

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА ЦИТОЛОГИИ И ГИСТОЛОГИИ

Баскина Софья Владимировна

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Разработка модели органотипических тканевых культур для определения химиочувствительности немелкоклеточных опухолей легкого

Научный руководитель:

Спивак Ирина Михайловна, кандидат биологических наук

Научный консультант:

Алексахина Светлана Николаевна, кандидат биологических наук

Работа выполнена:

НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова

Санкт-Петербург

2021

Оглавление:

Список принятых сокращений	3
Введение	4
Цель и задачи исследования:	5
1. Обзор литературы	6
1.1. Эпидемиология рака легкого	6
1.2. Модели для изучения опухолей рака легкого	8
1.3. Маркеры пролиферации, используемые в клинической практике.....	14
1.4. Методы терапии опухолей легкого	15
1.4.1. Цитостатические препараты	15
1.4.2. Таргетные препараты.....	17
2. Материалы и методы	21
2.1. Материал	21
2.2. Получение пластинок.....	21
2.3. Иммуногистохимическое исследование	22
2.4. Анализ экспрессии маркеров пролиферации	23
2.4.1. Выделение РНК.....	23
2.4.2. Молекулярно-генетический анализ	24
2.5. Транскриптомное секвенирование	24
3. Результаты и обсуждение	26
Выводы	33
Благодарности	34
Список литературы.....	35

Список принятых сокращений

РЛ – рак легкого

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

RT-PCR (real-time PCR) – ПЦР в режиме реального времени

ИГХ - иммуногистохимия

EGFR (Epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста

wt – аллель «дикого типа»

Введение

Рак легкого занимает позицию одного из самых частых онкологических новообразований: ежегодно диагностируется более 2 миллионов случаев [Globocan, 2020]. Данные опухоли также характеризуются большим количеством рецидивов. Наиболее часто встречается немелкоклеточный рак легкого, включающий в себя плоскоклеточные карциномы и аденокарциномы. Несмотря на успехи в применении таргетной терапии, использование цитостатиков, в частности производных платины, является основным подходом к лекарственной терапии РЛ. В связи с широкой распространенностью заболевания необходимо изучить не только механизмы канцерогенеза, но и чувствительность опухолей на лекарственные препараты. Поиск адекватных *in vitro* моделей для оценки химиочувствительности опухолей является одной из актуальных проблем персонализированного подхода в онкологии. Имеющиеся на данный момент модели первичных клеточных культур (2D-, 3D-культивирование), клеточных сфероидов, опухолевых ксенографтов используются в основном в качестве экспериментальных. Дискордантность транскриптомных и геномных профилей в таких моделях по сравнению с первичной опухолью не позволяет использовать их в рутинной клинической практике.

В связи с этим перспективной моделью для оценки химиочувствительности немелкоклеточных опухолей легкого представляются 3D-модели, сохраняющие пространственную структуру ткани и межклеточное взаимодействие – так называемые тканевые экспланты (опухолевые срезы, *tumor tissue slices*). Дополнительным преимуществом данной модели является возможность подобрать наиболее рациональную схему лечения, основанную на индивидуальных особенностях опухоли конкретного пациента. Экспланты представляют собой тонкие срезы опухолевой ткани (300-400 мкм), которые при помещении в питательную среду могут поддерживать жизнеспособность до 7 суток [Meijer et al., 2017]. Возможность использования пластинок для проведения краткосрочных тестов сразу нескольких противоопухолевых препаратов делают данную модель перспективной для использования в клинике.

Цель исследования:

Апробация модели тканевых эксплантов для анализа химиочувствительности немелкоклеточных опухолей легкого *ex vivo*.

Задачи исследования:

1. Выполнить эксперименты по инкубации тканевых эксплантов с противоопухолевыми препаратами.
2. Оценить сохранность ткани после инкубации с применением световой микроскопии.
3. Определить статус клинически значимых мутаций в первичных опухолях (EGFR, KRAS, BRAF, ALK, ROS) для выбора положительных контролей.
4. Сравнить уровень экспрессии маркеров пролиферации на уровне белка и РНК.
5. Определить другие потенциальные маркеры чувствительности опухолей к терапии.
6. Оценить возможность использования метода тканевых пластинок для экспериментальных исследований в клинике.

1. Обзор литературы

1.1. Эпидемиология рака легкого

В настоящий момент рак легкого является одной из самых распространенных онкологических патологий в мире, лишь немногим уступая новообразованиям молочной железы. По состоянию на 2020 год, количество заболевших превышает 2,2 миллиона человек, что составляет 11,4% от общего числа опухолевых заболеваний, при этом летальный исход наблюдается в почти 1,8 млн случаев [Globocan, 2020]. В России за прошлый год было зарегистрировано свыше 63 тысяч случаев заболевания с существенным дисбалансом в сторону мужского населения: число заболевших среди мужчин превышает 50 тысяч, что составляет почти 80% от общего числа российских пациентов с новообразованиями легкого.

Согласно гистологической классификации рак легкого подразделяется на две основные группы: мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легкого.

Мелкоклеточный рак встречается реже (15% от всех случаев рака легкого) и считается более агрессивным новообразованием и встречается в основном у курильщиков. Он характеризуется мелкими размерами клеток, отсутствием светооптических признаков дифференцировки, быстрым ростом опухоли, обширным и быстрым метастазированием и высокой чувствительностью к специфической терапии (Кузьмин И.В., 1999).

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) в свою очередь подразделяется на аденокарциному, плоскоклеточную карциному и крупноклеточную карциному.

Аденокарцинома типично развивается из клеток железистого эпителия, выстилающего дыхательные пути, и чаще распространяется через мягкие ткани в том месте, где она возникает. При высокодифференцированной карциноме опухолевые клетки чаще расположены в виде комплексов, форма клеток переменна с преобладанием округлых и призматических, наблюдается базальное расположение клеточных ядер. Также при аденокарциноме отмечается экспрессия «маркеров аденокарциномы» - белков TTF-1 и/или напсин А (Inamura, 2017). Аденокарцинома составляет до 40-50% случаев NSCLC, при этом известно, что рак легкого у некурящих преимущественно представлен именно новообразованиями железистого происхождения (McIntyre & Ganti, 2017).

Плоскоклеточная карцинома возникает в плоском эпителии и характеризуется локальным распространением. Она составляет 25-40% случаев НМРЛ. Основным гистологическим критерием, определяющим степень дифференцировки плоскоклеточного рака, является выраженность процессов ороговения, однако

различие между высоко-, умеренно- и низкодифференцированной плоскоклеточной карциномой изложено нечетко. Маркерами плоскоклеточного рака легкого, определяемыми с помощью метода иммуногистохимии, являются белки p40, CK5/6 и p63 (Bishop et al., 2012).

Крупноклеточными карциномами считаются опухоли, построенные из крупных полиморфных клеток без светооптически различимых признаков плоскоэпителиальной или железистой дифференцировки. Характерно наличие двух- или многоядерных клеток. Этому типу присуще быстрое увеличение размеров опухоли и метастазирование в другие органы. Такие опухоли составляют 3-5% случаев НМРЛ (Кузьмин И.В., 1999).

Традиционно повышенный риск развития рака легкого связан с курением: несмотря на такие факторы, как контакт с канцерогенными веществами и наследственные причины, подавляющее большинство случаев новообразований легкого вызвано именно употреблением табачных изделий (Ferlay et al., 2007). До начала XX века никотиновая зависимость не была распространенным явлением, а запуск машинного производства сигарет в 1880-х годах был сопряжен с риском – предприниматели не верили в окупаемость такого количества продукции. Тем не менее во время Первой мировой войны началась так называемая «никотиновая эпидемия» - государства активно обеспечивали армии табаком, что связывали в том числе с адаптогенными свойствами никотина. В 1920-х годах было отмечено увеличение заболеваемости раком легкого, однако первые крупные исследования, связавшие данный рост с курением, были опубликованы лишь в 50-е годы прошлого века (Wynder & Muscat, 1995).

Структура заболеваемости раком легкого менялась в зависимости от типа употребляемых табачных изделий. Исторически сигареты производились из крепких сортов табака, содержащих высокое содержание смол. Их употребление в большей степени ассоциировано с возникновением плоскоклеточного типа рака легкого, а основная доля канцерогенов в них представлена полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ). Спустя несколько десятилетий началась популяризация «низкосмолистых» или «легких» сигарет. Несмотря на мнение, что эти сигареты являются более безопасными, чем папиросы, вскоре выяснилось, что их табачный дым содержит большое количество нитрозаминов (Hoffmann et al., 2001). Данный канцероген привел к возрастанию доли аденокарцином среди курящих – если ранее соотношение этих типов рака было 1:18 в пользу плоскоклеточного типа, то теперь оно составляет примерно 1:1,2-1,4.

Отдаленные негативные последствия курения проявили себя уже спустя несколько лет после того, как в Европе и США начали проводить активную антитабачную политику. Так, несмотря на постепенное снижение потребления табака в США с 3800 сигарет на взрослого в год в 1965 г. до 2800 сигарет в 1993 г., смертность от рака легкого к концу XX века достигла высоких значений – 75/100000 в год среди мужчин и 28.5/100000 в год среди женщин. Было также показано, что фазы заболеваемости в Европе у мужчин и женщин не совпадают: в конце 1990-х – начале 2000-х годов имела тенденция к снижению или стабилизации смертности от рака легких у мужчин, что контрастирует с равномерно увеличивающимися показателями, наблюдаемыми среди женского населения (Bray & Weiderpass, 2010).

Схожая ситуация с Европой наблюдается в Бразилии, где пик курения табака пришелся на 1970-е годы, а смертность от рака легких у мужчин достигла пика в 1993 году и продолжает расти среди женщин (Chatenoud et al., 2010).

Важную роль в структуре заболеваемости раком легкого играют региональные особенности употребления табачных изделий: так как большая часть населения Европы и США курила «облегченные» сигареты, в настоящий момент аденокарцинома является доминирующим типом рака легкого на этих территориях. В Российской Федерации развилась совершенно иная ситуация – до недавнего времени основным табачным продуктом были крепкие сигареты и папиросы, соответственно, большая часть случаев новообразований у курящих в России представлена плоскоклеточными карциномами (Cheng et al., 2016). Хотя эта закономерность постепенно становится менее выраженной в связи с распространением легких сигарет в 80-е годы, примерно половина аденокарцином легкого у нас в стране развивается у некурящих больных. Данный факт примечателен и имеет важную клиническую значимость, так как подавляющее большинство мутаций, ассоциированных с ответом рака легкого на лечение, регистрируется только в аденокарциномах, причем преимущественно у некурящих пациентов.

1.2. Модели для изучения опухолей рака легкого

Существуют определенные стандарты и требования, предъявляемые к подбору и тестированию противоопухолевых препаратов. Данные стандарты широко представлены в «Надлежащей лабораторной практике» (Good Laboratory Practice, GLP) и «Надлежащей практике клеточного культивирования» (Good Cell Culture Practice, GCCP) (ГОСТ 33647-2015; Chernov et al., 2018). Разнообразие фармакологических свойств молекул-кандидатов в лекарственные средства диктует

необходимость применения при их тестировании релевантных тест-систем и моделей как *in vitro*, так и *ex vivo* для адекватной оценки результатов клинических исследований. Стадия *in vitro* представляет собой важный этап, на котором проводится скрининг потенциальных и новых противоопухолевых веществ с целью выбора наиболее эффективных против конкретной опухоли препаратов. При этом модель, используемая в исследовании, должна отражать свойства первичной опухоли, а также быть достаточно простой и воспроизводимой (Rizvanov et al., 2013).

В настоящее время культуры клеточных линий остаются наиболее широко используемыми системами для тестирования препаратов. К концу 1980-х годов была разработана панель для тестирования лекарственных средств *in vitro* NCI-60, включающая в себя 60 клеточных линий человека опухолевого происхождения (лейкемия, меланома, рак легких, рак толстой кишки, яичников, груди, почек, простаты и опухоли центральной нервной системы). Клеточные линии NCI-60 имеют известные молекулярные характеристики: экзом, протеом, уровни экспрессии мРНК и микроРНК, ферментная активность, уровень метилирования ДНК, метаболический профиль (Holbeck et al., 2017). Каждая из представленных клеточных линий NCI-60 формирует специфический ответ на тестируемый препарат, что дает уникальный паттерн эффектов, который с помощью компьютерной программы сравнивают с уже описанными паттернами. Дальнейшая работа с панелью показала, что паттерны молекулярной экспрессии могут подразделяться на кластеры, объединяемые на основе биологических свойств и механизма реакции на лекарства. Таким образом, алгоритм позволяет сделать предположение о механизме действия потенциального препарата, а при отсутствии в базе данных схожих паттернов предположить, что механизм действия отличается от ранее известных (Chabner, 2016; Shoemaker, 2006).

