

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук**

*На правах рукописи*

**Тихонов Алексей Александрович**



**АНАЛИЗ ПРОФИЛЕЙ АНТИГЛИКАНОВЫХ АНТИТЕЛ  
ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ**

03.01.03 – Молекулярная биология

14.01.12 – Онкология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Лаборатории биологических микрочипов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Научные руководители:

**Рубина Алла Юрьевна**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник Лаборатории биологических микрочипов ФГБУН Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

**Кушлинский Николай Евгеньевич**, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий Лабораторией клинической биохимии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

Официальные оппоненты:

**Яшин Денис Владимирович**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник Лаборатории молекулярной иммуногенетики рака ФГБУН Института биологии гена РАН

**Боженко Владимир Константинович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий Отделом молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится «27» мая 2021 г. в 12 часов 30 минут на заседании диссертационного Совета Д 002.235.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32. и на сайте <http://www.eimb.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
Кандидат физико-математических наук



Анашкина А.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и степень разработанности темы исследования

В настоящее время колоректальный рак (КРР) является третьим по распространенности злокачественным заболеванием и находится на четвертом месте среди причин смертности от рака во всем мире (Bray et al., 2018). Бессимптомное клиническое течение рака кишечника на начальных этапах приводит к тому, что заболевание, как правило, выявляют на поздних стадиях, поэтому в настоящее время крайне актуальна проблема ранней диагностики КРР с помощью малоинвазивных методов.

Один из способов выявления злокачественных опухолей - определение серологических циркулирующих молекулярных маркеров. В лабораторной диагностике КРР возможно определять раковоэмбриональный антиген (РЭА) и карбогидратный антиген 19-9 (СА 19-9), однако результаты нескольких масштабных клинических исследований показали, что эти биомаркеры клинически значимы только для контроля проводимой терапии и при выявлении прогрессирования заболевания (местного рецидива или метастазов) (Duffy et al., 2014).

Большое количество онкологических маркеров ассоциировано с опухолевой прогрессией, но большинство из них не обладают достаточно высокой чувствительностью либо специфичностью для использования в диагностике. Одна из причин – повышение уровней маркеров опухолевого роста при наличии в организме воспалительных процессов или доброкачественных новообразований. При подозрении на КРР наиболее надежным остается инструментальный метод обследования – колоноскопия с биопсией. Данный метод используют, основываясь на жалобах и физикальном осмотре больного, либо при наличии семейного анамнеза даже при отсутствии жалоб и симптомов этого заболевания.

В последнее десятилетие пристальный интерес исследователей привлекает изучение антигликановых антител, которые позволяют определять паттерн гликозилирования, являются частью системы врожденного иммунитета и играют важную роль в иммунном надзоре и противораковой защите (Vollmers and Brändlein, 2007), что делает их перспективными биомаркерами (Muthana and Gildersleeve, 2014).

Во время опухолевой трансформации клеток происходит aberrantное гликозилирование, приводящее к экспрессии опухолеассоциированных гликанов, которые способствуют опухолевой инвазии. Например, во время патологического процесса N-гликаны фукозилируются, сиалилируются и образуют высокоупорядоченные разветвленные структуры на поверхности опухолевых клеток, в том числе за счет увеличения экспрессии GlcNAc-трансфераз. Также

показано, что при опухолевой трансформации для О-гликанов часто наблюдаются укорочения углеводных цепей и стремительное возрастание коротких ди- и три-сахаридных повторов, а при нейробластоме и меланоме увеличивается уровень гликосфинголипидов. Все вышеуказанные процессы влекут за собой изменения в уровнях и профилях антител, специфично связывающихся с гликанами. Антигликановые антитела обнаруживаются в циркуляции уже на начальных стадиях развития злокачественной опухоли, а значит, могут рассматриваться в качестве потенциальных маркеров в диагностике КРР.

Следует отметить, что идея о единственном биологическом маркере, так называемой «золотой пуле», теоретически очень привлекательна, но в реальности оказалась практически нереализуемой. Поэтому разумным представляется подход, основанный на определении сразу нескольких маркеров. Задача многопараметрического анализа разнообразных биологических молекул может быть решена с помощью применения мультиплексных методов на основе микрочипов.

В данной работе продемонстрирована возможность применения гидрогелевых микрочипов для определения уровней антител к опухолеассоциированным гликанам. Показано, что мультиплексный анализ на микрочипах позволяет выявить профили и конкретные гликаны, медианы уровней антител к которым различаются у групп больных КРР и здоровых доноров, а также в различных подгруппах пациентов с КРР.

### **Цели и задачи исследования**

Цель работы – разработка метода определения уровней антител к гликанам с помощью биологических микрочипов в образцах сывороток крови больных колоректальным раком, а также поиск закономерностей между профилями определяемых маркеров и клинико-патологическими характеристиками заболевания.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать метод одновременного определения уровней антител класса М (IgM) к 66 гликанам в сыворотке крови с помощью иммунофлуоресцентного анализа на биологических микрочипах и определить уровни антител к гликанам в сыворотках крови больных колоректальным раком и здоровых доноров.
2. Оценить полученные профили IgM к гликанам в сыворотке крови больных и здоровых доноров с целью выявления потенциальных диагностических маркеров.

