

НОВЫЙ МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ УРОВНЯ VEGF-R1 В ЯДРЕ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКИ — ВОЗМОЖНОСТЬ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ЕЕ МАЛИГНИЗАЦИИ

С.И. Никулицкий, Е.Г. Тырсина, Ю.М. Тимофеев, А.Н. Иншаков, О.О. Рябая
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Цель исследования. В работе изучали VEGF-R1 и его роль в возможности оценки степени малигнизации опухолевой клетки.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали две линии опухолевых клеток человека: A431 и BRO. Контрольной служила линия нормальных постнатальных фибробластов человека. Качество экстрагированных ядер оценивали по критериям их неповрежденности и очищенности от цитоплазмы. Наличие ядерных маркеров PCNA и ламина A/C, по данным проточной цитометрии, указывало на сохранность белков ядра, а отсутствие цитоплазматического β -тубулина — на чистоту ядер от примесей цитоплазмы. После постановки контролей методом РИФ измеряли содержание VEGF-R1 в ядре.

Результаты. Высокое содержание PCNA и ламина A/C в экстрагированных ядрах при практически полном отсутствии β -тубулина доказало, что примененный протокол позволяет получать чистую суспензию из одиночных неповрежденных клеточных ядер. Непосредственное измерение уровня ядерного VEGF-R1 выявило его присутствие в ядрах исключительно опухолевых клеток, причем в более злокачественных клетках BRO содержание рецептора оказалось в 1,75 раза выше, чем в A431.

Выводы. Разработанный способ экстракции клеточных ядер с целью их иммунофлуоресцентного анализа на проточном цитометре оказался пригодным для количественной оценки содержания белков в нативном ядре. Наличие VEGF-R1 в ядрах опухолевых, но не нормальных, клеток подтверждает предположение о вкладе в канцерогенез именно ядерно-ассоциированного рецептора. А выявленная тенденция к увеличению количества VEGF-R1 в ядре по мере возрастания злокачественности клеточной линии может указывать на возможность использования уровня ядерного рецептора в прогностических целях. Кроме того, эти результаты позволяют рассматривать сам VEGF-R1 в качестве потенциальной мишени для таргетной терапии новообразований.

Ключевые слова: онкология, рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 типа, экстракция клеточных ядер, проточная цитометрия, опухолевые линии клеток человека A431 и BRO, нормальные постнатальные фибробласты человека.

THE NEW METHOD OF MEASURING THE LEVEL OF VEGF-R1 IN THE NUCLEUS OF A CANCER CELL IS THE POSSIBILITY TO EVALUATE THE DEGREE OF CELL MALIGNIZATION

S.I. Nikulitskiy, E.G. Tyrsina, Yu.M. Timofeev, A.N. Inshakov, O.O. Ryabaya
Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology»
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Objective of the study. The work studied VEGF-R1 and its role in the possibility of the evaluation of the degree of cancer cell malignization.

Materials and Methods. Two lines of human tumor cells A431 and BRO were used as the objects of study. The line of normal human fibroblasts (PHF) served as a control line. The quality of extracted nuclei was assessed based on the criteria of their intactness and purification from cytoplasm. The presence of nuclear markers PCNA and lamin A/C, based on the data of flow cytometry (FC), was indicative of preservation of nuclear proteins and the absence of the cytoplasmic β — tubulin confirmed that that the nuclei did not contain cytoplasmic impurities. After implementation of controls, the content of VEGF-R1 was measured by flow cytometry (FC).

Results. *The high content of PCNA and lamin A/C in the extracted nuclei with almost complete absence of β — tubulin proved that the protocol might be used to obtain a pure suspension of single intact cell nuclei. The measurement of the nuclear VEGF-R1 content revealed that it was present only in tumor cell nuclei, and that in more malignant BRO cells the receptor content was 1.75 times higher than in A431.*

Conclusions. *The developed method of extraction of cell nuclei for their subsequent flow cytometry analysis was found to be suitable for the quantitative evaluation of protein content in the native nucleus. The presence of VEGF-R1 in the nuclei of tumor cells rather than in normal cells supports the assumption that the nuclear receptor contributes to carcinogenesis. The revealed tendency to increased content of the receptor in the nucleus as the malignancy of cell line increases indicates that the nuclear receptor 's level may be used for prognostic purposes. In addition, these results allow to consider VEGF-R1 itself as a potential target in anticancer therapy.*

Keywords: *oncology, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor type 1 (VEGF-R1), nuclear extraction, flow cytometry (FC), A431 and BRO tumor cell lines, postnatal human fibroblasts PHF.*

List of Abbreviations

VEGF-R1 — Receptor Type 1 for Vascular Endothelial Growth Factor

ICC — Immunocytochemistry

IFRFC — Immunofluorescence Reaction on Flow Cytometer

MFI — Mean Fluorescence Intensity

AB — Antibodies

Введение

Целью многих исследований в различных областях биологии является детекция определенных клеточных белков. Эту задачу с успехом позволяет реализовать реакция иммунофлуоресценции на проточном цитометре (РИФ). Ее достоинствами являются объективность, точность и высокая воспроизводимость результатов. Вместе с тем РИФ позволяет детектировать антигены либо на наружной поверхности клетки, либо внутри нее после предварительной пермеабиллизации. Однако даже регистрация искомого протеина внутри клетки не позволяет судить о его распределении по клеточным компартментам, в частности — о присутствии белка в ядре. Между тем данный вопрос неизбежно встает при разработке чувствительных методов диагностики и таргетного лечения онкозаболеваний. Именно эта проблема и подтолкнула нас к разработке методики изоляции нативных клеточных ядер с целью последующей детекции и количественной оценки содержащихся в них белков на проточном цитометре [1–3].