Скрининг соединений-кандидатов на панели NCI-60 внес существенный вклад в разработку лекарственных препаратов, в частности, бортезомиба (PS-341, дипептид борной кислоты), селективного ингибитора протеасомы 26S, участвующей в деградации убиквитинированных белков. Уникальная особенность бортезомиба заключается в ингибировании активации ядерного фактора (NF)- κ B за счет стабилизации белка-ингибитора $\text{I}\kappa\text{B}$. Это позволило одобрить использование данного ингибитора для терапии миеломы, поскольку клетки данного типа опухолей зависят от (NF)- κ B-опосредованной транскрипции ростового фактора интерлейкина-6 (J. Adams, 2001; Julian Adams, 2004). Было показано, что бортезомиб очень эффективен в наномолярных концентрациях и проявляет высокую цитотоксичность по отношению к широкому спектру опухолей. Скрининг NCI-60 продолжает оставаться

полезным для лабораторий, но из-за ограниченного набора клеточных линий он постепенно вытесняется панелями, включающими в себя 300 и более клеточных культур. Известный мутационный профиль в сочетании с цитологическими характеристиками клеточных линий позволяет расширить спектр тестируемых противоопухолевых агентов.

Несмотря на преимущества библиотечных клеточных линий, такие как стабильность их характеристик, неограниченность жизни *in vitro* и простота в обращении, их использование в персонализированной терапии представляется затруднительным, поскольку они не дают полной информации об ответе индивидуальной опухоли пациента на терапию даже при сходстве молекулярно-генетического профиля. Культуры клеточных линий не могут в полной мере воспроизвести клеточно-клеточные взаимодействия и микроокружение реальных опухолей, что приводит к серьезным пробелам в понимании молекулярных механизмов, играющих центральную роль в развитии рака (Gillet et al., 2013; Vannucci, 2015). Более сложной моделью являются первичные клеточные культуры, полученные непосредственно от опухолей пациентов. Они могут быть получены как из опухолевой ткани, полученной в результате операции или биопсии, так и из периферической крови, которая может содержать циркулирующие опухолевые клетки. В качестве источников также могут выступать асциты или плевральный экссудат (Kodack et al., 2017). К примеру, первичные культуры, полученные из асцитной жидкости пациентов со sporadическим раком яичников, использовались для проверки возможности расширения использования ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP-ингибиторов), применяемых в терапии BRCA1-ассоциированного рака молочной железы (Mukhopadhyay et al., 2010).

Неоспоримым преимуществом первичных клеточных культур является возможность подобрать наиболее рациональную схему лечения, основываясь на индивидуальных особенностях, характерных для опухоли каждого пациента (Gambar et al., 2018). Недостатком использования данной модели является ограниченность материала, получаемого от пациента, хотя это касается не всех опухолевых заболеваний. Исследования лейкемии и других гематологических злокачественных новообразований отличаются относительной легкостью получения большого количества жизнеспособных раковых клеток для дальнейшего культивирования (Removska et al., 2013). Другим серьезным ограничением модели первичных культур является низкий процент эффективности при их выведении. В исследовании, проведенном Kodack и соавт. (Kodack et al., 2017), было проанализировано 568

образцов, полученных у пациентов с различными онкологическими заболеваниями. Для первичных культур из опухолей разных типов был показан разный процент эффективности получения стабильной культуры. Наибольшего успеха удалось добиться при культивировании рака поджелудочной железы (38%), щитовидной железы (29%) и легкого (29%). Средняя эффективность получения стабильных культур для всех типов опухолей составила 26%. Такой результат связывают с малым количеством опухолевых клеток в исследуемых образцах и быстрым ростом стромальных клеток (фибробластов), вытесняющих опухолевые клетки в процессе пассирования (Miserocchi et al., 2017). С помощью ряда методов можно повысить жизнеспособность первичной культуры, к примеру, использовать «фидерные» клетки для поддержания роста культуры. Эти клетки представляют собой клеточную культуру, полученную из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга или фибробластов, облученную гамма-излучением или обработанную антимиотогеном. Такая культура теряет способность к делению, но продолжает вырабатывать в среду ростовые факторы и микрокомпоненты, способствующие жизнеспособности первичной культуры (Li et al., 2017).

Линии раковых клеток являются ценным инструментом для высокопроизводительного скрининга лекарственных препаратов, хотя использование результатов этих скринингов в клинике может быть затруднительно. В целом, несмотря на преимущества двумерных клеточных культур, монослой клеток не может в полной мере отражать фенотип и морфологические свойства первичной опухоли. В 2D-культуре отсутствует опухолевое микроокружение, васкуляризация, ответ иммунной системы, межклеточные контакты, присущие опухоли. В связи с этим, все большее распространение получают трехмерные модели опухолевой ткани. Они представляют собой системы, в которых клетки растут в трехмерном окружении, формируя структуры, наиболее приближенные по своим характеристикам к первичной опухоли (Lv et al., 2017). Такие свойства, как гетерогенность, сохранение морфологической структуры первичной опухоли, наличие микроокружения и межклеточных контактов и возможность со-культивирования разных типов клеток, приближают 3D-культуры к моделям *ex vivo* и *in vivo* (Nagle et al., 2018).

Одним из примеров подобных методов могут послужить 3D-органоиды, которые, в отличие от клеточных линий, культивируются в специальном трехмерном матриксе. Коллаген и матригель – обычно используемые матрицы для создания трехмерных органоидов. Техника трехмерного культивирования предотвращает прикрепление клеток ко дну планшета, поддерживая клетки в суспензии или

встраивая их в матрицу (Baker et al., 2016). В среду добавляются факторы роста, необходимые для естественного развития тканей. Не являясь полноценной опухолью, органоиды все же в большей степени отражают фенотип и цитоархитектонику карциномы, чем 2D-культуры. Они могут предоставить платформу для тестирования лекарственных препаратов за короткий период времени до или параллельно с проведением клинической терапии пациенту. В работе Vlachogiannis и соавт. органоиды, полученные из биопсии метастазов печени, вызванных гастроэзофагеальным раком, продемонстрировали те же паттерны первичной и приобретенной резистентности к паклитакселу, что и опухоль пациента во время лечения (Vlachogiannis et al., 2018). Главными ограничениями использования органоидов являются отсутствие стандартизированных условий для их культивирования и слабая сосудистая организация, приводящая к гипоксии (Weeber et al., 2017).

Все чаще проводятся исследования с применением технологий по перевиванию опухолей пациентов экспериментальным животным. Подобные опухоли называются ксенографтами. Считается, что, растущие в условиях *in vivo*, они сохраняют свои нативные свойства и микроокружение. Таким образом, это позволяет проводить индивидуальные лекарственные тесты для определения наилучшей схемы лечения. Модельными животными обычно выступают мыши или крысы, однако существуют работы по получению ксенографтов у Zebrafish (Fior et al., 2017). Было показано, что у рыб процесс образования опухолей значительно ускорен в сравнении с грызунами, а терапевтические препараты вызывают фармакологические эффекты, схожие с таковыми у человека. Остается нерешенным вопрос соответствия кариотипа полученных ксенографтов генетическому портрету первичной карциномы. В мышинных опухолях наблюдалось быстрое накопление копий некоторых участков генома, причем приобретенные копии отличались от тех, что появились во время развития опухоли у пациентов. Было также отмечено, что геномная стабильность ксенографтов связана с их ответом на химиотерапию и таргетные препараты (Ben-David et al., 2017). Дискордантность профилей в первичной и получаемой опухолях кажется серьезным препятствием для использования ксенографтов в рутинной терапии.

Более сложной трехмерной моделью, отражающей гетерогенность опухоли, ее морфологическую структуру и микроокружение, являются тканевые пластинки (экспланты, слайсы). Они представляют собой тонкие срезы (300-400 мкм) опухолевой ткани, полученные из первичной опухоли и помещенные в питательную

среду (Nagaraj et al., 2018; Naipal et al., 2016). Исследования, проводившиеся с использованием данной модели, показали, что экспланты могут сохранять свою структуру и жизнеспособность от 2-3 до 7 суток в зависимости от условий культивирования (De Hoogt et al., 2017; Koerfer et al., 2016; Lim et al., 2018; Vaira et al., 2010). Техника их получения проста, не занимает много времени и может быть применена для анализа большинства типов опухолей. Преимуществами данной модели являются возможность сохранения трехмерной структуры, микроокружения и клеточного состава, а также индивидуальных особенностей, характерных для опухоли пациента. Неоспоримым достоинством представляется возможность использовать серию срезов от одного пациента для изучения ответа ткани на терапию разными противоопухолевыми препаратами. Gerlach и соавт. продемонстрировали действие противоопухолевых препаратов на слайсах плоскоклеточного рака головы и шеи человека (Gerlach et al., 2014). После экспозиции пластинок с цисплатином, доцетакселом и цетуксимабом и последующем окрашивании срезов гематоксилин-эозином была обнаружена фрагментация ядер. Иммуногистохимический анализ с использованием антител к каспазе-3 показал индукцию апоптоза, причем данный эффект распространялся на всю область слайсов, что говорит о равномерном проникновении лекарственного препарата. Другая работа была посвящена изучению влияния лекарственных препаратов герцептина, стауроспорина и gefitiniba на пластинки, полученные из тканей опухолей груди, толстой кишки и легких человека (Unger et al., 2015). Срезы, полученные из пластинок, подвергались иммуногистохимическому окрашиванию с применением антител к маркеру пролиферации Ki-67 и маркеру апоптоза каспазе-3. Контрольные слайсы сохраняли способность к пролиферации в клеточной среде не менее 4-х суток, в то время как ткани, инкубированные с препаратом, демонстрировали дозозависимое снижение жизнеспособности. Помимо стандартного метода оценки при помощи иммуногистохимического анализа, влияние препаратов на пластинки может быть определено посредством транскриптного секвенирования. Это было продемонстрировано на примере срезов, полученных от пациента с глиобластомой (Naehnel et al., 2019). Пластинки инкубировали с цитостатическим препаратом темозоломидом, а также подвергали ионизирующему излучению. Затем были выполнены РНК-секвенирование и иммуногистохимическое окрашивание на Ki-67. После инкубирования в среде с препаратом наблюдалось снижение экспрессии 2017 генов, среди которых были гены, участвующие в процессах роста и пролиферации клеток: MKI67, SPP1, PDGFRA, FGF1 и другие. Иммуногистохимическое

исследование также продемонстрировало снижение индекса пролиферации.

Несмотря на то, что тканевые слайсы имеют наиболее близкие к первичной опухоли характеристики и морфологическую структуру, высокопроизводительный скрининг противоопухолевых препаратов с помощью данной модели сопряжен с рядом трудностей. Экспланты не приспособлены к долгосрочному культивированию, диффузия препарата в центральные части среза может быть ограничена, а трехмерная архитектура затрудняет наблюдение за состоянием клеток в режиме реального времени. Тем не менее, простота методики и возможность проведения краткосрочных тестов делают пластинки перспективной моделью для оценки химиочувствительности опухолей.

1.3. Маркеры пролиферации, используемые в клинической практике

Наиболее изученным и часто используемым маркером пролиферации является ген *МК167*, кодирующий ядерный белок *Ki-67*. Впервые он был идентифицирован как антиген в ядрах клеток лимфомы Ходжкина (Gerdes et al., 1983). Было показано, что этот ген экспрессируется во всех фазах клеточного цикла, кроме *G0*, и потому отражает количество митотически активных клеток (J Gerdes et al., 1984). Благодаря этой характеристике *Ki-67* является хорошим предиктором клинических эффектов, связанных с уровнем пролиферации опухолевых клеток (Prihantono et al., 2017; Taylor et al., 2016).

Еще одним широко используемым маркером пролиферации является ядерный антиген пролиферирующих клеток (*PCNA*). Он необходим для синтеза ДНК и является вспомогательным белком ДНК-полимеразы α . Его экспрессия повышается во время фаз *G1/S* клеточного цикла, в то время как в покоящихся или стареющих клетках его уровень сильно снижается (Kelman, 1997). Кроме того, этот белок играет важную роль в механизмах репликации и репарации ДНК, поэтому повышенный уровень экспрессии *PCNA* может быть вызван повреждениями ДНК в отсутствие клеточного цикла (Gaiger De Oliveira et al., 2008). Эту характеристику можно использовать для оценки действия цитостатических препаратов.

Специфическим маркером *S*-фазы является 5-бром-2'-дезоксинуридин (*BrdU*). Особенность этого вещества заключается в том, что его необходимо ввести в организм перед операцией, после чего он включается в ДНК, замещая собой тимидин в процессе репликации. Недостатками данного маркера являются цитотоксичность и достаточно сильный репликационно-зависимый мутагенез в

клетках млекопитающих (Xu et al., 1990). Тем не менее представляется возможным его использование в экспериментах с модельными организмами.