3. Провести сравнительный анализ профилей антител к гликанам с учетом основных клинико-патологических характеристик заболевания: стадии опухолевого процесса, наличия либо отсутствия регионарных метастазов, локализации опухоли в различных отделах толстой кишки и возраста пациентов.
4. Проанализировать уровни растворимых форм рецептора программируемой клеточной гибели 1 (soluble PD-1 (sPD-1)) и его лиганда (soluble PD-L1 (sPD-L1)) в сыворотке крови больных колоректальным раком и здоровых доноров.
5. Оценить возможность определения иных циркулирующих в крови биомаркеров (экзосом) на биологическом микрочипе.

### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы**

В данной работе впервые разработан метод мультиплексного анализа циркулирующих в сыворотке крови IgM к панели гликанов у больных колоректальным раком (КРР) и практически здоровых доноров с помощью гидрогелевых биологических микрочипов.

Впервые обнаружено, что медианные уровни IgM к десяти гликанам (maltose, LN $\beta$ 6'LN, GN4'LN, Zymosan, GN6'LN, Man $\beta$ 1-4GlcNAc, 6-Su-3'-SiaLec,  $\alpha$ GalLex, 3'-O-su-Lec, Neu5Gc-Tn) в сыворотке крови больных I и II стадиями КРР значимо ниже таковых в группе здоровых доноров.

Впервые показано, что медианные уровни антител к гликанам Lec, Lec3Lec, GlcNAc3'Lec, 3'-O-su-Lec, 3'-SiaLec, Lec-long, core 6, T $\beta$  $\beta$  снижаются с повышением возраста пациентов.

Впервые показано, что медианные уровни IgM к гликанам, производным лактозамина (GalNAc $\alpha$ 4'LN и Lec $\alpha$ 6LN), статистически значимо отличаются между группами пациентов со II стадией и III стадией КРР. Для группы пациентов с I стадией впервые найдены 3 гликана GalNAc $\alpha$ 4'LN, Lec $\alpha$ 6LN и 3-SiaTn, медианные уровни IgM к которым отличаются от соответствующих уровней в группе больных с III стадией КРР.

Впервые выявлено четырнадцать гликанов (Lec $\alpha$ 6LN, GalNAc $\alpha$ 4'LN, 3-SiaTn, core 3, core 4, P1, Ley, Atri, Atri-long, Та $\alpha$ , di-GalNAc $\beta$ , TF-long,  $\beta$ -SiaTn, core 2), медианные уровни IgM к которым снижаются при наличии единичных или множественных метастазов в регионарных лимфатических узлах.

При сравнении групп пациентов с различной локализацией опухолей толстой кишки впервые продемонстрированы статистически значимые отличия в медианных уровнях IgM к 7 гликанам: Lec-long, Lec, 3'-O-su-Lec, T $\beta$  $\beta$ , Lec3Lec, Btri, 3'-SiaLec.

Наименьшие медианные уровни IgM к этим гликанам наблюдаются в случае опухолей правосторонней локализации.

Определены концентрации растворимых форм рецептора программируемой клеточной гибели (soluble PD-1 (sPD-1)) и его лиганда (soluble PD-L1 (sPD-L1)) у пациентов с КРР.

Показана возможность определения специфичных для КРР A33<sup>+</sup>/CD147<sup>+</sup> субпопуляций экзосом на биологических микрочипах.

Полученные данные могут быть полезны для понимания молекулярных механизмов КРР и могут быть использованы в дальнейших исследованиях, направленных на поиск и валидацию новых биомаркеров КРР.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Разработан метод мультиплексного анализа, позволяющий изучать профили циркулирующих IgM к опухолеассоциированным гликанам на гидрогелевых микрочипах.
2. Медианные уровни IgM к 10 гликанам статистически значимо отличаются у пациентов с I и II стадиями колоректального рака от медианных значений уровней антител к тем же гликанам у здоровых доноров.
3. Медианы уровней IgM к гликанам Lec, Lec3Lec, GlcNAc3'Lec, 3'-O-su-Lec, 3'-SiaLec, Lec-long, core 6, T $\beta$  $\beta$  снижаются с повышением возраста больных колоректальным раком.
4. Медианные уровни IgM к 14 гликанам статистически значимо ниже у группы больных колоректальным раком без метастазов в регионарные лимфоузлы по сравнению с группой больных с наличием метастазов.
5. Медианные уровни IgM к ряду гликанов отличаются у больных колоректальным раком в зависимости от стадии заболевания и локализации опухолей, при этом наименьшие уровни IgM к гликанам наблюдаются в случае опухолей правосторонней локализации.
6. Сывороточные концентрации sPD-1 и sPD-L1 не различаются у здоровых доноров и больных колоректальным раком.
7. Продемонстрирована возможность определения на биологическом микрочипе A33<sup>+</sup>/CD147<sup>+</sup> - экзосом.

