки. Сокультивирование интерстициальных клеток и эндотелиальных с пониженной активностью RBPJ и SNAIL2 также приводило к ингибированию остеогенной дифференцировки.

Выводы. Транскрипционная активность ключевых проостеогенных маркеров RUNX2 и SPP1 находится под контролем сигнального пути Notch. Эффективность остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток аортального клапана человека дозозависимо регулируется активностью сигнального пути Notch.

Исследование поддержано грантом РФФИ 19-29-04082.

Г.Ю. Кочмарева¹, К.С. Семашенко¹, А.А. Косинова², Т.Н. Субботина¹, А.А. Савченко¹, Ю.И. Гринштейн²

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПРОЯВЛЕНИЕМ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЕ У ПАЦИЕНТОВ С ИБС

¹ ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России, Красноярск, Россия

G.Y. Kochmareva¹, K.S. Semashchenko¹, A.A. Kosinova², T.N. Subbotina¹, A.A. Savchenko¹, Y.I. Grinshtein²

THE GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH A MANIFESTATION OF RESISTANCE TO ACETYSALICYLIC ACID IN PATIENTS WITH CHD

¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

² Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

galya.kochmaryowa@yandex.ru

У людей с ишемической болезнью сердца (ИБС) основным явлением, определяющим выраженность нарушений кровоснабжения органов и тканей, является активация тромбоцитов. В связи с этим, антитромбоцитарная терапия, в частности ацетилсалициловая кислота (АСК), является одним из главных компонентов медикаментозной терапии при ИБС. Однако у отдельных пациентов при лечении АСК сохраняется высокая агрегационная активность тромбоцитов, что обуславливает риск развития тромботических осложнений, в том числе после эндоваскулярного вмешательства.

В настоящее время большое внимание сосредоточено на молекулах клеточной адгезии — Р-селектинах,

которые участвуют в процессах воспалительного ответа. Отмечается, что повышенный уровень экспрессии Р-селектина способствует ускорению свертывания крови и может приводить к развитию ИБС, повышенному воспалительному ответу, и как следствие резистентности к АСК с высоким риском неблагоприятных событий.

Цель работы. Анализ уровня экспрессии гена тромбоцитарного Р-селектина (*SELP*) у пациентов с ИБС.

Материалы и методы. Для оценки экспрессии матричной РНК (мРНК) Р-селектина в тромбоцитах использовалась богатая тромбоцитами плазма (БТП), полученная из цельной венозной крови, из которой выделяли тотальную РНК. Для анализа был использован метод ПЦР, совмещенный с обратной транскрипцией (ОТ) и детекцией результатов в режиме реального времени. В качестве референсного гена выбран конститутивно экспрессирующийся в клетках ген *GAPDH*.

Результаты. Уровень относительной экспрессии был оценен у 18-ти пациентов с ИБС (стабильная стенокардия). Из них для 11-ти человек был проанализирован уровень экспрессии в 2-х точках: до проведения коронарного шунтирования (КШ) и через 7 дней после операции. По результатам исследования уровень экспрессии гена *SELP* варьировался среди пациентов до КШ: от 0,0006 до 0,510 (ср.знач. 0,123±0,11) и через 7 дней после операции: от 0,0078 до 0,632 (ср.знач. 0,240±0,18).

При анализе не было выявлено достоверных отличий в уровнях экспрессии мРНК гена *SELP* в группах пациентов до и после КШ. В то же время, уровень экспрессии исследуемого гена у каждого конкретного пациента после операции был выше по сравнению с соответствующим показателем до оперативного вмешательства.

Заключение. По предварительным данным наблюдается некоторое повышение экспрессии гена Р-селектина после КШ, которое, на данный момент не является достоверно значимым. Полученные показатели могут объясняться особенностями популяции, особой регуляцией экспрессии гена, наличием полиморфизмов в гене Р-селектина у анализируемых пациентов. Таким образом, для достоверной оценки уровня экспрессии Р-селектина при ИБС необходимо увеличить выборку пациентов, а также обследовать всех участников эксперимента на наличие полиморфизмов и других факторов, влияющих на изменение экспрессионного профиля таргетного гена.

Д.В. Курочкин¹, И.Е. Маслюкова¹, Т.Н. Субботина^{1,2}
МЕТОД HRM КАК МЕТОД СКРИНИНГА СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ХМН

¹ ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

² ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России», Красноярск, Россия

D.V. Kurochkin¹, I.E. Maslyukova¹, T.N. Subbotina^{1,2}
HRM METHOD AS A SCREENING METHOD OF THE SOMATIC MUTATION ANALYSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS

¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

² Federal Siberian Research and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Krasnoyarsk, Russia

lejsmie@gmail.com

Хронические миелопролиферативные неоплазии (ХМН) относят к клональным заболеваниям, которые характеризуются неконтролируемой пролиферацией клеточных линий миелопоэза. Установлено, что драйверные мутации в генах *JAK2* и *CALR* лежат в основе патогенеза Ph-негативных ХМН и наблюдаются у 90% больных. На сегодняшний день для диагностики мутаций в данных генах применяются различные молекулярно-генетические методы: секвенирование по Сэнгеру, аллель-специфическая ПЦР, фрагментный анализ и т.д. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки при анализе соматических мутаций. Например, секвенирование по Сэнгеру и фрагментный анализ имеют низкую чувствительность (от 10–25% и 5–10% присутствия мутантного аллеля, соответственно); аллель-специфическая ПЦР в свою очередь имеет ограниченные возможности для обнаружения многочисленных и разнообразных мутаций в гене *CALR*.