1.4. Методы терапии опухолей легкого

1.4.1. Цитостатические препараты

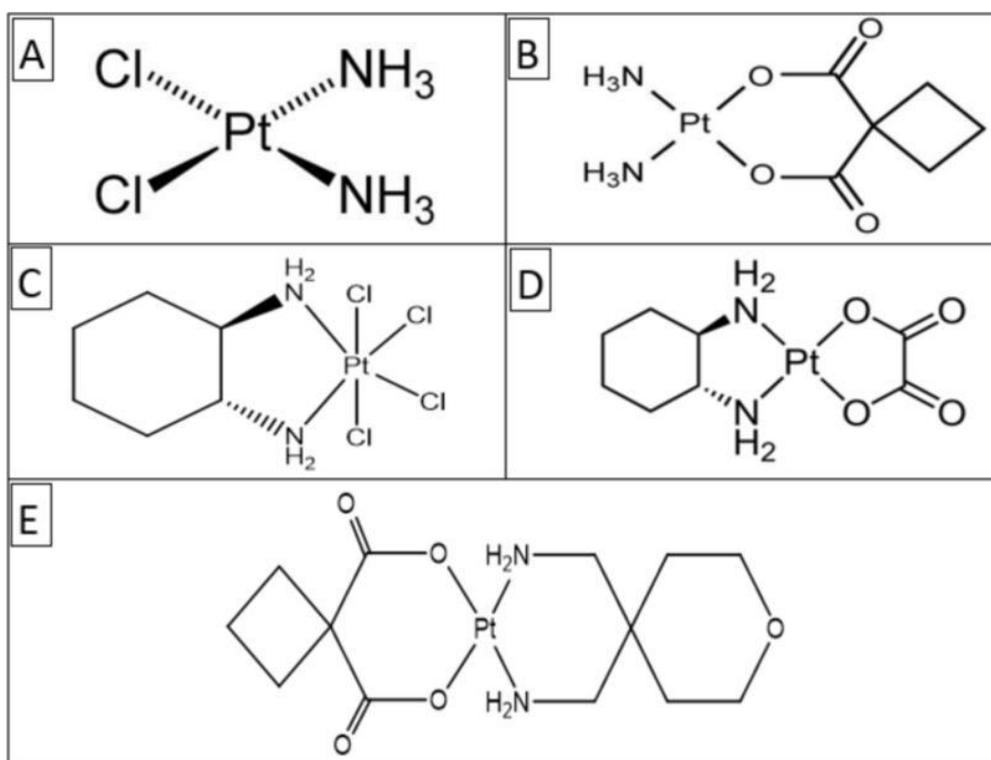
Цитостатические препараты или цитостатики представляют собой группу противоопухолевых препаратов, нарушающих процессы роста, развития и механизмы деления клетки, тем самым инициируя апоптоз. Этот эффект достигается путем воздействия на различные мишени в клетке: ДНК, РНК, ферменты, необходимые для нормальной репликации и репарации ДНК, митотический аппарат клетки и другие. В то же время механизм действия групп цитостатиков может существенно отличаться, что объясняется различиями в химической структуре и метаболизме этих соединений. Цитостатики включают в себя алкилирующие вещества, вызывающие химические повреждения оснований ДНК; антиметаболиты, ингибирующие активность ферментов, необходимых для жизнеспособности клетки; противоопухолевые антибиотики, образующие разрывы ДНК вследствие интеркаляции в молекулу. Терапевтический эффект цитостатиков обусловлен тем, что для опухолевых клеток характерна геномная нестабильность – повышенная чувствительность к ДНК-повреждающим агентам, связанная с дефектом репарации ДНК (Lengauer et al., 1998; Martin et al., 2010).

К алкилирующим агентам относится большое число соединений различных химических групп, однако для химиотерапии опухолей легкого используются лишь несколько препаратов, в частности, комплексные соединения платины. Механизм их работы схож и заключается в повреждении системы репарации ДНК. Соединения платины состоят из двухзарядного иона платины, окруженного четырьмя лигандами, причем хлоридные или карбоксилатные группы являются уходящими, позволяя иону платины образовывать связи с двумя основаниями ДНК (преимущественно гуаниновыми). Аминные лиганды же образуют более сильные взаимодействия с ионом платины и остаются, когда лекарство связывается с ДНК (рис.1). В результате в ДНК образуются внутри- и межнитевые сшивки, на клеточном уровне приводящие к нарушению репликации и транскрипции ДНК (Goodsell, 2006).

Первым из клинически применяемых препаратов платины является цисплатин. В 1960-х годах было обнаружено, что он обладает цитотоксическими свойствами, а в 1978 г. FDA (Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) одобрило

данный препарат для лечения рака (Kelland, 2007). Развивающаяся резистентность опухоли к терапии и многочисленные побочные эффекты, включающие в себя проблемы с почками, аллергические реакции, желудочно-кишечные расстройства, кровотечения и потерю слуха, продиктовали необходимость разработки препаратов платины второго и третьего поколения – карбоплатина и оксалиплатина. Основным недостатком карбоплатина является пониженная эффективность в сравнении с цисплатином, хотя его действие характеризуется большей продолжительностью (период полураспада карбоплатина составляет 30 часов против 1,5-3 часов у цисплатина).

Рис. 1. Химическая структура некоторых препаратов платины: А – цисплатин; В – карбоплатин; С – оксалиплатин; D – ормаплатин; Е – энлоплатин (по Weiss & Christian, 1993)



Исследованы различные пути преодоления лекарственной резистентности опухолей к препаратам платины. Было предложено комбинировать малые дозы цисплатина с препаратами, обладающими иным механизмом действия (Carpuzzo et al., 2003) либо использовать отсутствие перекрестной резистентности к другим препаратам платины (Oh et al., 2005; Платинский Л.В. и др., 2002). В работе Oh и соавт. описано увеличение чувствительности цисплатин-резистентной опухоли к паклитакселу, что является дополнительным аргументом в пользу комбинированной терапии. На сегодняшний день препараты платины остаются основным компонентом большинства схем химиотерапии опухолей.

1.4.2. Таргетные препараты

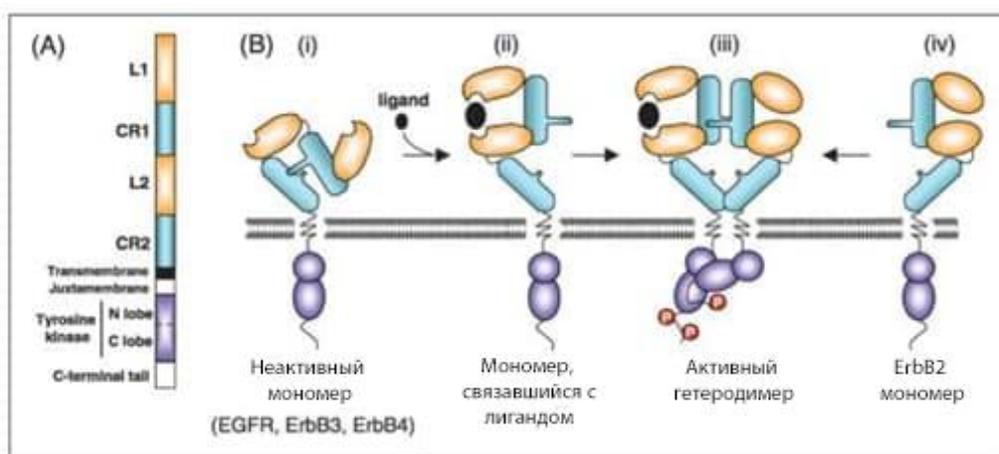
С развитием молекулярной онкологии на передний план вышла разработка препаратов, блокирующих рост и распространение опухоли, воздействуя на определенные молекулы в опухолевых клетках (так называемые «мишени»). Таргетные препараты подразделяют на антитела и низкомолекулярные ингибиторы. Процедура получения антител подразумевает иммунизацию какого-либо животного, с целью получения клона, производящего наиболее терапевтически активные антитела к «мишени». Низкомолекулярные ингибиторы киназ представляют собой аналоги АТФ, связывающиеся с каталитическим центром белка-мишени и препятствующие его взаимодействию с эндогенным АТФ.

Чтобы создать эффективное таргетное лекарство, необходимо найти ту мишень, что играет ключевую роль в пролиферации и жизнеспособности опухолевых клеток. Длительное время считалось, что основным отличием раковой клетки от нормальной является способность к активной пролиферации, поэтому попытки поиска противоопухолевых агентов были сконцентрированы на веществах, обладающих антипролиферативным эффектом. В течение 1990-х годов концепция сменилась: усилия ученых были направлены на идентификацию тех молекул, которые активно экспрессируются в опухоли, но не в нормальных тканях. Опыт применения низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназ, приведший к обнаружению активирующих мутаций в гене эпидермального фактора роста EGFR, показал, что наилучшими мишенями представляются не столько гиперэкспрессированные, сколько мутированные белки (Имянитов Е.Н., 2010).

Продукт гена рецептора эпидермального фактора роста EGFR (HER1/ErbB1) представляет собой рецепторную тирозинкиназу (ТК), влияющую на целый ряд внутриклеточных процессов. Этот рецептор относится к семейству рецепторов эпидермального фактора роста HER/ErbB, которое также представлено другими его видами: HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) and HER4 (ErbB4). Данные структурно родственные рецепторы представляют собой одноцепочечные трансмембранные гликопротеины, состоящие из внеклеточного лиганд-связывающего домена, трансмембранного гидрофобного домена и внутриклеточного тирозинкиназного (ТК) домена (рис. 2). В роли лигандов выступают ростовые факторы EGF, TGF- α и амфирегулин которые аутокринным и/или паракринным путем регулируют активность рецептора эпидермального фактора роста (Hubbard, 2005). Связывание растворимого лиганда с внеклеточным доменом рецептора способствует последовательным конформационным изменениям в виде димеризации рецептора,

активации внутриклеточного тирозинкиназного домена и фосфорилирования С-концевого хвоста. В результате активированная тирозинкиназа либо напрямую, либо через адаптерные белки запускает сигнальные пути Ras/MAPK, PI(3)K/Akt/mTOR, PLC γ /PKC и STAT, регулирующие пролиферацию, рост, миграцию клеток, их устойчивость к апоптозу (Bromberg, 2002; Normanno et al., 2006; Shaw & Cantley, 2006).

Рис. 2. Структура рецепторов семейства ErbB (по Wieduwilt & Moasser, 2008, с изм.)

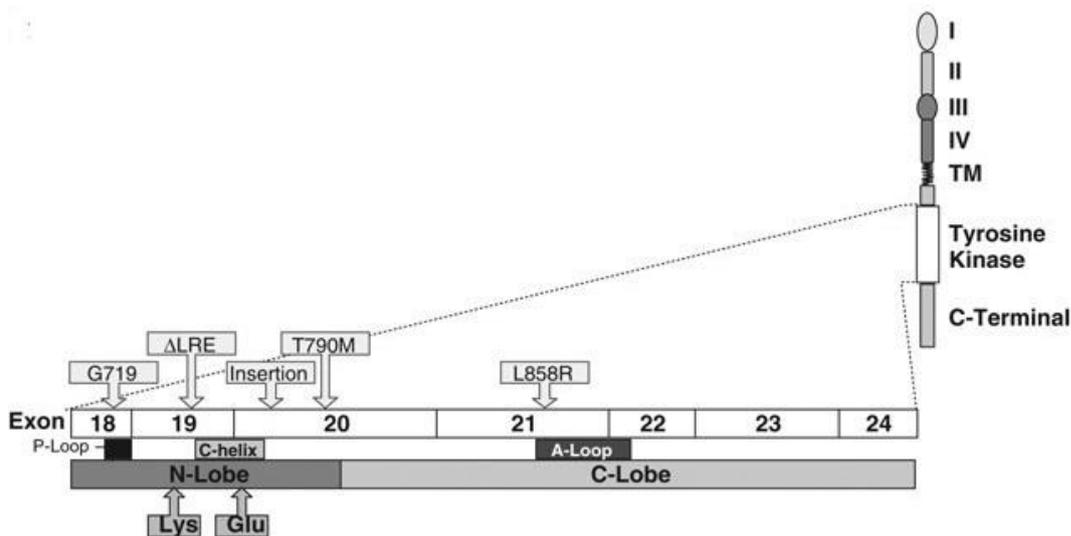


В опухолевых клетках активность тирозинкиназы EGFR может нарушаться из-за множества механизмов, включая избыточную продукцию факторов роста, появление мутаций гена EGFR, увеличение числа копий гена и сверхэкспрессию белка EGFR (Ciardiello & Tortora, 2008). В результате это приводит к увеличению выживаемости, пролиферации и метастазирования злокачественных клеток.

Мутации киназного домена EGFR при раке легких называют «активирующими мутациями», потому что они дестабилизируют неактивную конформацию белка, тем самым приводя к лиганд-независимой активации рецептора (Yun et al., 2007). Их клиническая значимость была обнаружена случайно благодаря исследованиям ингибиторов EGFR. Изначально разработка этих препаратов основывалась на том факте, что гиперэкспрессия EGFR наблюдается в опухолях более чем у 60% пациентов с метастатическим НМРЛ (Sharma et al., 2007). На основе результатов лабораторных исследований к клиническим испытаниям фазы II были допущены препараты gefitinib и erlotinib. Тем не менее, клинические испытания показали, что на терапию ответило лишь 10% европейских и 30% азиатских пациентов (Smrdel & Kovač, 2006; Thatcher et al., 2005). Последующее секвенирование гена EGFR показало, что карциномы, ответившие на терапию ингибиторами тирозинкиназ, несли мутации в первых четырех экзонах киназного домена EGFR (рис.3) (Kosaka et al., 2004; Shigematsu et al., 2005). Было отмечено, что генетические

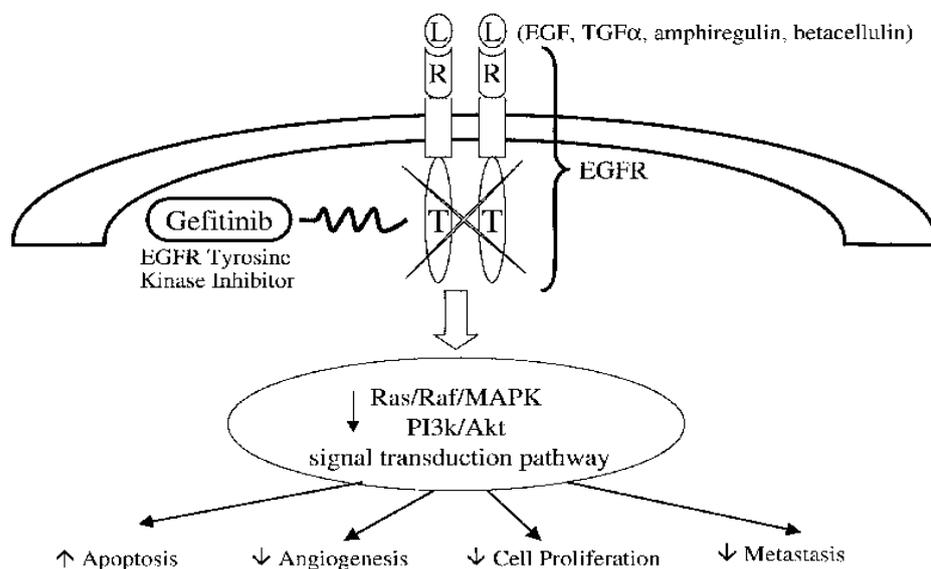
повреждения EGFR чаще встречаются у женщин, некурящих пациентов, пациентов с аденокарциномами легких и пациентов азиатского происхождения (Park & Goto, 2006; Thatcher et al., 2005).