### **Личный вклад соискателя**

Основные результаты работы получены автором лично или при его непосредственном участии.

## **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

Работа выполнена в соответствии с общепринятыми этическими и научными принципами. Выводы и положения, выносимые на защиту, обоснованы фактическим материалом, полученным в результате проведения экспериментов, анализа и интерпретации данных.

Основные положения диссертационной работы опубликованы в виде тезисов и представлены в виде устных докладов или стендовых сообщений на 15 российских и международных конференциях и научных школах.

## **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и получено 2 патента РФ на изобретения.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 113 страницах, содержит 19 рисунков и 14 таблиц. Список литературы содержит 155 источников.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Методология и методы исследования**

Образцы сывороток крови исследовали у 149 больных КРР (77 женщин, 72 мужчин) в возрасте 30-88 лет (средний возраст - 64 года) на разных стадиях опухолевого процесса. Обследование и лечение проводилось в клиниках МНИОИ им. П.А. Герцена - филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России и ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Всем пациентам онкологическое заболевание было диагностировано впервые, и образцы крови забирали до начала лечения. Гистологически у всех больных была подтверждена аденокарцинома.

В контрольную группу вошли 103 практически здоровых донора (ЗД) соответствующего возраста и пола. Образцы сывороток крови здоровых доноров были предоставлены Центром крови ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Образцы венозной крови у пациентов с впервые выявленным КРР собирали до лечения в пробирки с активатором свертывания и гелем (Vacuette, Австрия), через 30 мин центрифугировали (10 мин, 2000 g). Полученные образцы сывороток хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проводимого исследования в течение 1-2 нед.

Анализ с использованием микрочипов. Определение уровней антител к гликанам проводили с помощью флуоресцентного анализа на микрочипах. Изготовление микрочипов осуществляли согласно технологии, разработанной в ИМБ РАН. Микрочипы представляли собой матрицу гелевых элементов, каждый гелевый элемент содержал один из 66 иммобилизованных гликанов. Для улучшения воспроизводимости анализа каждый молекулярный зонд был иммобилизован в трех одинаковых гелевых элементах. В качестве метода был использован сэндвич-вариант иммунофлуоресцентного анализа. Регистрацию сигналов флуоресценции (RFU – relative fluorescence units) проводили с помощью сканера GenePix 4200A и флуоресцентного анализатора микрочипов, разработанного в ИМБ РАН.

Определение концентраций растворимых форм PD-1 и PD-L1. Эксперименты были проведены с использованием наборов для иммуноферментного анализа PD-1 Human ELISA Kit и PD-L1 Human ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкциям производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе BEP 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия).

Статистический анализ данных. ROC-анализ, тесты Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса, коэффициенты корреляции Спирмена и Кэнделла, вычисление медиан, расчет 95% доверительных интервалов (CI) проводили с помощью программы MedCalc, ver. 14.8.1 (Бельгия). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . В случае множественных сравнений использовали поправку Бонферрони.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **Разработка метода одновременного определения уровней IgM к гликанам**

Нами были проведены эксперименты по подбору гелеобразующего состава для анализа взаимодействий гликан-антитело на биологических микрочипах. Необходимо было выбрать состав геля, обладающий достаточной пористостью для проникновения антител класса М в гель.

Для подбора оптимального состава геля были проведены исследования на трисахаридах групп крови А и В, которые являются иммунодоминантными структурами эритроцитарных антигенов А и В систем группы крови АВ0 (ABH). Были изготовлены микрочипы с гелями различного состава (Т2С2, Т3С3, Т4С3, Т4С4, Т4С5, Т5С3, Т5С4, Т5С5, Т6С6). Состав геля определяется общей (Т) концентрацией метакриламида и N,N–метиленабисакриламида (w/v), и (С) процентом сшивающего агента – N,N–метиленабисакриламида к метакриламиду (w/w).