В своей работе авторы изучали вероятное участие VEGF-R1 в опухолевой прогрессии. Данные ряда исследований [4–9] свидетельствуют о том, что его активация приводит к повышению выживаемости и усилению инвазивного и метастатического потенциала неоплазмы. Традиционное представление о мем-

бранной локализации тирозинкиназных рецепторов предполагает реализацию этих эффектов посредством стимуляции VEGF-R1 на поверхности клетки. Однако последние литературные сообщения [10–12] о функциональной активности некоторых рецепторов-тирозинкиназ (EGFR, FGFR) в клеточном ядре навели авторов на мысль о возможном участии в канцерогенезе именно ядерно-локализованного VEGF-R1. Если это так, то ядерное содержание рецептора должно коррелировать со степенью злокачественности клетки. С целью проверки этого предположения было решено измерить уровень VEGF-R1 в ядрах неопластических клеток человека различной агрессивности — высокозлокачественной меланомы BRO и менее агрессивной карциномы вульвы A431 — и ядрах контрольных нормальных постнатальных фибробластов (ПФЧ).

Материалы и методы

Объекты исследования

Изучаемым белком являлся VEGF-R1. В качестве объектов исследования использовали две линии опухолевых клеток человека: A431 (карцинома наружных женских половых органов) и BRO (высокозлокачественная меланома) [13]. Обе линии получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Контрольной служила линия нормальных

теломеризованных ПФЧ [14]. Клетки выращивали в среде ДМЕМ, содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамин и антибиотик гентамицин (40 мкг/мл), при температуре 37 °С и подаче влажного воздуха с 5% CO₂. Для снятия клеток с подложки применяли 50 mM раствор ЭДТА в PBS. Во всех экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста.

Иммуноцитохимия

Для иммуноцитохимического (ИЦХ) исследования стекла с растущими на них клетками разделяли на две группы. Клетки одной группы сразу фиксировали в 96%-м этаноле (5 мин), а затем ацетоне (3 мин) при –20°С. Живые клетки другой группы до их фиксации обрабатывали 0,05%-м PBST (0,05% Тритон-Х100 в PBS). Инкубацию в детергенте тщательно контролировали под микроскопом до момента четкого проявления цельных ядер с визуально неповрежденной оболочкой на фоне вымывающейся цитоплазмы. Вышеописанная процедура способствовала элиминации цитозольного VEGF-R1 и увеличению доступности ядерных антигенов для антител. После фиксации клетки обеих групп блокировали 5%-м BSA в PBS. В качестве первичных использовали антитела (АТ) #ab2350 (Abcam, Великобритания) к внутриклеточному домену VEGF-R1 (узнающие только мембранно-связанную изоформу рецептора) в концентрации 5 мкг/мл по 40 мкл на пробу, авторичных — FITC-конъюгированные АТ #ab6717 (Abcam, Великобритания) в разведении 1:1000 по 40 мкл. Отрицательным контролем служили клетки, обработанные только вторичными АТ. Анализ препаратов осуществляли на флуоресцентном микроскопе Zeiss Axio Scope A1 (Германия).

РИФ с интактными

и пермеабилizованными клетками

Отмытые в PBS клетки подсчитывали и доводили до концентрации 1×10^6 на пробу. Одну часть клеток оставляли интактными, а другую подвергали пермеабилзации 90%-м холодным метанолом в течение 10 мин. К опытным пробам добавляли по 40 мкл первичных АТ #MAV321 (R&D Systems, США) к внеклеточному домену VEGF-R1 (распознающих как мембранно-связанную, так и растворимую

изоформы рецептора) в концентрации 50 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин. После отмывки в PBS с 5% BSA добавляли вторичные АТ IgG:FITC #STAR70 (AbD Serotec, Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл по 20 мкл на пробу и инкубировали 30 мин при +4°С. Далее клетки дважды отмывали в PBS с 5% BSA и ресуспендировали в 300 мкл 1%-го раствора формалина в PBS. Отрицательным контролем служили пробы, обработанные только вторичными АТ. Интенсивность флуоресценции меченых белков оценивали на проточном цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с возбуждением фотодиодной флуоресценции аргоновым лазером ($\lambda = 488$ нм). Анализируемый гейт устанавливали на основании комбинации светорассеяния и размера клеток с использованием программного обеспечения BD FACSDiva. Количественным критерием содержания искомого белка служил показатель Δ MFI — разность средней интенсивности флуоресценции между опытными и контрольными (обработанными только вторичными АТ) образцами.

Экстракция ядер

Подробно разработанная авторами процедура экстракции ядер описана в работах [1, 2].

В качестве буфера для выделения ядер использовали гипоосмолярный раствор, содержащий HEPES (10 mM, pH 7,9), MgCl₂ (5 mM), EDTA (0,1 mM). К 50 мл исходного буфера добавляли 2,0 мл 10%-го раствора Тритона-Х100, а непосредственно перед применением — дитиотреитол (из расчета 1 мкл на 1 мл буфера), а также антипротеазную смесь (Complete, Mini; Roche, Швейцария) по инструкции производителя.