Рис. 3. Расположение наиболее частых мутаций в ТК-домене EGFR (по Kumar et al., 2008, с изм.)



Делеции в 19 экзоне и точечная мутация L858R в 21 экзоне являются наиболее распространенными активирующими мутациями, связанными с чувствительностью к gefитинибу и эрлотинибу (Jackman et al., 2006; Kumar et al., 2008). Соматические мутации EGFR вовлекают АТФ в АТФ-связывающий карман в ТК-домене, что приводит к лиганд-независимой активности рецептора. Механизм действия ингибиторов тирозинкиназ (рис. 4) заключается в конкурентном связывании в АТФ-связывающей области, за счет чего происходит ингибирование работы ТК-домена и блокирование нижестоящих сигнальных каскадов (Stamos et al., 2002).

Рис. 4. Механизм действия gefитиниба (по Liu & Seen, 2003)



Таким образом, наличие в опухоли легкого активирующей мутации гена EGFR считается надежным предиктором ответа на терапию ингибиторами тирозинкиназ. Системный поиск инtragenных мутаций в опухолевой ДНК может принципиально изменить стратегию разработки новых таргетных препаратов.

2. Материалы и методы

2.1. Материал

В исследование включали образцы пациентов с диагнозом рак легкого, проходящих оперативное лечение на базе НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова.

Для приготовления тканевых пластинок использовали свежий операционный материал 28 пациентов. Данный опухолевый материал использовался для анализа химиочувствительности с помощью тканевых пластинок и молекулярно-генетического анализа. Для пациентов выполнялся анализ клинически-значимых соматических мутаций в генах EGFR, KRAS, BRAF, а также транслокаций ALK, ROS1, RET, MET по протоколам, ранее разработанным в лаборатории молекулярной онкологии (Moiseyenko et al., 2010; Yanus et al., 2013; Моисеенко Ф.В. и др., 2018).

Работа выполнялась при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 17-75-30027). Разрешение этического комитета на использование человеческого материала получено.

2.2. Получение пластинок

Небольшой образец ткани опухоли легкого, полученный в ходе операции, помещался в раствор легкоплавкой агарозы до застывания, после чего с помощью микротомы получали серийные опухолевые срезы (пластинки) толщиной 400 мкм, которые затем попарно помещали в 24-луночный планшет. Такие идентичные друг другу пластинки назывались «зеркальными». В каждую лунку с пластинками вносили 1 мл полной питательной среды с противоопухолевыми препаратами в соответствии с протоколом исследований. В контрольные лунки вносили 1 мл полной питательной среды без препарата. Для оценки чувствительности опухолей применялись такие препараты, как ингибитор тирозинкиназ Гефитиниб и цитостатический препарат Цисплатин. Концентрации использованных препаратов представлены в таблице 1.

Табл. 1. Концентрации препаратов, использованных в эксперименте.

Цисплатин CA209		Гефитиниб CST	
Ц1	15 мкг/мл	Г4	4 мкг/мл
Ц2	30 мкг/мл	Г6	6 мкг/мл
Ц3	45 мкг/мл	Г8	8 мкг/мл

Затем пластинки инкубировали при постоянном перемешивании в CO₂ инкубаторе при температуре 37° в течение 24 часов. После инкубации пластинки извлекались из среды. Одну из «зеркальных» пластинок фиксировали в формалине и окрашивали на маркер пролиферации Ki67 методом иммуногистохимии для

последующего морфометрического анализа количества пролиферирующих клеток в каждом образце. Вторую помещали в раствор RNAlater и хранили при температуре -80° до этапа молекулярно-генетического анализа.

2.3. Иммуногистохимическое исследование

Пластинки, фиксированные в формалине, заключались в блоки, а затем заливались в парафин. Затем с каждого парафинового блока с помощью микротомы Leica SM 2000R были получены срезы толщиной 6 микрон. Далее проводилось иммуногистохимическое исследование по следующей методике:

1. Срезы расправлялись на водяной бане, после чего помещались на стекло, покрытое L-полилизином и высушивались в термостате при температуре 37° в течение 2 часов.
2. Депарафинизация срезов в о-ксилоле два раза по 5 мин.
3. Отмывание и обезвоживание в четырех сменах 96% спирта по 5 мин.
4. Блокирование эндогенной пероксидазы в 3% водном растворе перекиси водорода в течение 5 мин.
5. Промывка стекол в дистиллированной воде в течение 3 мин.
6. Демаскировка антигенов с помощью кипячения в цитратном буфере (pH = 6.0) или в ЭДТА (pH = 9.0) в водяной бане при температуре буфера 95° в течение 20 мин, после чего еще 20 мин стекла остужались в контейнерах при комнатной температуре.
7. Отмывание стекол в дистиллированной воде с последующим промыванием в TBS дважды по 5 минут.
8. Инкубация с первичными антителами (Ki67 – clone SP6 (DBS), разведены Antibody Diluent with Background Reducing Components (Dako, Denmark)) в течение 1 часа при температуре 20°, после чего проводилось промывание в TBS-буфере дважды по 5 минут.
9. Инкубация со вторичными антителами при помощи биотин-стрептавидин-пероксидазного метода с диаминобензидином в качестве хромогена и последующее промывание срезов в дистиллированной воде в течение 3 минут.
10. Докрашивание ядер гематоксилином Майера в течение 1-2 минут и последующее отмывание в воде в течение 15 минут.
11. Дегидратация срезов в двух сменах 96% спиртов и двух изопропиловых спиртов, осветление в ксилоле в течение 5 минут. Заключение в канадский бальзам.

Результаты окрашивания оценивались с помощью микроскопа Leica DM 2000M. Инкубация с первичными антителами к гену Ki67 давала ядерное коричневое окрашивание. Процент Ki67-позитивных опухолевых клеток подсчитывался в трех полях каждой пластинки с помощью программ ImageJ и Qupath.

2.4. Анализ экспрессии маркеров пролиферации

2.4.1. Выделение РНК

Выделение РНК из пластинок, фиксированных RNAlater, производилось по следующей схеме:

1. Пластинки извлекались из RNAlater, после чего остатки фиксатора удалялись с помощью чистой бумажной салфетки. Затем ткань помещалась в пробирки для гомогенизатора.
2. Заморозка пробирок с образцом в жидком азоте.
3. Пробирки помещались в гомогенизатор на максимальную скорость на 90 сек.
4. Пробирки охлаждали в жидком азоте, после чего добавляли 200 мкл тризола. Затем пробирки снова помещались в гомогенизатор на среднюю скорость на 90 сек.
5. Получившийся объем тризола переносили в чистые пробирки (1.5 мл, с плотной закрывающейся крышечкой Eppendorf Safe-Lock Tubes) и добавляли 0,3 объема хлороформ–изоамилового спирта.
6. Пробы помещались на шейкер и тщательно перемешивались.
7. Образцы центрифугировались при 15000 rpm в течение 20 минут при температуре ротора 0-4°C.
8. Надосадочную жидкость отбирали в чистые эпендорфы, избегая забора интерфазы. Далее добавляли 1 мкл раствора гликогена в качестве ко-осадителя, и 100 мкл изопропанола, перемешивали.
9. Центрифугировали пробы при 15000 rpm в течение 30 минут при температуре ротора 0-5°C. После центрифугирования на дне пробирок появлялось небольшое количество белого осадка.
10. Отбирали изопропанол, после чего промывали осадок в 500 мкл 70% этанола в течение 10 минут, слегка встряхивая пробирку. Далее собирали осадок центрифугированием при 15000 rpm в течение 5 минут при комнатной температуре. Этанол тщательно удаляли и подсушивали пробы при комнатной температуре или в термостате.
11. Получившийся осадок растворяли в 50 мкл стерильной воды. 9 мкл раствора использовали в реакции обратной транскрипции для получения кДНК.

2.4.2. Молекулярно-генетический анализ

В качестве маркеров пролиферации были выбраны Ki67 и TPX2. TPX2 является микротрубочко-ассоциированным белком, высокий уровень экспрессии которого связан с повышенной пролиферативной активностью опухолевых клеток. Данный маркер практически не используется в клинических исследованиях, однако по экспрессионным базам данных его экспрессия коррелирует с экспрессией Ki67 (Chang et al., 2012).

После получения кДНК из пластинок нами проводилась RT-PCR с праймерами, амплифицирующими участок, ограниченный следующим образом: первый праймер находился в одном экзоне, а второй – в следующем экзоне. Таким образом мы избегали амплификации ДНК. После получения кривых амплификации нами проводилась оценка относительной экспрессии с помощью метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$:

- 1) Для каждой индивидуальной пластинки рассчитывалась внутренняя Δ между циклами амплификации гена-мишени TPX2 и гена-рефери SDHA, относящегося к группе генов домашнего хозяйства.
- 2) Затем высчитывали $\Delta\Delta Ct$ по формуле $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{эксперимент}) - \Delta Ct(\text{контроль})$, где в качестве контроля использовались результаты пластинки, инкубированной в питательной среде без препарата.
- 3) После высчитывали относительную экспрессию $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

На графиках (рис. 10, 11) представлена относительная экспрессия TPX2 в виде значений $-\Delta\Delta Ct$.

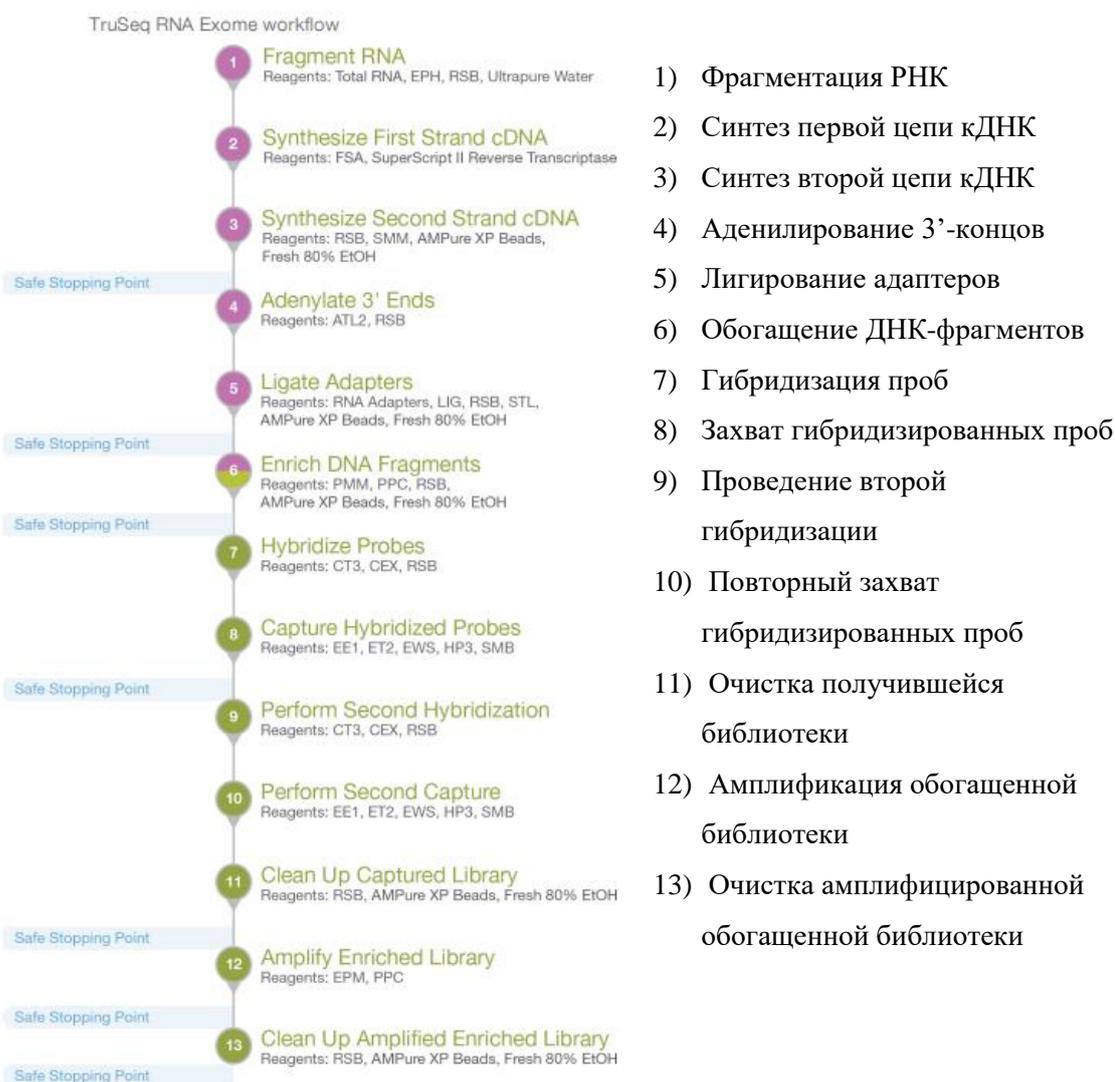
2.5. Транскриптомное секвенирование

Для выявления маркеров чувствительности на транскриптомное секвенирование было отобрано 7 образцов, продемонстрировавших «крайние» результаты экспрессии мРНК TPX2, то есть те, что оказались «резистентными» либо «чувствительными» после экспозиции с препаратами. Транскриптомное секвенирование было проведено с помощью набора TruSeq RNA Exome по протоколу производителя на приборе NextSeq 500. Данный набор требует меньшего количества входной РНК и меньшего количества чтений, что позволяет увеличить количество анализируемых образцов и снижает стоимость исследования. Truseq RNA Exome включает более 425000 зондов, покрывающих 98,3% референсного генома человека NCBI37/hg19 и охватывающих 21415 представляющих интерес генов. Последовательность этапов пробоподготовки РНК