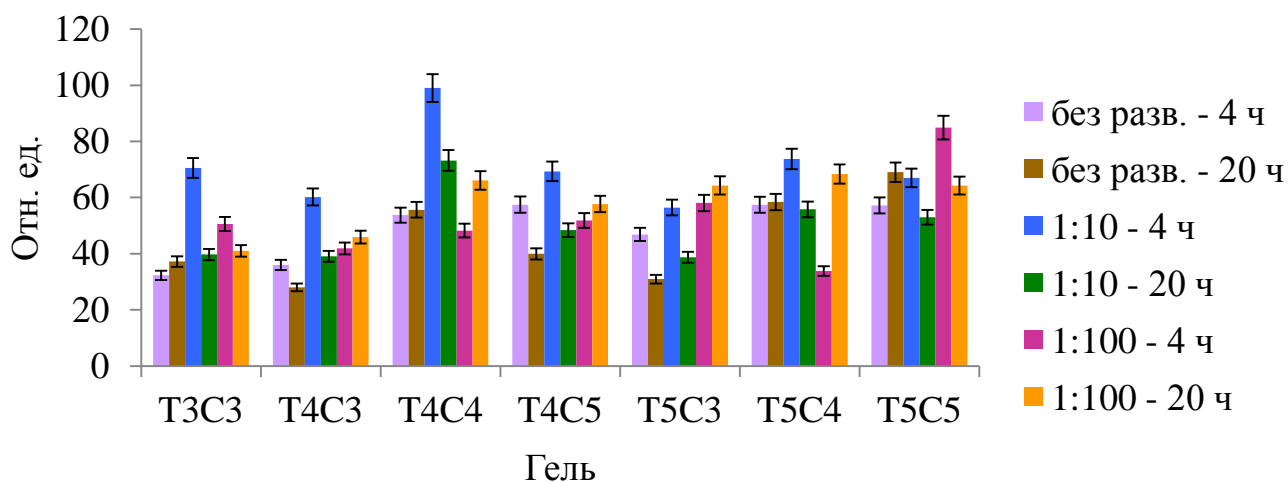
Для процесса сополимеризационной иммобилизации подходят гели, начиная с состава Т3С3 до состава Т5С5. Гели с низкой сшивкой (С) смываются с поверхности стеклянного слайда ( $T < 3$ ,  $C < 3$ ). Высокая концентрация мономеров ( $T > 5$ ,  $C > 5$ ) приводит к получению гелей со слишком низкой пористостью.

Были проанализированы различные концентрации спейсерированных трисахаридов Atri-( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> и Btri-( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> для иммобилизации, и 0.01 М была выбрана как оптимальная. Меньшие концентрации приводили к снижению сигналов флуоресценции в экспериментах, а большие – к изменению формы ячеек и снижению воспроизводимости анализа.

В качестве анализата нами были использованы цоликлоны. Цоликлоны представляют собой раствор мышинных моноклональных антител класса М к антигенам, расположенным на поверхности эритроцитов человека, то есть трисахаридам А и В (цоликлоны анти-А, анти-В соответственно). Для подбора оптимальных условий анализа биологические микрочипы инкубировали с раствором цоликлонов анти-А в различных разведениях (в 10, 50 и 100 раз 0,01 М натрий-фосфатным буфером, pH=7,2). Наибольшие значения флуоресценции, полученные от ячеек с иммобилизованным трисахаридом А, наблюдались для геля состава Т4С4. Значения флуоресценции ячеек с иммобилизованным трисахаридом В не превышали фоновый сигнал.

Подбор оптимального разведения анализируемого образца и времени инкубации осуществляли при тестировании различных разведений сыворотки здорового донора третьей группы крови (В (III)) на микрочипах с иммобилизованными сахарами с использованием вторичных антител против IgM человека. Сыворотку разводили смесью 0,15%-ных растворов поливинилпирролидона и поливинилового спирта в 0,01 М натрий-фосфатном буфере, pH=7,2. Результаты анализа представлены на рисунке 1. При анализе сыворотки без разведения наблюдались повышенные неспецифические сигналы (сигналы от ячеек, не содержащих гликанов), которые возрастали при увеличении времени инкубации. Снижение времени инкубации с образцом с 20 часов до 4 часов позволило повысить дискриминацию (отношение специфического сигнала к неспецифическому). Также к повышению дискриминации приводило разведение сыворотки в 10 раз, которое оказалось оптимальным.

Были проведены эксперименты, направленные на подбор оптимальных условий инкубации образца с вторичными антителами, и показано, что оптимальный по соотношению сигнал/фон результат был получен при инкубации с проявляющими антителами в концентрации 5 мкг/мл в течение 1 часа.



**Рисунок 1.** Анализ сыворотки с антителами к трисахариду А на микрочипах при различных разведениях образца и времени инкубации с ним. Показана дискриминация, отношение значимого сигнала к неспецифическому сигналу.

Были выбраны следующие параметры иммобилизации и условия проведения анализа: гель Т4С4, концентрация гликанов 0,01 М; образцы разводили в 10 раз, инкубировали 4 часа на микрочипе и далее 1 час со вторичными анти-IgM-Су5 в концентрации 5 мкг/мл.

Нами также была определена воспроизводимость результатов анализа. Оценку воспроизводимости проводили по результатам анализа образца сыворотки крови в 10 повторах. Коэффициент вариации не превышал 15%.