Прежде чем измерять интересующий нас рецептор в ядре, необходимо было убедиться, что полученная ядерная суспензия состоит из неповрежденных ядер и свободна от остатков цитоплазмы. Успешность процедуры ядерной экстракции контролировали при помощи микроскопическое исследование фиксированных метанолом мазков из свежей ядерной суспензии, окрашенных азур-эозином по Романовскому–Гимза и гематоксилином по Майеру [1]. Во-вторых, методом РИФ ядерный

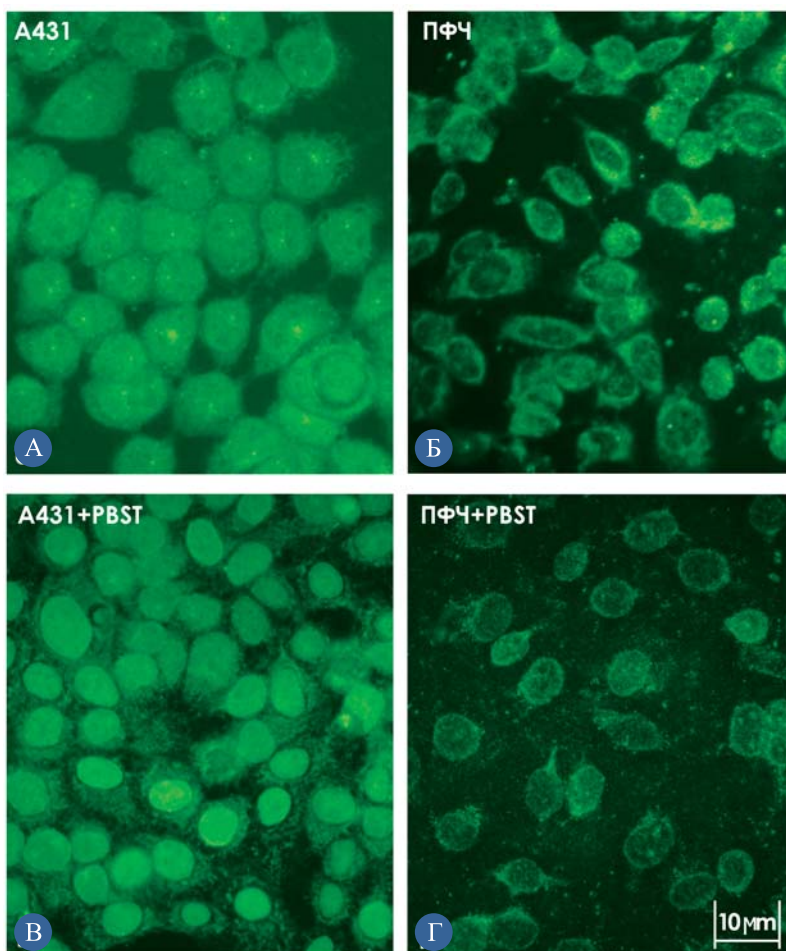


Рис. 1. ИЦХ-окрашивание клеток человека: опухолевых A431 и нормальных ПФЧ: а — высокая внутриклеточная экспрессия VEGF-R1 в клетках A431; б — слабая внутриклеточная экспрессия VEGF-R1 в нормальных клетках ПФЧ; в — наличие VEGF-R1 в ядрах опухолевых клеток A431; г — отсутствие VEGF-R1 в ядрах нормальных фибробластов ПФЧ

экстракт был протестирован на отсутствие в нем специфического маркера цитоплазмы — β -тубулина. И, наконец, сохранность белков в выделенных ядрах (тест на интактность) оценивали по экспрессии в них двух ядерных белков — ламина А/С и PCNA.

Анализ ядер на проточном цитометре

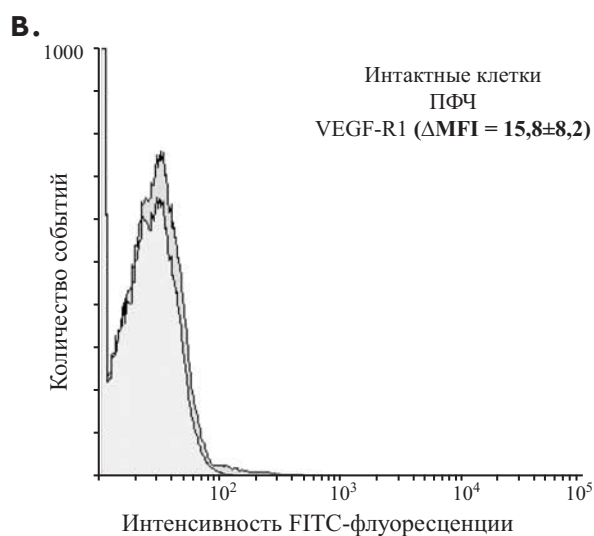
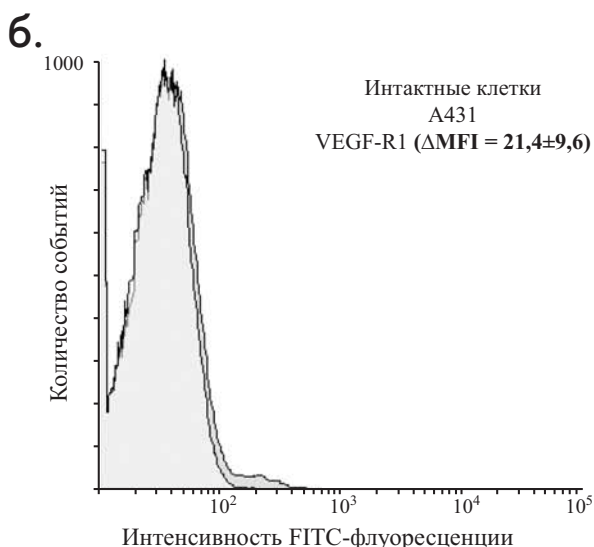
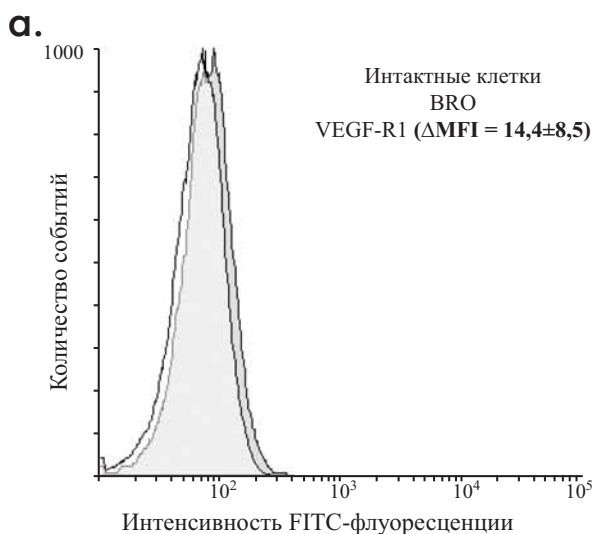
В каждую из пробирок для измерений переносили по 500 мкл ядерной суспензии, что примерно соответствовало количеству ядер 5×10^6 . С целью выявления ядерных маркеров PCNA и ламина А/С применяли первичные АТ к PCNA ab#29 (Abcam, Великобритания) в концентрации 50 мкг/мл по 50 мкл на пробу, а также первичные АТ к ламины А/С sc-7292 (Santa Cruz, США) по 1 мкг на пробу. В качестве вторичных использовали IgG:FITC #STAR70 (AbD Serotec, Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл по 30 мкл.