представлена на рис. 5. Биоинформатическая обработка выполнялась с помощью пакета для языка программирования R DESeq2.

По данным биоинформатической обработки была построена тепловая карта дифференциальной экспрессии генов при воздействии gefitinib и cisplatin (рис. 12). По результатам транскриптного секвенирования для дальнейшего анализа были выбраны кандидатные гены, уровень экспрессии мРНК которых был оценен методом ПЦР в режиме реального времени в 173 пластинках, полученных от 21 пациента. Выделенные из пластинок нуклеиновые кислоты перед проведением реакции обратной транскрипции обрабатывали ДНКазой. Для оценки значимости полученных результатов был использован метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Результаты оценки экспрессии кандидатных генов сравнивали с помощью теста Манна-Уитни.

Рис.5. Последовательность этапов подготовки обогащенной библиотеки РНК с помощью набора TrueSeq RNA Exome (2018 Illumina, Inc.)



3. Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетический анализ был проведен для 28 пациентов. Было обнаружено 4 образца с активирующими мутациями EGFR и по 2 образца с мутациями генов BRAF, MET, ROS1, KRAS. В таблице 2 представлены данные о найденных нами мутациях.

Табл. 2. Результаты молекулярно-генетического анализа опухолей пациентов

NSCLC#	Возраст	Пол	Гистология	Мутация
210	64	Ж	аденокарцинома	EGFR ex19del
211	54	М	аденокарцинома	wt
212	82	Ж	плоскоклеточный	wt
213	73	Ж	аденокарцинома	wt
214	73	М	плоскоклеточный	wt
216	70	Ж	аденокарцинома	wt
217	71	Ж	аденокарцинома	EGFR L858R
222	70	М	аденокарцинома	KRAS G12F
223	71	Ж	аденокарцинома	BRAF V600E
224	70	М	аденокарцинома	wt
228	67	Ж	аденокарцинома	wt
229	63	М	аденокарцинома	wt
231	60	М	плоскоклеточный	CD74ex6/ROS1ex34
232	68	М	плоскоклеточный	wt
233	45	М	аденокарцинома	EML4ex6/ALKex20 (V.3)
234	71	Ж	аденокарцинома	EGFR ex19del
235	60	Ж	аденокарцинома	wt
236	62	М	аденокарцинома	wt
238	29	Ж	аденокарцинома	wt
239	71	Ж	аденокарцинома	SDC4ex2/ROS1ex32
240	63	Ж	плоскоклеточный	wt
241	55	Ж	аденокарцинома	wt
242	68	М	плоскоклеточный	EGFR L858R
243	56	Ж	аденокарцинома	MET ex14del
244	54	Ж	аденокарцинома	MET ex14del
245	74	Ж	аденокарцинома	wt
246	69	М	аденокарцинома	BRAF V600E
247	65	М	немелко-кл. РЛ	KRAS G12C

В качестве положительных контролей были выбраны образцы с активирующими мутациями гена EGFR как чувствительные к ингибиторам тирозинкиназы.

В процессе исследования было получено 210 пластинок от 28 пациентов. Была проведена оценка сохранности ткани после инкубации в среде (рис. 6, 7). По результатам сравнения полученных фотографий образцов с фотографиями контролей сохранность большей части материала представляется удовлетворительной.

Рис. 6. Окрашивание гематоксилин-эозином, объектив 100х

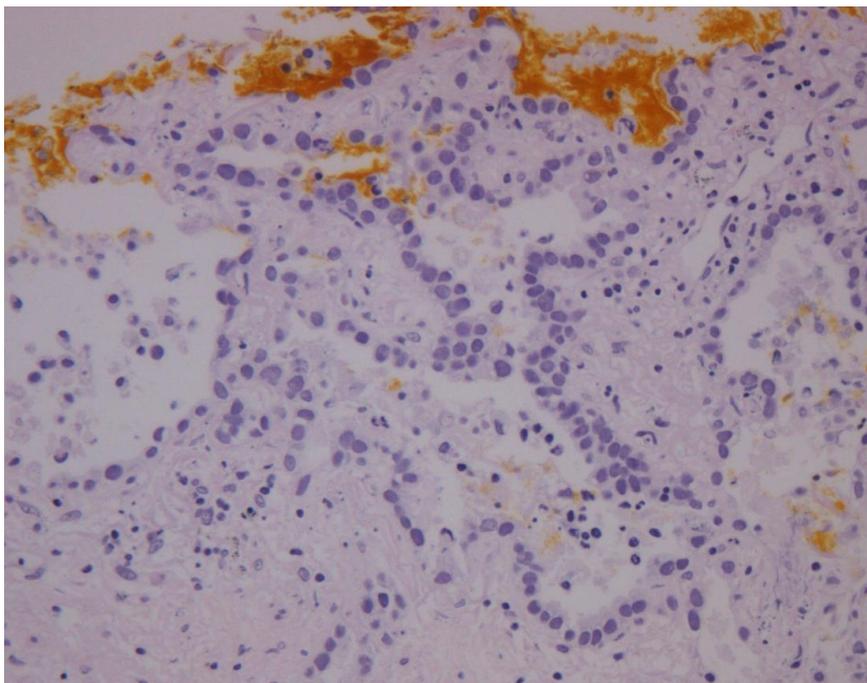
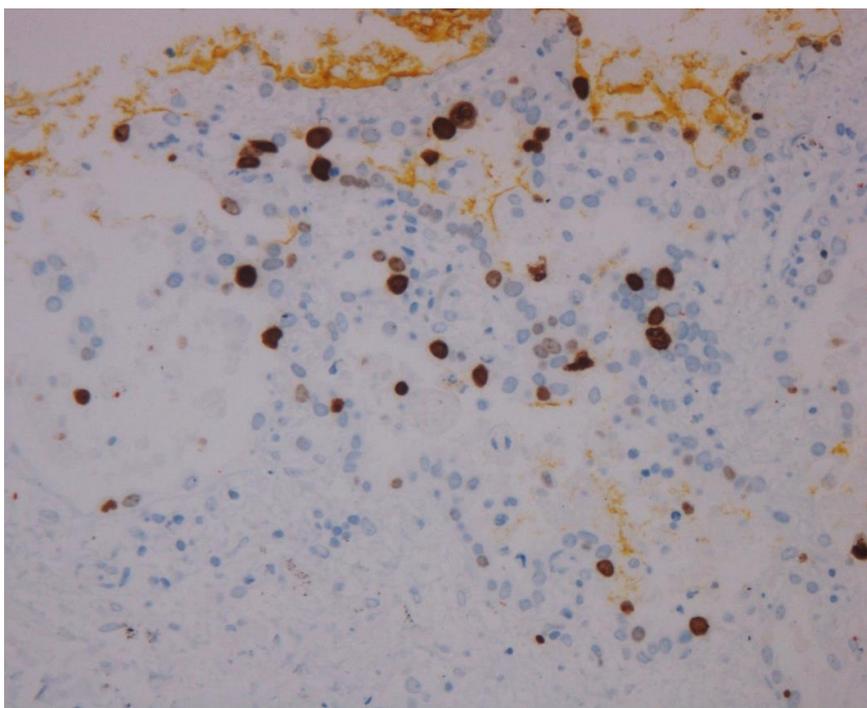
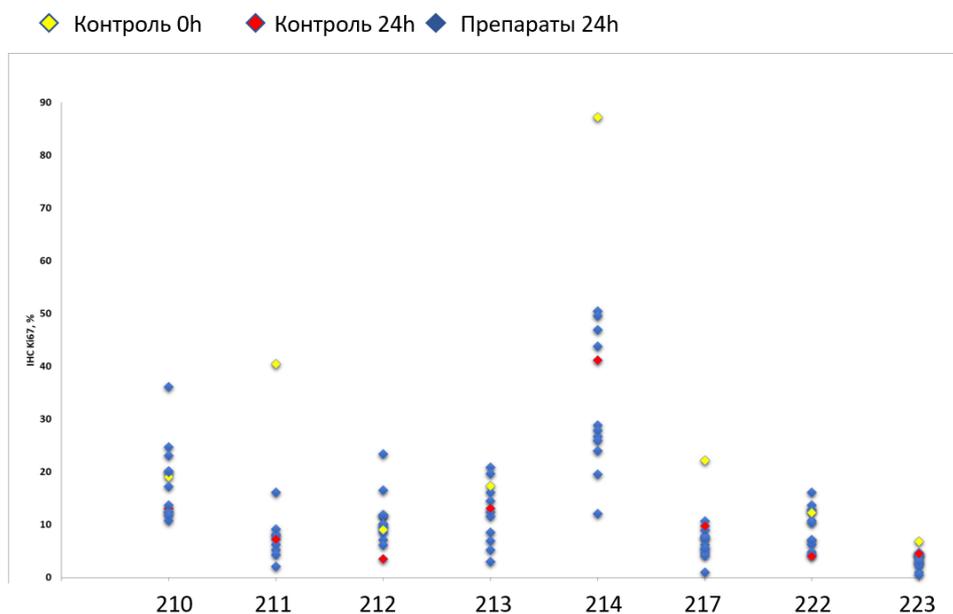


Рис. 7. Иммуногистохимия с первичными антителами Ki67, объектив 100х



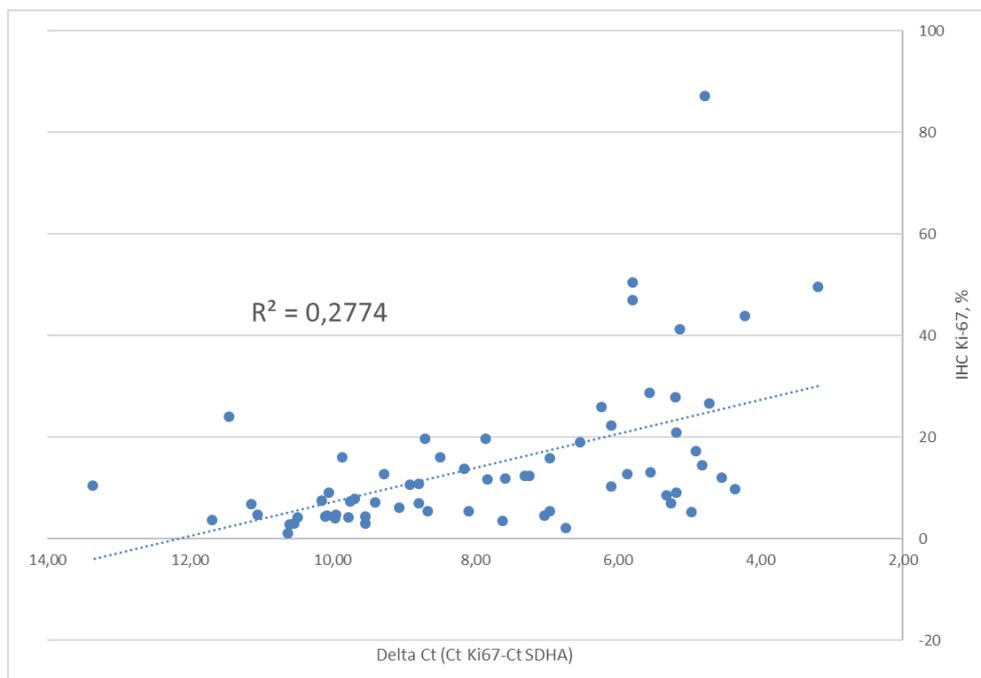
Была проведена оценка изменения уровня экспрессии Ki67 на уровне белка в пластинках, которые инкубировались в противоопухолевых препаратах. Результаты не позволили выявить эффект препаратов в пластинках (рис. 8).