### Выбор опухолеассоциированных гликанов

Определение антител, участвующих в связывании с опухолеассоциированными гликанами, может быть полезно для анализа состояния гуморального звена иммунитета. При проведении нашей работы мы сконцентрировались на изучении иммуноглобулинов класса М. Данные антитела обладают высокой авидностью, и даже при низкой аффинности отдельных антиген-связывающих центров (молекула IgM имеет десять таких центров) образуют комплексы, позволяя детектировать различные «естественные» антигены, такие как гликаны, рассмотренные в работе. При этом можно отметить, что «естественные» антитела (т.е. присутствующие в организме без предшествующего контакта с антигеном) к гликанам представлены в организме преимущественно М изотипом.

Нами был изучен пул «естественных» антител класса М к гликанам, ассоциированным с опухолевой трансформацией (табл. 1). Изучение антител к гликанам, принимающих участие в защите организма от злокачественных опухолей,

может пролить свет на механизмы иммунной защиты, на понимание миграции раковых клеток и их способность «ускользнуть» от иммунной системы.

Выбранные нами гликаны относятся к различным системам групп крови, часть представляет собой детерминанты онкофетальных антигенов. Также был включен ряд сиалилированных (Sia-) или сульфированных (Su-) гликанов, так как известно (Pochechueva et al., 2016), что уровень антител к гликанам с данными функциональными группами может быть патологически изменен при различных заболеваниях.

Большинство гликанов было синтезировано химически в спейсерированной форме – с аминопропильным линкером во всех случаях, кроме гликанов с суффиксом – long. В последнем случае спейсером выступал линкер  $(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ .

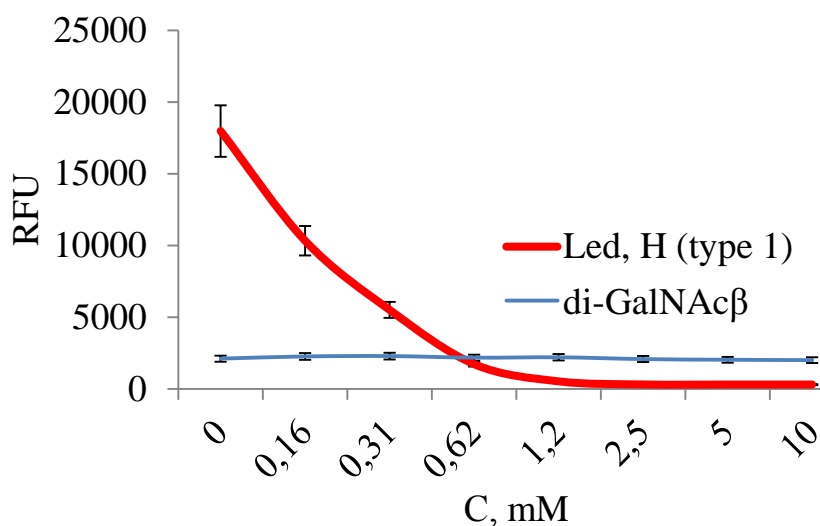
**Таблица 1.** Список гликанов, иммобилизованных на биологическом микрочипе.

1	Tn	23	$\beta$ -SiaTn	45	Zymosan A
2	$\beta$ -GalNAc cluster	24	3-SiaTn	46	Zymosan
3	Lec	25	3'-SiaLec	47	Atri
4	Lec-long	26	3'-O-su-Lea	48	Btri
5	TF	27	core 2	49	Lea
6	TF-long	28	Atri-long	50	SiaLex
7	T $\alpha\alpha$	29	3'-sialyl-TF	51	Leb
8	T $\beta\beta$	30	core 4	52	Lex
9	SiaTn	31	6Su-6'-SiaLec	53	P1
10	3'-O-su-Lec	32	GlcNAc3'Lec	54	Led, H (type 1)
11	3'-O-su-TF	33	6-Su-3'NeuGcLec	55	6-O-Su-LacNAc
12	di-GalNAc $\beta$	34	GalNAc $\alpha$ 4'LN	56	Chitobiose, ACCA
13	core 3	35	6-Su-3'-SiaLec	57	$\alpha$ -Rhamnose
14	core 6	36	6-SiaTF	58	Aminoglucitol
15	6'-O-su-TF	37	6-Sia $\beta$ TF	59	6-Su-3'SLN
16	6-O-su-Lec	38	3,6-SiaTn	60	$\beta$ 6'SLN
17	6'-O-su-Lec	39	3-LacNAc-Tn	61	6-Su-3'SiaTF
18	6,6'-O-su-Lec	40	Ley	62	LN $\beta$ 6'LN
19	Man $\beta$ 1-4GlcNAc	41	SiaLea	63	$\alpha$ GalLex
20	Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\beta$	42	Sia6H (type 2)	64	GN4'LN
21	Man $\alpha$ 1-4Man $\beta$	43	Lec3Lec	65	GN6'LN
22	Neu5Gc-Tn	44	Lec $\alpha$ 6LN	66	maltose