В то же время, существует удобный высокочувствительный (от 2,5% мутантного аллеля) метод high resolution melting (HRM-анализ). Его используют для скрининга образцов ДНК на наличие герминальных и соматических мутаций всех типов, встречающихся с разной частотой и разным уровнем аллельной нагрузки среди пациентов с ХМН. При HRM анализе соматических мутаций амплификатор CFX96 (Bio-Rad, США) используют гораздо реже амплификаторов Light Cycler (Roche, Франция).

Цель данной работы — скрининг соматических мутаций в генах *JAK2* и *CALR* у пациентов с ХМН методом HRM-анализа с использованием амплификатора CFX96 для пациентов с диагнозом ХМН.

Для постановки HRM-анализа была взята ДНК от 5 *JAK2* положительных (V617F) и 5 *CALR* положительных пациентов с подтвержденным диагнозом ХМН и ранее определенными мутациями и уровнем аллельной нагрузки, которая была в диапазоне 5–50%. ПЦР-HRM проводили на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Результаты HRM оценивали с помощью программы Precision Melt Analysis™ (Bio-Rad, США).

После проведения кластерного анализа в программе Precision Melt Analysis была видна четкая разница между образцами дикого типа и остальными образцами с мутациями в исследуемых генах. Для гена *CALR* продукты амплификации разделились на 3 кластера: первый кластер — кривые плавления ДНК дикого типа, второй кластер — кривые плавления ДНК от образцов с мутациями по типу инсерции (с.1154_1155insTTGTC и сочетанная с.1128_1129insCTTTGCTT + с.1131_1133delAGA), третий кластер — кривые плавления от образцов с мутациями по типу делеции (с.1092_1143del и с.1099_1150del). Для гена *JAK2* продукты амплификации разделились на 6 кластеров. Первый кластер соответствовал кривым плавления ДНК дикого типа, а остальные пять — кривым согласно своей аллельной нагрузке: второй кластер — образец с уровнем аллельной нагрузки 5%, третий — 15%, четвертый — 20%, пятый — 27%, шестой — 35%.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что HRM является простым и быстрым методом для скрининга соматических мутаций в гене в генах *JAK2* и *CALR*.

**Н.И. Литовка, С.Н. Рубцова,
И.Ю. Житняк, Н.А. Глушанкова**
**РЕОРГАНИЗАЦИЯ АКТИНОВОГО
ЦИТОСКЕЛЕТА И МЕЖКЛЕТОЧНЫХ
АДГЕЗИОННЫХ КОНТАКТОВ
НА РАННИХ ЭТАПАХ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-
МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА**

*ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва*

**N.I. Litovka, S.N. Rubtsova,
I.Y. Zhitnyak, N.A. Gloushankova**
**REORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON
AND ADHERENS JUNCTIONS ON EARLY
STAGES OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL
TRANSITION**

*N.N. Blokhin National Medical Research Center
of Oncology, Moscow, Russia*

foxcovert9@gmail.com

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) — фундаментальный процесс, необходимый на эмбриональном этапе развития для формирования трёхслойного организма и органогенеза, в постнатальном периоде ЭМП задействован в регенеративных процессах. Изучение ЭМП является важной задачей онкологии, так как ЭМП является ключевой программой опухолевой прогрессии, запускающей инвазию и метастазирование раковых клеток. Нами были проанализированы ранние события ЭМП на модели нормальных эпителиоцитов IAR-2Q, обработанных эпидермальным фактором роста (EGF). Контрольные клетки формировали стабильные линейные адгезионные контакты (АК), ассоциированные с кольцевым актиновым пучком, и демонстрировали выраженный контактный паралич. При индукции ЭМП под действием EGF уже на начальных этапах происходили выраженные динамические изменения. Спустя 5 минут после добавления EGF в среду, на межклеточных границах наблюдалась разборка кольцевого актинового пучка и формирование актиновой сети в составе псевдоподий, происходила утрата контактного паралича, при этом линейные стабильные АК замещались нестабильными E-кадхериновыми радиальными АК. Радиальные АК колокализовались с механосенсорным белком зиксином, что свидетельствует о возникновении натяжения на межклеточных границах. Иммунофлуоресцентное окрашивание выявило во вновь образующихся псевдоподиях эндосомы, содержащие α -катенина. Эти эндосомы не включали E-кадхерин, что, возможно, говорит о разделении пула кадхеринов и катенинов на ранних этапах ЭМП и выполнении ими разных функций в клетке. Так же на межклеточных границах уже через 5 минут после добавления EGF наблюдалось возникновение ретроградного тока, который может быть вовлечён в появление у эпителиальных клеток передне-задней полярности и стимуляцию миграционной активности. Результаты Вестерн-блоттинга показали, что после стимуляции ЭМП возрастало фосфорилирование белка EPLIN, связанного с кольцевым актиновым пучком, что приводит к убиквитинилированию EPLIN и его деградации. Мы предполагаем, что фосфорилирование EPLIN влечет за собой разборку кольцевого актинового пучка, а высвобождающийся мономерный актин идет на построение актиновой сети псевдоподий на межклеточных границах. Таким образом, ранние этапы ЭМП не ограничиваются событиями на свободном крае клеток, но и включают в себя динамические изменения на межклеточных границах.