Рис. 8. Результаты иммуногистохимического исследования Ki67



Было проведено сравнение данных, полученных методами ИГХ и RT-PCR (рис. 9). Результаты, полученные с использованием этих двух методик, имеют значительную дискордантность ($R^2=0,2774$). Это может быть связано с тем, что иммуногистохимическая оценка характеризовалась высоким уровнем субъективности и плохой воспроизводимостью.

Рис. 9. Сравнение данных, полученных методами ИГХ и RT-PCR.



Таким образом, для дальнейшего исследования было решено использовать только анализ экспрессионных РНК-маркеров, преимуществом исследования которых является возможность точной численной оценки значений и анализа полученных данных в полуавтоматическом режиме.

Так как экспрессии Ki67 и TPX2 коррелировали между собой, для оценки экспрессии было принято решение использовать только маркер TPX2. На рис. 10 представлено изменение относительной экспрессии TPX2 в образцах по сравнению с их контрольной пластинкой. На графике совмещены все проанализированные точки, чтобы оценить, как реагируют на препараты пластинки с EGFR-мутацией. Опухоли с активирующими мутациями EGFR демонстрировали уменьшение относительной экспрессии маркера пролиферации TPX2 при инкубации с gefitinibом. Реакцию на цисплатин в виде уменьшения относительной экспрессии продемонстрировало большее количество образцов (рис. 11). Однако в связи с отсутствием клинически подтвержденных положительных контролей мы на данном этапе не можем сказать, соответствует ли это клиническому ответу.

Рис. 10. Изменение относительной экспрессии TPX2 при экспозиции с gefitinibом

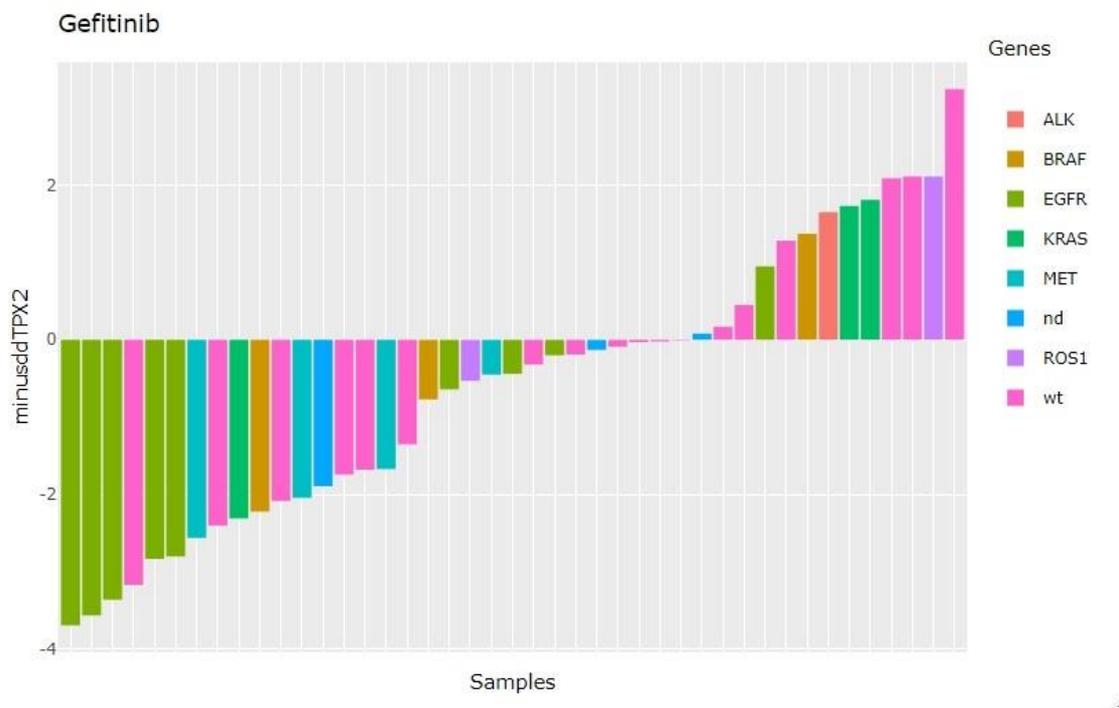
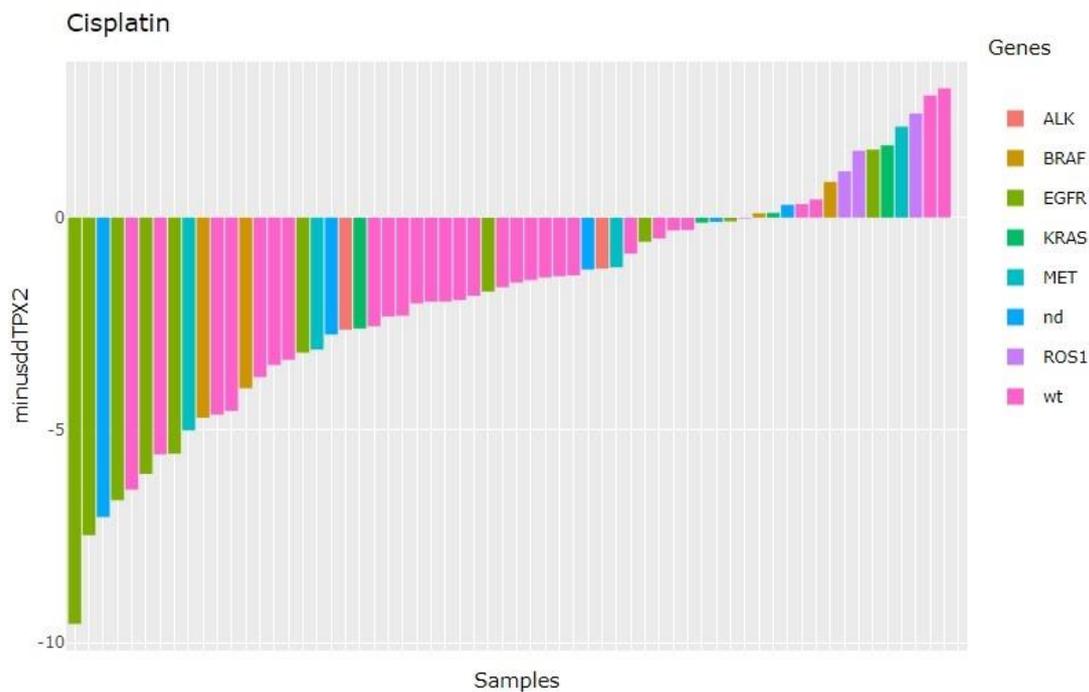


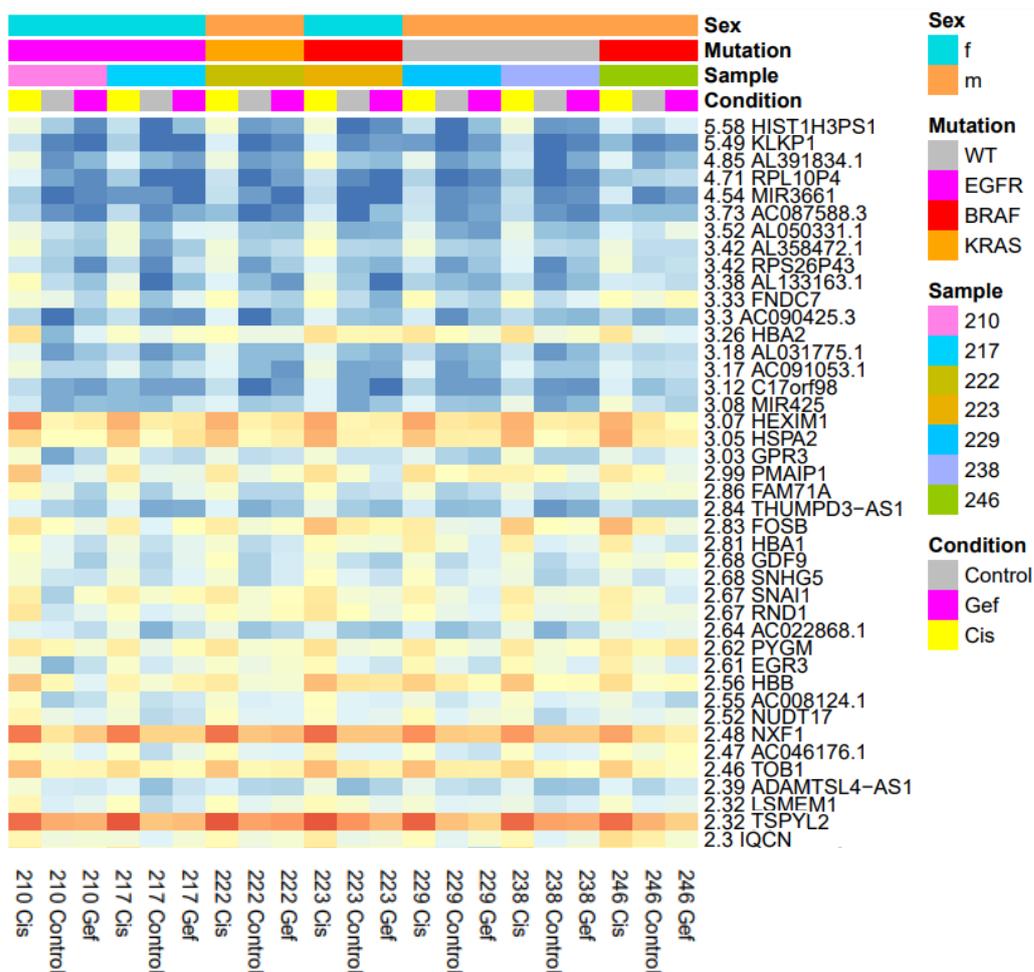
Рис. 11. Изменение относительной экспрессии TPX2 при экспозиции с цисплатином



Фрагмент «тепловой карты» изменений экспрессии генов при воздействии gefitiniba и цисплатина представлен на рис. 12.

После воздействия gefitiniba на тканевые пластинки с мутацией и без мутации EGFR не обнаружили гены с достоверно изменяющейся экспрессией. Это может быть связано с неудачно подобранной концентрацией препарата или более сложными процессами активации ответа клеток на терапию ингибиторами тирозинкиназ.

Рис. 12. Фрагмент «тепловой карты» изменений экспрессии генов при воздействии gefитиниба и цисплатина

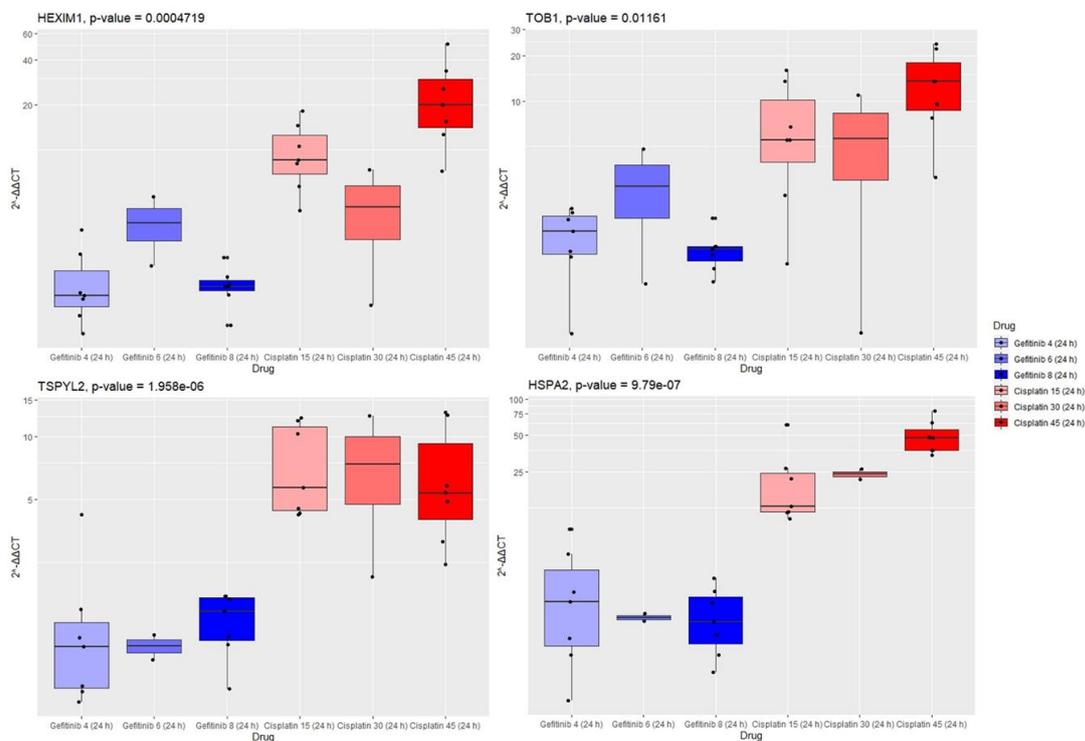


Для дальнейшего анализа по результатам транскриптомного секвенирования были выбраны гены HEXIM1 (\log_2FC 3.07), HSPA2 (\log_2FC 3.05), TOB1 (\log_2FC 2.46) и TSPYL2 (\log_2FC 2.32), экспрессия которых увеличилась при обработке эксплантов цисплатином. Для оценки воспроизводимости данных результатов уровень экспрессии мРНК HEXIM1, HSPA2, TOB1 и TSYPL2 был оценен методом RT-PCR в 173 пластинках, полученных от 21 пациента. Было обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии всех кандидатных генов при воздействии на тканевые пластинки цисплатина, но не gefитиниба (рис. 13). Дозозависимого эффекта препаратов обнаружено не было.