## Оценка специфичности взаимодействия иммобилизованных гликанов с антителами в сыворотке крови

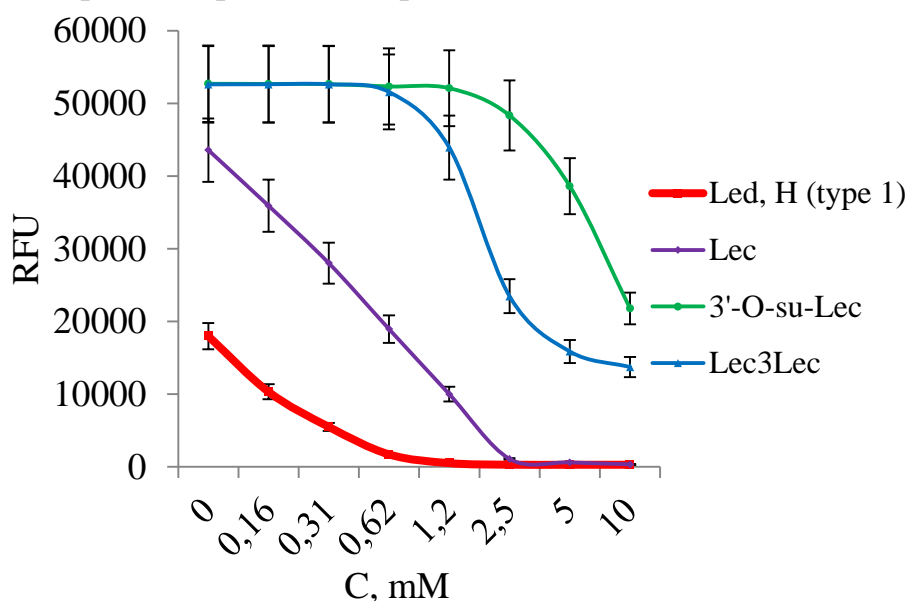
Для оценки специфичности взаимодействия гликан-антитело нами был проведен конкурентный анализ связывания антигликановых антител с иммобилизованными гликанами и гликанами, добавляемыми в сыворотку крови, на примере гликана Led, или H антигена типа 1 систем групп крови АВН (рис. 2). Ход эксперимента был следующим: на микрочипы наносили сыворотки крови с различным уровнем антител к гликану Led и растворы, содержащие различные концентрации этого же гликана. Чем выше концентрация добавленного гликана в образце, тем сильнее конкуренция за связывание со специфичными антителами к данному гликану между иммобилизованным и добавленным гликанами. Далее после завершения инкубации микрочипы обрабатывали вторичными (анти-IgM) проявляющими антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем Cy5.

Была найдена зависимость снижения флуоресцентного сигнала от ячеек с иммобилизованным гликаном Led при добавлении его же в сыворотку крови с исходно определенными уровнями антител к этому гликану (рис. 2). Уже при концентрации добавленного гликана более 1 mM наблюдалось отсутствие специфических сигналов флуоресценции от ячеек микрочипа с иммобилизованным Led, что говорит об образовании бинарного комплекса, полном связывании специфических IgM с добавленным в образец гликаном Led и невозможности образования сэндвич-комплекса с иммобилизованным на микрочипе гликаном. При этом флуоресцентный сигнал от ячеек с иммобилизованным гликаном di-GalNAc $\beta$  не изменялся при добавлении различных концентраций Led. Эти данные подтверждают наличие конкуренции за связывание с конкретными антителами, и специфичность такого связывания.



**Рисунок 2.** Кривые зависимости флуоресцентного сигнала от ячеек с иммобилизованными Led (H (тип 1)) и di-GalNAc $\beta$  от концентрации добавленного Led в сыворотке крови в конкурентном анализе на микрочипах.

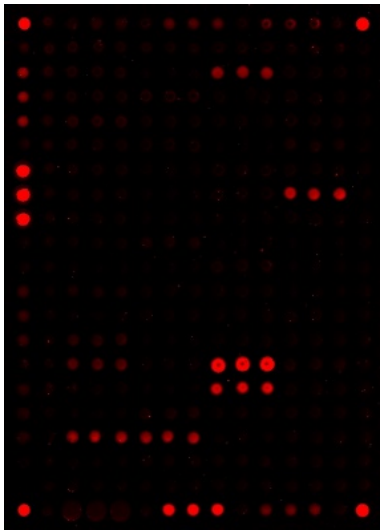
Так как трисахарид Led – это фукозилированное производное Lec ( $\text{Fuc}\alpha 2'\text{Lec}$ ), то мы наблюдали также изменение уровней флуоресцентных сигналов к иммобилизованным гликанам Lec и его производным, имеющим общие эпитопы для связывания со специфическими антителами 3'-O-su-Lec, 6'-O-su-Lec, 3'-SiaLec, GlcNAc3'Lec, и Lec3Lec, при добавлении в сыворотку различных количеств Led. Для всех вышеперечисленных иммобилизованных гликанов наблюдали различную зависимость изменения сигналов флуоресценции, связанную с особенностями структуры, доступностью эпитопов и аффинностью антител (пример анализа одного из образцов приведен на рис. 3).