Для детекции β -тубулина использовали первичные АТ #2146 (Cell Signaling Technology,

США) в разведении 1:100 по 50 мкл на пробу. Вторичными АТ служили IgG:FITC #STAR121F (AbD Serotec, Великобритания), разведенные 1:200, по 30 мкл.

Регистрацию VEGF-R1 в ядрах проводили, используя первичные АТ #MAB321 (R&D Systems, США) в концентрации 50 мкг/мл по 50 мкл на пробу и вторичные — IgG:FITC #STAR70 (AbD Serotec, Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл по 30 мкл. Во всех случаях отрицательным контролем служили пробы, обработанные только вторичными АТ.

Исследование ядер проводили на проточном цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva. Область гейтирования определяли на логарифмическом графике «DotPlot» FSC/SSC. Для выбора гейта ядерную суспензию окрашивали раствором пропидий йодида (Becton Dickinson, США). С этой целью ядра в количестве 5×10^6 инкубировали в 500 мкл раствора



пропидий йодида (концентрация 50 мкг/мл) 30 мин в темноте.

Количественным критерием содержания ядерных белков служила разность средней интенсивности флуоресценции между опытными и контрольными (обработанными только вторичными АТ) образцами — ΔMFI .

Статистическая обработка результатов

Во всех независимых экспериментах (не менее трех) проводили по три измерения в каждой точке. Результаты исследований подвергали статистической обработке по *t*-тесту Стьюдента. Достоверными различиями считали значения при $p < 0,05$.

Результаты

Имуноцитохимия

В клетках 1-й группы (не обработанных PBST) всех трех линий (опухолевые BRO, A431 и нормальные ПФЧ) выявлена преимущественно внутриклеточная локализация VEGF-R1 (рис. 1а), но в нормальных фибробластах рецептор визуализировался слабо (рис. 1б). Поскольку в данном опыте четко разграничить цитозольную и ядерную флуоресценцию VEGF-R1 не представлялось возможным, клетки другой группы были обработаны PBST. В результате, на фоне отсутствия цитоплазматического рецептора, VEGF-R1 в ядрах клеток обеих опухолевых линий стал хорошо различим (рис. 1в). В отличие от них в нормальных фибробластах ядерный рецептор практически не визуализировался (рис. 1г).

РИФ-анализ клеток

РИФ-анализ дал возможность четко разграничить поверхностное и внутриклеточное содержание рецептора. При исследовании **интактных** клеток сигнал детектируется только от VEGF-R1, расположенного на цитоплазматической мембране. В этих экспериментах

Рис. 2. Проточная цитометрия, интактные клетки. Практически полное отсутствие VEGF-R1 на цитоплазматической мембране как опухолевых клеток линий BRO и A431, так и нормальных фибробластов ПФЧ. Опыт — темно-серый цвет, отрицательный контроль — белый цвет; область наложения графиков — светло-серый цвет: а — клетки меланомы BRO ($\Delta MFI = 14,4 \pm 8,5$); б — клетки карциномы вульвы A431 ($\Delta MFI = 21,4 \pm 9,6$); в — нормальные фибробласты ПФЧ ($\Delta MFI = 15,8 \pm 8,2$)