Данные результаты демонстрируют, что клетки, находящиеся в тканевой пластинке, реагируют на воздействие препарата платины в клеточной среде в соответствии с его механизмом действия (активируется система репарации ДНК). Так, HEXIM1 является ингибитором транскрипции РНК - полимеразы II, и действует как опухолевый супрессор (Michels & Bensaude, 2018). Также увеличение экспрессии HEXIM1 предотвращает убиквитинирование p53 и увеличивает его стабильность, что

приводит к усилению регуляции генов-мишеней p53 (Lew et al., 2013). Было обнаружено, что *HEXIM2* – ген, родственник *HEXIM1* – экспрессируется при раке легких в шесть раз выше, чем в обычной ткани (Byers et al., 2005). *HSPA2* – ген белка теплового шока семейства А (*Hsp70*). Он выполняет функцию молекулярного шаперона и участвует в большом количестве клеточных процессов, включая защиту протеома от стресса, фолдинг и транспорт вновь синтезированных полипептидов, активацию протеолиза неправильно свернутых белков, а также образование и диссоциацию белковых комплексов. Его повышенная экспрессия может иметь определенное прогностическое значение при карциноме легкого. В частности, было показано, что высокий уровень *HSPA2* у пациентов с НМРЛ связан с более низкой общей выживаемостью на поздних стадиях развития заболевания (Sojka et al., 2020). Кодированный белок гена *TSPYL2* участвует в ремоделировании хроматина и выполняет функции ингибитора клеточного цикла. *TOB1* кодирует белок семейства *tob/btg1*, подавляет рост клеток в культуре ткани и может действовать как опухолевый супрессор. Более высокие значения *tob/btg1* ассоциированы с лучшей общей выживаемостью пациентов с аденокарциномой легкого, при этом для пациентов с плоскоклеточным раком легкого такой тенденции не обнаружено (Bai et al., 2017).

Рис. 13. Относительная экспрессия кандидатных генов в тканевых пластинках: обработка gefитинибом (4, 6, 8 мкг/мл) и цисплатином (15, 30, 45 мкг/мл).



Выводы

1. Выполнены работы по получению и инкубации тканевых эксплантов опухолей легкого с цисплатином и гефитинибом для образцов 28 пациентов.
2. После инкубации в части материала было выявлено структурное изменение ткани, связанное с действием цитостатических и таргетных препаратов. Сохранность большей части материала представляется удовлетворительной.
3. Выполнен анализ клинически значимых мутаций в первичных опухолях, включенных в исследование. В качестве положительных контролей чувствительности к гефитинибу определены опухоли с активирующими мутациями гена EGFR.
4. Коэффициент корреляции результатов иммуногистохимического и ПЦР-анализа уровня экспрессии маркера пролиферации ki-67 составил $R^2=0,27$, что свидетельствует о значительной дискордантности результатов, полученных этими методами.
5. По результатам транскриптомного секвенирования в качестве потенциальных маркеров реакции опухолевой ткани на воздействие цисплатина были выбраны гены HEXIM1, HSPA2, TOB1 и TSYPL2.
6. Тканевые пластинки представляются перспективной моделью для оценки эффекта лекарственной терапии *ex vivo*.

Благодарности

Выражаю благодарность научному руководителю Алексахиной Светлане Николаевне за неоценимую помощь и ценные рекомендации.

Также выражаю признательность коллективу лаборатории молекулярной онкологии за поддержку в проведении исследования.

Благодарю друзей и семью за моральную поддержку.

Список литературы

1. Adams, J. (2001). Proteasome inhibition in cancer: Development of PS-341. *Seminars in Oncology*, 28(6), 613–619. [https://doi.org/10.1016/S0093-7754\(01\)90034-X](https://doi.org/10.1016/S0093-7754(01)90034-X)
2. Adams, Julian. (2004). The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. In *Cancer Cell* (Vol. 5, Issue 5, pp. 417–421). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00120-5)
3. Bai, Y., Qiao, L., Xie, N., Shi, Y., Liu, N., & Wang, J. (2017). Expression and prognosis analyses of the Tob/ BTG antiproliferative (APRO) protein family in human cancers. *PLoS ONE*, 12(9), e0184902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184902>
4. Baker, L. A., Tiriach, H., Clevers, H., & Tuveson, D. A. (2016). Modeling Pancreatic Cancer with Organoids. In *Trends in Cancer* (Vol. 2, Issue 4, pp. 176–190). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.03.004>
5. Ben-David, U., Ha, G., Tseng, Y. Y., Greenwald, N. F., Oh, C., Shih, J., McFarland, J. M., Wong, B., Boehm, J. S., Beroukhi, R., & Golub, T. R. (2017). Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nature Genetics*, 49(11), 1567–1575. <https://doi.org/10.1038/ng.3967>
6. Bishop, J. A., Teruya-Feldstein, J., Westra, W. H., Pelosi, G., Travis, W. D., & Rehkman, N. (2012). P40 (Δ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Modern Pathology*, 25(3), 405–415. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.173>
7. Bray, F. I., & Weiderpass, E. (2010). Lung cancer mortality trends in 36 European countries: Secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970–2007. *International Journal of Cancer*, 126(6), 1454–1466. <https://doi.org/10.1002/ijc.24855>
8. Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1139–1142. <https://doi.org/10.1172/jci15617>
9. Byers, S. A., Price, J. P., Cooper, J. J., Li, Q., & Price, D. H. (2005). HEXIM2, a HEXIM1-related protein, regulates positive transcription elongation factor b through association with 7SK. *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16360–16367. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500424200>
10. Cappuzzo, F., De Marinis, F., Nelli, F., Calandri, C., Maestri, A., Benedetti, G., Migliorino, M. R., Cortesi, E., Rastelli, F., Martelli, O., Andrucetti, M., Bartolini, S., & Crinò, L. (2003). Phase II study of gemcitabine-cisplatin-paclitaxel triplet as induction chemotherapy in inoperable, locally-advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 42(3), 355–361. [https://doi.org/10.1016/S0169-5002\(03\)00365-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5002(03)00365-9)
11. Chabner, B. A. (2016). NCI-60 Cell Line Screening: A Radical Departure in Its Time. In *Journal of the National Cancer Institute* (Vol. 108, Issue 5). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv388>
12. Chang, H., Wang, J., Tian, Y., Xu, J., Gou, X., & Cheng, J. (2012). The TPX2 gene is a promising diagnostic and therapeutic target for cervical cancer. *Oncology Reports*, 27(5), 1353–1359. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1668>
13. Chatenoud, L., Bertuccio, P., Bosetti, C., Levi, F., Curado, M. P., Malvezzi, M., Negri, E., & Vecchia, C. La. (2010). Trends in cancer mortality in Brazil, 1980–2004. *European Journal of Cancer Prevention*, 19(2), 79–86. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328332333be>
14. Cheng, T. Y. D., Cramb, S. M., Baade, P. D., Youlten, D. R., Nwogu, C., & Reid, M. E. (2016). The international epidemiology of lung cancer: Latest trends, disparities, and tumor characteristics. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(10), 1653–1671. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.021>

15. Chernov, A. N., Barantsevich, E. P., Kalunov, V. N., & Galagudza, M. M. (2018). The methods of in vitro selection of chemotherapeutic drugs for individual chemotherapy of malignant tumors in patients. *Translational Medicine*, 5(3), 45–65. <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2018-5-3-45-65>
16. Ciardiello, F., & Tortora, G. (2008). EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *New England Journal of Medicine*, 358(11), 1160–1174. <https://doi.org/10.1056/nejmra0707704>
17. De Hoogt, R., Estrada, M. F., Vidic, S., Davies, E. J., Osswald, A., Barbier, M., Santo, V. E., Gjerde, K., Van Zoggel, H. J. A. A., Blom, S., Dong, M., Närhi, K., Boghaert, E., Brito, C., Chong, Y., Sommergruber, W., Van Der Kuip, H., Van Weerden, W. M., Verschuren, E. W., ... Graeser, R. (2017). Data descriptor: Protocols and characterization data for 2d, 3d, and slice-based tumor models from the predect project. *Scientific Data*, 4(1), 1–23. <https://doi.org/10.1038/sdata.2017.170>
18. Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., & Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Annals of Oncology*, 18(3), 581–592. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl498>
19. Fior, R., Póvoa, V., Mendes, R. V., Carvalho, T., Gomes, A., Figueiredo, N., & Ferreira, F. R. (2017). Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(39), E8234–E8243. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618389114>
20. Gaiger De Oliveira, M., Da, I., Lauxen, S., Cecilia, A., Chaves, M., Rados, V., Sant', M., & Filho, A. (2008). *Immunohistochemical analysis of the patterns of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesions*. <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v13i5/medoralv13i5p275.pdf>
21. Gambar, G., Gaible, M., Keilhol, U., Regenbrecht, C. R. A., & Silvestri, A. (2018). From chemotherapy to combined targeted therapeutics: In vitro and in vivo models to decipher intra-tumor heterogeneity. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 9, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00077>
22. Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., & Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology*, 133(4).
23. Gerdes, Johannes, Schwab, U., Lemke, H., & Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer*, 31(1), 13–20. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910310104>
24. Gerlach, M. M., Merz, F., Wichmann, G., Kubick, C., Wittekind, C., Lordick, F., Dietz, A., & Bechmann, I. (2014). Slice cultures from head and neck squamous cell carcinoma: A novel test system for drug susceptibility and mechanisms of resistance. *British Journal of Cancer*, 110(2), 479–488. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.700>
25. Gillet, J. P., Varma, S., & Gottesman, M. M. (2013). The clinical relevance of cancer cell lines. In *Journal of the National Cancer Institute* (Vol. 105, Issue 7, pp. 452–458). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt007>
26. Goodsell, D. S. (2006). The Molecular Perspective: Cisplatin. *The Oncologist*, 11(3), 316–317. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-3-316>
27. Haehnel, S., Reiche, K., Loeffler, D., Horn, A., Blumert, C., Puppel, S. H., Kaiser, N., Rapp, F., Rade, M., Horn, F., Meixensberger, J., Bechmann, I., Gaunitz, F., & Winter, K. (2019). Deep sequencing and automated histochemistry of human tissue slice cultures improve their usability as preclinical model for cancer

- research. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56509-5>
28. Hoffmann, D., Hoffmann, I., & El-Bayoumy, K. (2001). The less harmful cigarette: A controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. In *Chemical Research in Toxicology* (Vol. 14, Issue 7, pp. 767–790). <https://doi.org/10.1021/tx000260u>
 29. Holbeck, S. L., Camalier, R., Crowell, J. A., Govindharajulu, J. P., Hollingshead, M., Anderson, L. W., Polley, E., Rubinstein, L., Srivastava, A., Wilsker, D., Collins, J. M., & Doroshow, J. H. (2017). The National Cancer Institute ALMANAC: A comprehensive screening resource for the detection of anticancer drug pairs with enhanced therapeutic activity. *Cancer Research*, 77(13), 3564–3576. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0489>
 30. Hubbard, S. R. (2005). EGF receptor inhibition: Attacks on multiple fronts. In *Cancer Cell* (Vol. 7, Issue 4, pp. 287–288). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.004>
 31. Inamura, K. (2017). Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology*, 7(AUG), 193. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00193>
 32. Jackman, D. M., Yeap, B. Y., Sequist, L. V., Lindeman, N., Holmes, A. J., Joshi, V. A., Bell, D. W., Huberman, M. S., Halmos, B., Rabin, M. S., Haber, D. A., Lynch, T. J., Meyerson, M., Johnson, B. E., & Jänne, P. A. (2006). Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clinical Cancer Research*, 12(13), 3908–3914. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0462>
 33. Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 7, Issue 8, pp. 573–584). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc2167>
 34. Kelman, Z. (1997). PCNA: Structure, functions and interactions. In *Oncogene* (Vol. 14, Issue 6, pp. 629–640). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200886>
 35. Kodack, D. P., Farago, A. F., Dastur, A., Held, M. A., Dardaei, L., Friboulet, L., von Flotow, F., Damon, L. J., Lee, D., Parks, M., Dicecca, R., Greenberg, M., Kattermann, K. E., Riley, A. K., Fintelmann, F. J., Rizzo, C., Piotrowska, Z., Shaw, A. T., Gainor, J. F., ... Benes, C. H. (2017). Primary Patient-Derived Cancer Cells and Their Potential for Personalized Cancer Patient Care. *Cell Reports*, 21(11), 3298–3309. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.051>
 36. Koerfer, J., Kallendrusch, S., Merz, F., Wittekind, C., Kubick, C., Kassahun, W. T., Schumacher, G., Moebius, C., Gaßler, N., Schopow, N., Geister, D., Wiechmann, V., Weimann, A., Eckmann, C., Aigner, A., Bechmann, I., & Lordick, F. (2016). Organotypic slice cultures of human gastric and esophagogastric junction cancer. *Cancer Medicine*, 5(7), 1444–1453. <https://doi.org/10.1002/cam4.720>
 37. Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Kuwano, H., Takahashi, T., & Mitsudomi, T. (2004). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: Biological and clinical implications. *Cancer Research*, 64(24), 8919–8923. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2818>
 38. Kumar, A., Petri, E. T., Halmos, B., & Boggon, T. J. (2008). Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. In *Journal of Clinical Oncology* (Vol. 26, Issue 10, pp. 1742–1751). American Society of Clinical Oncology. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.1178>
 39. Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in