**Рисунок 3.** Кривые зависимости флуоресцентного сигнала от ячеек с иммобилизованными гликанами, производными Lec, от концентрации добавленного Led в сыворотке крови.

### Уровни IgM к гликанам в группах здоровых доноров и больных колоректальным раком

Нами были проанализированы уровни IgM к гликанам в сыворотках крови 149 больных КРР и 103 здоровых доноров с использованием разработанного метода сэндвич-иммуноанализа на гликановом микрочипе с использованием в качестве проявляющих антител анти-видовых антител против IgM человека, конъюгированных с красителем Cy5. Пример изображения микрочипа после анализа представлен на рис. 4.

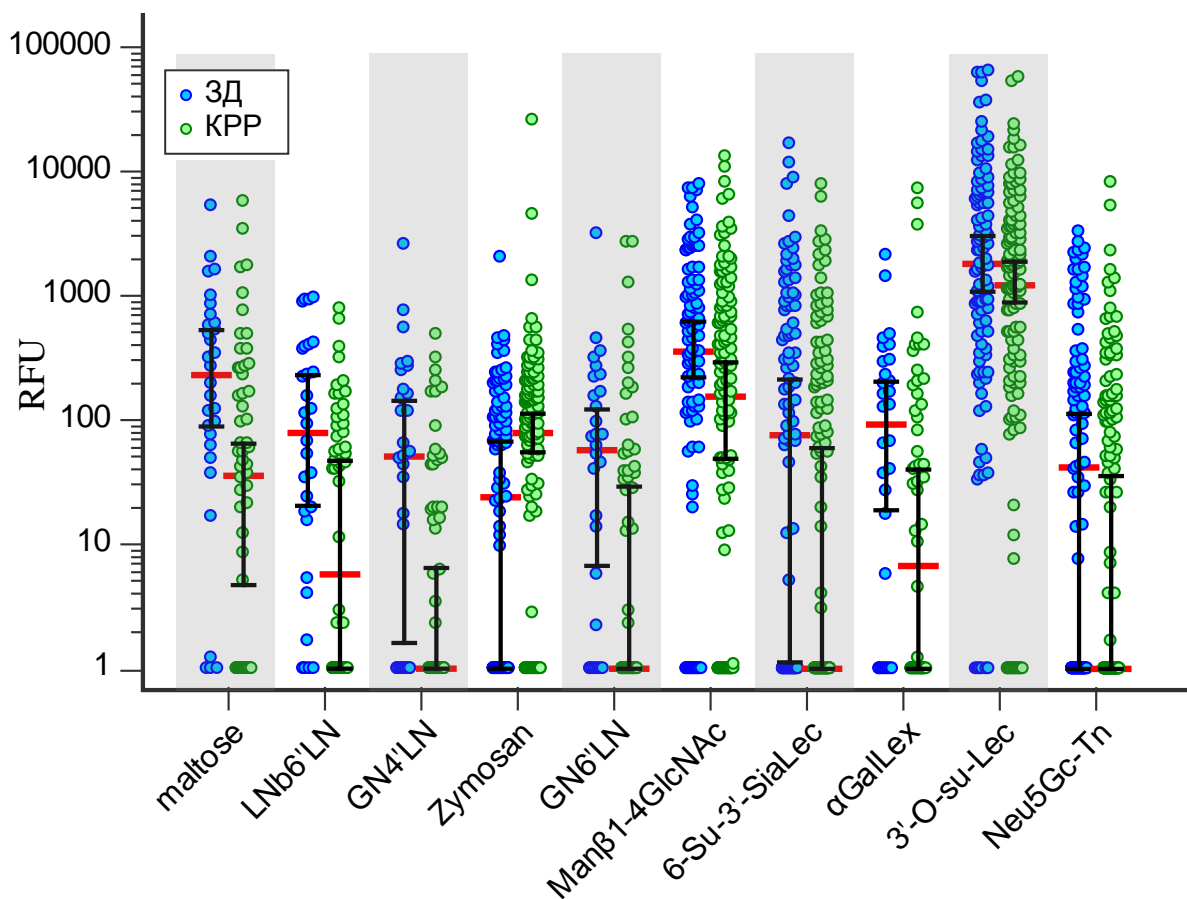


**Рисунок 4.** Изображение микрочипа после анализа при использовании «красного» (655-695 нм) эмиссионного фильтра. Одинаковые гликаны иммобилизованы в трех повторах.

Найдены 10 гликанов, медианные уровни IgM к которым статистически значимо отличаются у больных с начальными (I и II) стадиями КРР по сравнению с группой здоровых доноров (рис. 5): maltose, LN $\beta$ 6'LN, GN4'LN, Zymosan, GN6'LN, Man $\beta$ 1-4GlcNAc, 6-Su-3'-SiaLec,  $\alpha$ GalLex, 3'-O-su-Lec, Neu5Gc-Tn.