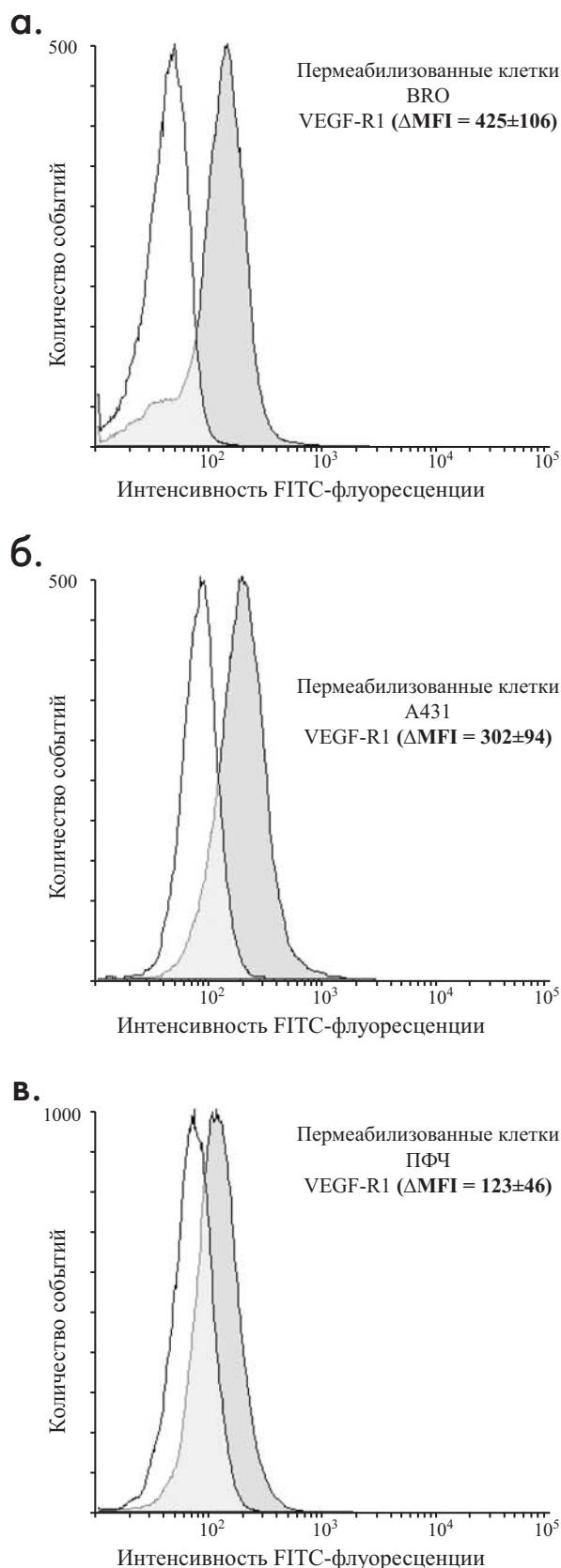
зарегистрировано крайне низкое содержание рецептора на поверхности клеток всех трех линий (ΔMFI приближался к значениям отрицательного контроля: BRO — $14,4 \pm 8,5$; A431 — $21,4 \pm 9,6$; ПФЧ — $15,8 \pm 8,2$) (рис. 2а–в). Однако **после пермеабиллизации** клеточной мембраны уровень сигнала резко возрос, поскольку антителам в этом случае стал доступен и внутриклеточный рецептор (ΔMFI BRO — 425 ± 106 ; A431 — 302 ± 94 ; ПФЧ — 123 ± 46) (рис. 3а–в). Таким образом, если количество VEGF-R1 на поверхности опухолевых клеток не отличалось от такового у нормальных, то внутриклеточное содержание рецептора в злокачественных клетках оказалось почти в 3 раза выше, чем в нормальных фибробластах.

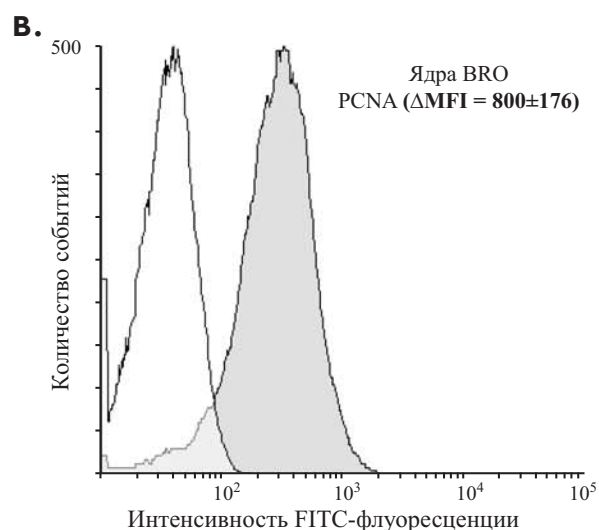
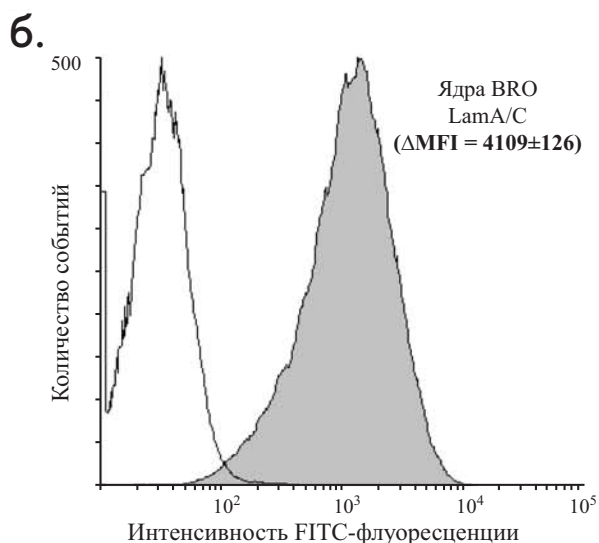
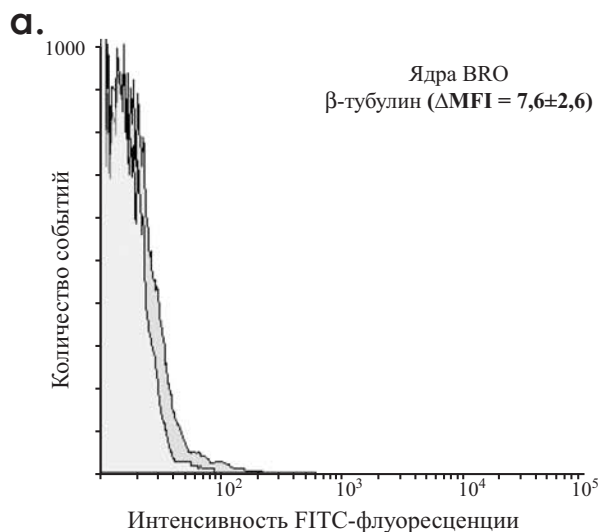
Контроль интактности и чистоты экстрагированных ядер