- human cancers. In *Nature* (Vol. 396, Issue 6712, pp. 643–649). Nature. <https://doi.org/10.1038/25292>
40. Lew, Q. J., Chu, K. L., Chia, Y. L., Cheong, N., & Chao, S. H. (2013). Hexim1, a new player in the p53 pathway. In *Cancers* (Vol. 5, Issue 3, pp. 838–856). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/cancers5030838>
 41. Li, P., Wang, S., Zhan, L., He, X., Chi, G., Lv, S., Xu, Z., Xia, Y., Teng, S., Li, L., & Li, Y. (2017). Efficient feeder cells preparation system for large-scale preparation and application of induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10428-5>
 42. Lim, C. Y., Chang, J. H., Lee, W. S., Lee, K. M., Yoon, Y. C., Kim, J., & Park, I. Y. (2018). Organotypic slice cultures of pancreatic ductal adenocarcinoma preserve the tumor microenvironment and provide a platform for drug response. *Pancreatology*, 18(8), 913–927. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2018.09.009>
 43. Liu, C. Y., & Seen, S. (2003). Gefitinib Therapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. In *Annals of Pharmacotherapy* (Vol. 37, Issue 11, pp. 1644–1653). <https://doi.org/10.1345/aph.1D145>
 44. Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., & Xu, X. (2017). Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. In *Oncology Letters* (Vol. 14, Issue 6, pp. 6999–7010). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7134>
 45. Martin, S. A., Hewish, M., Lord, C. J., & Ashworth, A. (2010). Genomic instability and the selection of treatments for cancer. In *Journal of Pathology* (Vol. 220, Issue 2, pp. 281–289). J Pathol. <https://doi.org/10.1002/path.2631>
 46. McIntyre, A., & Ganti, A. K. (2017). Lung cancer—A global perspective. In *Journal of Surgical Oncology* (Vol. 115, Issue 5, pp. 550–554). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jso.24532>
 47. Michels, A. A., & Bensaude, O. (2018). Hexim1, an RNA-controlled protein hub. In *Transcription* (Vol. 9, Issue 4, pp. 262–271). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21541264.2018.1429836>
 48. Miserocchi, G., Mercatali, L., Liverani, C., De Vita, A., Spadazzi, C., Pieri, F., Bongiovanni, A., Recine, F., Amadori, D., & Ibrahim, T. (2017). Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1328-z>
 49. Moiseyenko, V. M., Procenko, S. A., Levchenko, E. V., Barchuk, A. S., Moiseyenko, F. V., Iyevleva, A. G., Mitiushkina, N. V., Togo, A. V., Semionov, I. I., Ivantsov, A. O., Matsko, D. E., & Imyanitov, E. N. (2010). High efficacy of first-line gefitinib in non-asian patients with EGFR-Mutated Lung adenocarcinoma. *Onkologie*, 33(5), 231–238. <https://doi.org/10.1159/000302729>
 50. Mukhopadhyay, A., Elattar, A., Cerbinskaite, A., Wilkinson, S. J., Drew, Y., Kyle, S., Los, G., Hostomsky, Z., Edmondson, R. J., & Curtin, N. J. (2010). Development of a functional assay for homologous recombination status in primary cultures of epithelial ovarian tumor and correlation with sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Clinical Cancer Research*, 16(8), 2344–2351. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2758>
 51. Nagaraj, A. S., Bao, J., Hemmes, A., Machado, M., Närhi, K., & Verschuren, E. W. (2018). Establishment and analysis of tumor slice explants as a prerequisite for diagnostic testing. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(141), 58569. <https://doi.org/10.3791/58569>
 52. Nagle, P. W., Plukker, J. T. M., Muijs, C. T., van Luijk, P., & Coppes, R. P. (2018). Patient-derived tumor organoids for prediction of cancer treatment

- response. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 53, pp. 258–264). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.06.005>
53. Naipal, K. A. T., Verkaik, N. S., Sánchez, H., van Deurzen, C. H. M., den Bakker, M. A., Hoesjmakers, J. H. J., Kanaar, R., Vreeswijk, M. P. G., Jager, A., & van Gent, D. C. (2016). Tumor slice culture system to assess drug response of primary breast cancer. *BMC Cancer*, *16*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2119-2>
 54. Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., & Salomon, D. S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. In *Gene* (Vol. 366, Issue 1, pp. 2–16). Gene. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.018>
 55. Oh, S. C., Park, K. H., Choi, I. K., Yoon, S. Y., Kim, S. J., Seo, J. H., Choi, C. W., Kim, B. S., Shin, S. W., Kim, J. S., & Kim, Y. H. (2005). Docetaxel (taxotere), cisplatin, UFT, and leucovorin combination chemotherapy in advanced gastric cancer. *British Journal of Cancer*, *92*(5), 827–831. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602446>
 56. Park, K., & Goto, K. (2006). A review of the benefit-risk profile of gefitinib in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer. In *Current Medical Research and Opinion* (Vol. 22, Issue 3, pp. 561–573). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1185/030079906X89847>
 57. Pemovska, T., Kontro, M., Yadav, B., Edgren, H., Eldfors, S., Szwajda, A., Almusa, H., Beshpalov, M. M., Ellonen, P., Elonen, E., Gjertsen, B. T., Karjalainen, R., Kuleskiy, E., Lagström, S., Lehto, A., Lepistö, M., Lundán, T., Majumder, M. M., Marti, J. M. L., ... Wennerberg, K. (2013). Individualized systems medicine strategy to tailor treatments for patients with chemorefractory acute myeloid leukemia. *Cancer Discovery*, *3*(12), 1416–1429. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0350>
 58. Prihantono, P., Hatta, M., Binekada, C., Sampepajung, D., Haryasena, H., Nelwan, B., Islam, A. A., & Usman, A. N. (2017). Ki-67 expression by immunohistochemistry and quantitative real-time polymerase chain reaction as predictor of clinical response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Journal of Oncology*, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/6209849>
 59. Rizvanov, A. A., Chairperson, S., Blatt, N. L., Mingaleeva, R. N., Solovieva, V. V., Khaiboullina, S. F., & Lombardi, V. C. (2013). Application of Cell and Tissue Culture Systems for Anticancer Drug Screening. *World Applied Sciences Journal*, *23*(3), 315–325. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.23.03.13064>
 60. Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., & Haber, D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 7, Issue 3, pp. 169–181). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc2088>
 61. Shaw, R. J., & Cantley, L. C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. In *Nature* (Vol. 441, Issue 7092, pp. 424–430). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature04869>
 62. Shigematsu, H., Takahashi, T., Nomura, M., Majmudar, K., Suzuki, M., Lee, H., Wistuba, I. I., Fong, K. M., Toyooka, S., Shimizu, N., Fujisawa, T., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (2005). Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Research*, *65*(5), 1642–1646. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4235>
 63. Shoemaker, R. H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, *6*(10), 813–823. <https://doi.org/10.1038/nrc1951>
 64. Smrdel, U., & Kovač, V. (2006). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *Radiology and Oncology*, *40*(1).

- <https://doi.org/10.1056/nejmoa050753>
65. Sojka, D. R., Gogler-Piğłowska, A., Klarzyńska, K., Klimczak, M., Zylicz, A., Głowała-Kosińska, M., Krawczyk, Z., & Scieglinska, D. (2020). HSPA2 Chaperone Contributes to the Maintenance of Epithelial Phenotype of Human Bronchial Epithelial Cells but Has Non-Essential Role in Supporting Malignant Features of Non-Small Cell Lung Carcinoma, MCF7, and HeLa Cancer Cells. *Cancers*, *12*(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cancers12102749>
 66. Stamos, J., Sliwkowski, M. X., & Eigenbrot, C. (2002). Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(48), 46265–46272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207135200>
 67. Taylor, S. R., Ewings, S. M., Jaynes, E., Tilley, C., Ellis, S. G., Armstrong, T., Pearce, N., & Cave, J. (2016). The assessment of Ki-67 as a prognostic marker in neuroendocrine tumours: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Pathology*, *69*(7), 612–618. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203340>
 68. Thatcher, N., Chang, A., Parikh, P., Pereira, J. R., Ciuleanu, T., Von Pawel, J., Thongprasert, S., Tan, E. H., Pemberton, K., Archer, V., & Carroll, K. (2005). Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: Results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet*, *366*(9496), 1527–1537. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67625-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67625-8)
 69. Unger, F., Bentz, S., Kruger, J., Rosenbrock, C., Schaller, J., Pursche, K., Sprussel, A., Juhl, H., & David, K. (2015). Precision Cut Cancer Tissue Slices in Anti-Cancer Drug Testing. *Journal of Molecular Pathophysiology*, *4*(3), 108. <https://doi.org/10.5455/jmp.20151023055556>
 70. Vaira, V., Fedele, G., Pyne, S., Fasoli, E., Zadra, G., Bailey, D., Snyder, E., Favarsani, A., Coggi, G., Flavin, R., Bosari, S., & Loda, M. (2010). Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(18), 8352–8356. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907676107>
 71. Vannucci, L. (2015). Stroma as an Active Player in the Development of the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*, *8*(3), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s12307-014-0150-x>
 72. Vlachogiannis, G., Hedayat, S., Vatsiou, A., Jamin, Y., Fernández-Mateos, J., Khan, K., Lampis, A., Eason, K., Huntingford, I., Burke, R., Rata, M., Koh, D. M., Tunariu, N., Collins, D., Hulkki-Wilson, S., Ragulan, C., Spiteri, I., Moorcraft, S. Y., Chau, I., ... Valeri, N. (2018). Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, *359*(6378), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.aao2774>
 73. Weeber, F., Ooft, S. N., Dijkstra, K. K., & Voest, E. E. (2017). Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery. In *Cell Chemical Biology* (Vol. 24, Issue 9, pp. 1092–1100). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.06.012>
 74. Weiss, R. B., & Christian, M. C. (1993). New Cisplatin Analogues in Development: A Review. In *Drugs* (Vol. 46, Issue 3, pp. 360–377). Drugs. <https://doi.org/10.2165/00003495-199346030-00003>
 75. Wieduwilt, M. J., & Moasser, M. M. (2008). The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 65, Issue 10, pp. 1566–1584). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7440-8>
 76. Wynder, E. L., & Muscat, J. E. (1995). The changing epidemiology of smoking

- and lung cancer histology. *Environmental Health Perspectives*, 103(SUPPL. 8), 143–148. <https://doi.org/10.1289/ehp.95103s8143>
77. Xu, F., Greenspan, J. A., & Davidson, R. L. (1990). Replication-dependent mutagenesis by 5-bromodeoxyuridine: Identification of base change and sequence effects on mutability. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 16(5), 477–486. <https://doi.org/10.1007/BF01233197>
78. Yanus, G. A., Belyaeva, A. V., Ivantsov, A. O., Kuligina, E. S., Suspitsin, E. N., Mitiushkina, N. V., Aleksakhina, S. N., Iyevleva, A. G., Zaitseva, O. A., Yatsuk, O. S., Gorodnova, T. V., Strelkova, T. N., Efremova, S. A., Lepenchuk, A. Y., Ochir-Garyaev, A. N., Paneyah, M. B., Matsko, D. E., Togo, A. V., & Imyanитov, E. N. (2013). Pattern of clinically relevant mutations in consecutive series of Russian colorectal cancer patients. *Medical Oncology*, 30(3). <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0686-5>
79. Yun, C. H., Boggon, T. J., Li, Y., Woo, M. S., Greulich, H., Meyerson, M., & Eck, M. J. (2007). Structures of Lung Cancer-Derived EGFR Mutants and Inhibitor Complexes: Mechanism of Activation and Insights into Differential Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell*, 11(3), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.12.017>
80. Имянитов Е.Н. (2010). Общие представления о таргетной терапии. *Практическая Онкология*, 11(3).
81. Кузьмин И.В. (1999). *Онкология легких (монография, главы 1-5)*.
82. Платинский Л.В., Брюзгин В.В., Блюменберг А.Г., Соколова В.Д., & Михайловский А.В. (2002). Применение комбинации препаратов паклитаксела, цисплатина и фторурацила в амбулаторной химиотерапии злокачественных опухолей | Платинский Л.В., Брюзгин В.В., Блюменберг А.Г., Соколова В.Д., Михайловский А.В. | «РМЖ» №24 от 09.12.2002. *Русский Медицинский Журнал*, 24, 1116.
83. Ф.В. Моисеенко, В.И. Тюрин, Н.Е. Левченко, Е.В. Левченко, А.Г. Иевлева, Е.Н. Имянитов, Н. В. М. (2018). Использование молекулярно-генетического теста на транслокацию ROS1 для выявления единичных опухолевых клеток: описание клинического случая. *Вопросы Онкологии*, 64(3), 331–334.