В мазке из свежей ядерной суспензии практически не наблюдалось поврежденных и слипшихся ядер. Микроскопический анализ фиксированных и окрашенных препаратов подтвердил целостность ядерной оболочки, а также отсутствие остатков цитоплазмы.

По данным РИФ, в выделенных ядрах клеток всех трех линий специфический цитоплазматический белок β -тубулин в гейте, установленном по гистограмме клеточного цикла, практически не детектировался ($\Delta\text{MFI} = 7,6 \pm 2,6$) (рис. 4а). Интересно отметить, что при смещении области измерения в сторону более высоких значений FSC и SSC (где располагаются неочищенные ядра и конгломераты) содержание β -тубулина по критерию ΔMFI резко возросло и составило уже ~ 250 . Данный факт еще раз указал на правильность выбранного нами гейта: в анализируемой области графика действительно располагаются одиночные ядра без примеси цитоплазмы.

Рис. 3. Проточная цитометрия, пермеабиллизованные клетки. Внутриклеточное содержание VEGF-R1 в опухолевых клетках линий BRO и A431 выше, чем в нормальных фибробластах ПФЧ, \sim в 3 раза. Опыт — темно-серый цвет, отрицательный контроль — белый цвет; область наложения графиков — светло-серый цвет: а — клетки меланомы BRO ($\Delta\text{MFI} = 425 \pm 106$); б — клетки карциномы вульвы A431 ($\Delta\text{MFI} = 302 \pm 94$); в — нормальные фибробласты ПФЧ ($\Delta\text{MFI} = 123 \pm 46$)





Высокий уровень специфических ядерных маркеров, ламина A/C и PCNA, составивший по критерию ΔMFI 4109 ± 1226 и 800 ± 176 , соответственно, подтвердил сохранность белков в выделенных ядрах (рис. 4б, в). Кроме того, судя по этим данным, оболочка ядра в ходе экстракции становится проницаемой для антител, т.е. дополнительной пермеабиллизации ядерной мембраны уже не требуется. В итоге регистрируемый показатель отражает суммарное содержание белка снаружи и внутри ядра.

Таким образом, контрольные эксперименты убедили нас в том, что экстрагированные ядра полностью удовлетворяют требованиям к их качеству для дальнейшего РИФ-анализа с целью детекции изучаемого в работе VEGF-R1.

Определение VEGF-R1 в ядрах методом РИФ

Измерение ядерного содержания VEGF-R1 подтвердило вышеописанные данные ИЦХ о присутствии рецептора в ядрах исключительно опухолевых клеток. В то время как в обеих злокачественных линиях регистрировался высокий уровень ядерного VEGF-R1 (ΔMFI для BRO = 300 ± 59 (рис. 5а); для A431 = 171 ± 57 (рис. 5б)), количество рецептора в ядрах нормальных клеток приближалось к значениям отрицательного контроля (ΔMFI для ПФЧ = $12,7 \pm 6,9$) (рис. 5в). Приведенные цифры показывают, что наибольшее содержание ядерного VEGF-R1 соответствовало более злокачественной клеточной линии: ΔMFI для BRO превышал таковой для A431 в 1,75 раза.

Обсуждение

Полученные в работе результаты свидетельствуют, что примененный авторами протокол экстракции, очистки и стабилизации ядер пригоден для идентификации и измерения содержания ядерных белков на проточном цитометре.

Рис. 4. Проточная цитометрия. Экстрагированные ядра — контроль чистоты от примесей цитоплазмы и интактности. Опыт — темно-серый цвет, отрицательный контроль — светло-серый цвет: а — отсутствие специфического маркера цитоплазмы β-тубулина в выделенных ядрах ($\Delta MFI = 7,6 \pm 2,6$); б — чрезвычайно высокая экспрессия ядерного маркера ламина A/C в экстрагированных ядрах ($\Delta MFI = 4109 \pm 1226$); в — высокая экспрессия ядерного маркера PCNA в выделенных ядрах ($\Delta MFI = 800 \pm 176$)

Несомненными достоинствами указанного метода являются:

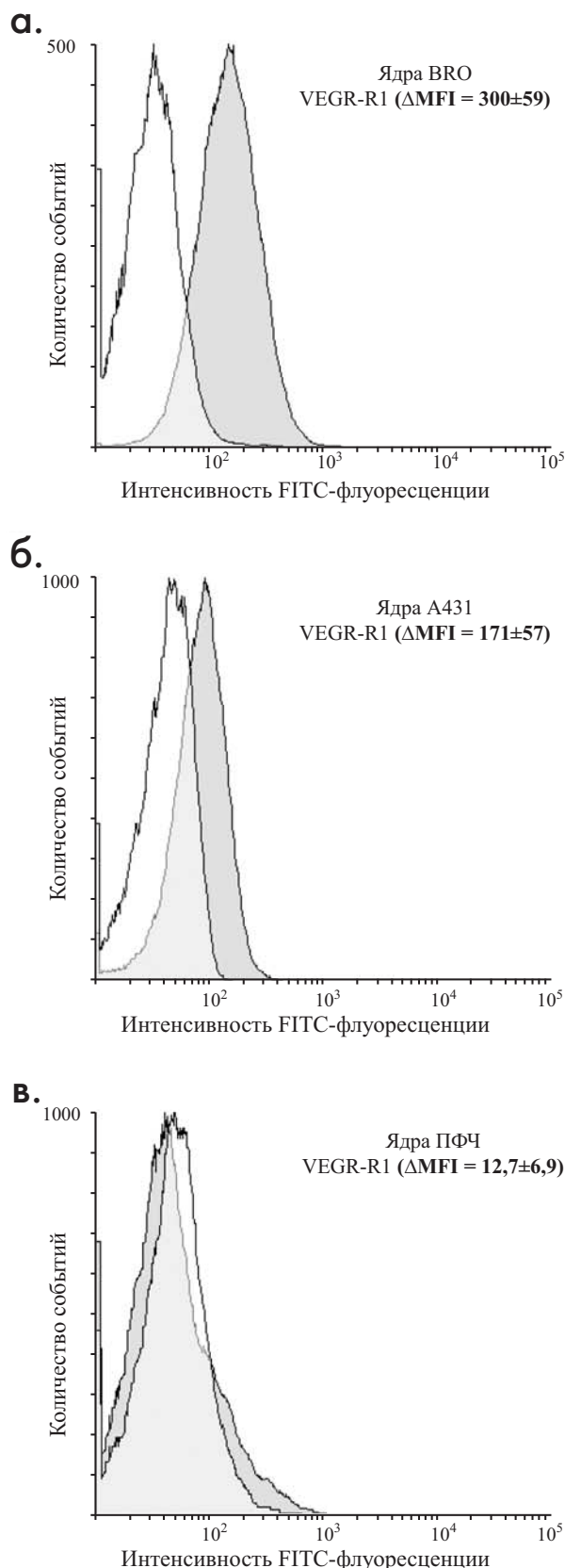
1) возможность в одном эксперименте исследовать большое количество ядер, что повышает достоверность результатов. Важно, что используемое в РИФ гейтирование позволяет анализировать интересующие белки исключительно в области одиночных, хорошо очищенных ядер;

2) возможность сопоставления уровня изучаемого протеина в ядрах клеток различных линий;

3) способность проводить мониторинг ядерного содержания того или иного белка до и после какого-либо воздействия.

Результаты данной работы расходятся с традиционным представлением лишь о поверхностном расположении тирозинкиназных рецепторов. С помощью двух методов — ИЦХ с обработкой PBST и РИФ на ядрах — авторам удалось обнаружить наличие VEGF-R1 в ядрах опухолевых, но не нормальных, клеток, что, скорее всего, свидетельствует о важном вкладе рецептора в развитие неоплазмы. Это утверждение подкрепляется и установленным в работе фактом, что наибольшее содержание ядерного VEGF-R1 соответствовало наиболее злокачественной клеточной линии (ΔMFI для BRO превышал таковой для A431 в 1,75 раза). Наши данные согласуются с выводами Т.-Н. Lee и соавт. [7], которые также обнаружили VEGF-R1 в ядре. В этом исследовании на линиях карциномы молочной железы человека методом ИЦХ с конфокальной микроскопией авторы зафиксировали ко-локализацию рецептора с ядерной ламиной. Ламины, как известно, ответственны за формирование оболочки ядра и организацию хроматина, а их деградация приводит к апоптозу [15]. По мнению авторов работы [7], VEGF-R1 физически стабилизирует

Рис. 5. Проточная цитометрия. Экстрагированные ядра — содержание VEGF-R1. Рецептор обнаружен в ядрах исключительно опухолевых, но не нормальных, клеток. Содержание ядерного VEGF-R1 прямо пропорционально степени злокачественности клеточной линии. Опыт — темно-серый цвет, отрицательный контроль — белый цвет, область наложения графиков — светло-серый цвет: а — ядра клеток меланомы BRO ($\Delta\text{MFI} = 300 \pm 59$); б — ядра клеток карциномы вульвы A431 ($\Delta\text{MFI} = 171 \pm 57$); в — ядра нормальных фибробластов ПФЧ ($\Delta\text{MFI} = 12,7 \pm 6,9$)



ядерную ламину и таким образом обеспечивает защиту опухолевой клетки от апоптотической гибели.

Впрочем, нельзя исключить существование и иных неканонических механизмов действия рецептора. Так, по мнению R. Bhattacharya и соавт. [4], интракринальная активация VEGF-R1 способна запускать антиапоптотические сигнальные пути в результате фосфорилирования определенных белков киназным доменом рецептора. Кроме того, учитывая низкий тирозинкиназный потенциал VEGF-R1, не исключено, что сигнальный каскад может быть инициирован и путем различных белок-белковых взаимодействий. При этом реализация последнего сценария может осуществляться даже за счет фрагментов рецептора, оказывающих влияние на генную экспрессию [11, 12].

Отсутствие рецептора в ядрах нормальных клеток, с одной стороны, а с другой — наибольшее содержание ядерного VEGF-R1

в высококачественной линии BRO указывают на потенциальную возможность использования уровня рецептора в ядре в прогностических целях. Эти же факты наводят на мысль, что сам VEGF-R1 можно рассматривать в качестве мишени для таргетной терапии новообразований. Понятно, что приведенные рассуждения требуют дальнейшей экспериментальной проверки с использованием серии из нескольких опухолевых линий одного гистогенеза, обладающих различной агрессивностью.

Разумеется, наиболее полная информация о локализации и функциях любого белка может быть получена только при сочетании ряда различных методов исследования. Поэтому авторы надеются, что примененный оригинальный подход к детекции протеинов в нативных ядрах при помощи РИФ позволит расширить знания о механизмах действия изучаемых белков и окажется полезным как для фундаментальной науки, так и практической медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никулицкий С.И., Тырсина Е.Г., Иншаков А.Н., Боровкова Н.Б. Новый метод выделения чистой фракции интактных клеточных ядер для иммунофлуоресцентного анализа на проточном цитофлуориметре // Российский биотерапевтический журнал. — 2016. — Т. 15. — № 2. — С. 76–81.
2. Тырсина Е.Г., Никулицкий С.И., Иншаков А.Н., Рябая О.О. Идентификация VEGF-R1 в опухолевых клетках человека // Онкогинекология. — 2016. — № 2. — С. 13–21.
3. Тырсина Е.Г., Никулицкий С.И., Иншаков А.Н., Рябая О.О. VEGF-R1 как потенциальная молекулярная мишень для противоопухолевой терапии // Доклады Академии наук. — 2018. — Т. 478. — № 2. — С. 236–239.
4. Bhattacharya R., Ye X.C., Wang R. et al. Intracrine VEGF Signaling Mediates the Activity of Prosurvival Pathways in Human Colorectal Cancer Cells. *Cancer Res.* 2016; 76(10):3014–3024.
5. Fan F., Wey J.S., McCarty M.F. et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 2005; 24(16):2647–2653.
6. Huang Y., Huang Y., Liu D. et al. Flt-1-positive cells are cancer-stem like cells in colorectal carcinoma. *Oncotarget.* 2017; 8(44): 76375–76384.
7. Lee T.-H., Seng S., Sekine M. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Intracrine Survival in Human Breast Carcinoma Cells through Internally Expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med.* 2007; 4(6): 1001–1016.
8. Van Limbergen E.J., Zabrocki P., Porcu M. et al. FLT1 kinase is a mediator of radioresistance and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Oncol.* 2004; 53(5): 637–645.
9. Wey J.S., Fan F., Gray M.J. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer.* 2005; 104(2): 427–438.
10. Chen M.-K., Hung M.-C. Proteolytic cleavage, trafficking, and functions of nuclear receptor tyrosine kinases. *FEBS J.* 2015; 282(19): 3693–3721.
11. Fujiwara S., Hung M., Yamamoto-Ibusuk C.M. et al. The localization of HER4 intracellular domain and expression of its alternately-spliced isoforms have prognostic significance in ER+ HER2-breast cancer. *Oncotarget.* 2014; 5(11): 3919–3930.
12. Thor A.D., Edgerton S.M., Jones F.E. Subcellular localization of the HER4 intracellular domain, 4ICD, identifies distinct prognostic outcomes for breast cancer patients. *Am. J. Pathol.* 2009; 175(5): 1802–1809.
13. Lockshin A., Giovanella B.C., De Ipolyi P.D. et al. Exceptional lethality for nude mice of cells derived from a primary human melanoma. *Cancer Res.* 1985; 45(1): 345–350.

14. *Yegorov Y.E., Moldaver M.V., Vishnyakova K.S. et al.* Enhanced Control of Proliferation in Telomerized Cells. *Ontogenez*. 2007; 38(2): 105–119.
15. *Broers J.L.V., Ramaekers F.C.S.* The role of the nuclear lamina in cancer and apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 773: P. 27–48.

АВТОРЫ

Никулицкий Сергей Игоревич, кандидат медицинских наук, лаборатория экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: jonesjr11061988@yandex.ru

Nikulitskiy Sergey I., Ph.D. in Medical Sciences, Laboratory of Experimental Diagnostics and Tumor Biotherapy of Scientific Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Biotherapy of Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24, e-mail: jonesjr11061988@yandex.ru

Тырсына Екатерина Григорьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: tyrsina@yandex.ru

Tyrsina Ekaterina G., Ph.D. in Biological Sciences, Leading Research Associate of the Laboratory of Experimental Diagnostics and Tumor Biotherapy of Scientific Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Biotherapy of Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24, e-mail: tyrsina@yandex.ru

Тимофеев Юрий Михайлович, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения онкопроктологии НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: klarafrost@rambler.ru

Timofeev Yuriy M., M.D., Ph.D. in Medical Sciences, Leading Research Associate of the Department of Colorectal Cancer Surgery of Scientific Research Institute of Clinical Oncology of Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24, e-mail: klarafrost@rambler.ru

Иншаков Андрей Николаевич, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: an-inshakov@yandex.ru

Inshakov Andrey N., Ph.D. in Medical Sciences, Research Associate of the Laboratory of Experimental Diagnostics and Tumor Biotherapy of Scientific Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Biotherapy of federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24, e-mail: an-inshakov@yandex.ru

Рябая Оксана Олеговна, научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24, e-mail: oxa2601@yandex.ru

Ryabaya Oksana O., Research Associate of the Laboratory of Biomedical Research of Scientific Research Institute of Experimental Diagnostics and Tumor Biotherapy of Federal State Budgetary Institution «N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 115478, Moscow, Kashirskoye shosse, 24, e-mail: oxa2601@yandex.ru