Обращает на себя внимание тот факт, что ряд гликанов, медианные уровни антител к которым статистически значимо отличаются у больных и здоровых доноров, относятся к производным Lec (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ ) и содержат терминальную галактозу. Этот остаток может быть коровым, т.е. находиться в области присоединения гликана к гликокаликсу и полипептидной цепи в опухолевой клетке. При этом подобные O-гликановые структуры могут обнажаться в процессе онкологической трансформации (Suzuki et al., 2012). Часть гликанов, медианные уровни антител к которым отличаются у групп больных и здоровых доноров, относятся к производным лактозамина (LN), с общим структурным мотивом Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ . Гликаны с подобным фрагментом являются лигандами семейства белков галектинов.

В нашем исследовании медианные уровни IgM к большинству гликанов в группе здоровых доноров были выше по сравнению с группой больных, что не противоречит литературным данным и может говорить в пользу гипотезы об участии этих антител в элиминации опухолевых клеток с измененным паттерном гликановых антигенов, репертуар и представленность которых могут изменяться при онкопатологии (Monzavi-Karbassi et al., 2013). Ранее аналогичное наблюдение было сделано для антител к гликану Lec в случае пациентов с раком молочной железы. Уровни антител к этому гликану были достоверно ниже у больных по сравнению со здоровыми донорами (Maerle et al., 2017).



**Рисунок 5.** Уровни антител к гликанам, медианные значения которых различаются ( $p$ -value < 0,05) у пациентов с I и II стадиями колоректального рака (КРР,  $n=130$ ) и у здоровых доноров (ЗД,  $n=103$ ). Точками обозначены уровни IgM к гликану у каждого пациента либо ЗД, горизонтальными красными отрезками - медианные значения уровней IgM, а черными линиями обозначены 95% доверительные интервалы (CI).

Для оценки диагностической эффективности метода были построены ROC-кривые (результаты анализа приведены в табл. 2), из которых следует, что в качестве потенциальным биомаркеров КРР могут выступать IgM: к мальтозе; производным лактозамина ( $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta$ ); глюкану Zymosan с повторяющейся  $\beta$ -1,3-гликозидной связью;  $\text{Man}\beta 1\text{-4GlcNAc}$ ; сульфированным производным дисахарида Lec или его сиаилированной форме;  $\alpha\text{GalLex}$ ; Neu5Gc-Tn.

Изменения в уровнях антител к Neu5Gc-Tn могут быть связаны с тем, что в норме у человека нет фермента, необходимого для биосинтеза N-гликолилнейраминовой кислоты (Neu5Gc), поэтому считается, что основной источник этой кислоты – это животная пища. Против N-гликолилнейраминовой кислоты и ее производных в организме синтезируются антитела, которые мы можем детектировать, при этом хроническое воспаление стимулирует развитие онкопроцесса (Samraj et al., 2014).

Наиболее чувствительными (>75%) маркерами I и II стадий КРР являлись IgM к 6-Su-3'-SiaLec, 3'-O-su-Lec и GN4'LN, для которых доля ложноотрицательных результатов была наименьшей. Такие маркеры могут быть эффективны для постановки или уточнения диагноза «рак ободочной кишки и ректосигмоидного соединения» либо «рак прямой кишки». В то же время, наиболее специфичными (>75%) маркерами являлись антитела к LNβ6'LN, Zymosan, мальтозе и Manβ1-4GlcNAc; определение уровней антител к этим гликанам может помочь при подтверждении диагноза для снижения доли ложноположительных результатов теста в силу высокой специфичности данных антител.

**Таблица 2.** Результаты ROC-анализа: AUC (площадь под ROC-кривой), чувствительность (Se) и специфичность (Sp) разделения групп больных с I и II стадиями колоректального рака и здоровых доноров с помощью IgM антител к гликанам.

Гликан	AUC	p-value	Se, %	Sp, %
maltose	0,71	0,0002	62	77
LNβ6'LN	0,69	0,0011	50	83
GN4'LN	0,67	0,0064	75	60
Zymosan	0,59	0,010	39	79
GN6'LN	0,65	0,014	72	60
Manβ1-4GlcNAc	0,59	0,015	43	76
6-Su-3'-SiaLec	0,58	0,021	83	34
αGalLex	0,63	0,036	70	57
3'-O-su-Lec	0,58	0,041	82	34
Neu5Gc-Tn	0,57	0,045	72	43

### **Изменение уровней антител к гликанам с учетом возраста и пола больных колоректальным раком**

Нами были проанализированы уровни антигликановых антител в различных подгруппах больных КРР. Так, среди 130 больных (64 мужчины и 66 женщин) начальными стадиями КРР нами было обнаружено 2 гликана, медианные уровни IgM к которым статистически значимо различались в зависимости от пола. Это производные гликанов системы группы крови Lewis – тетрасахариды Lewis b (p-value=0,014) и sialylated Lewis x (p-value=0,008).



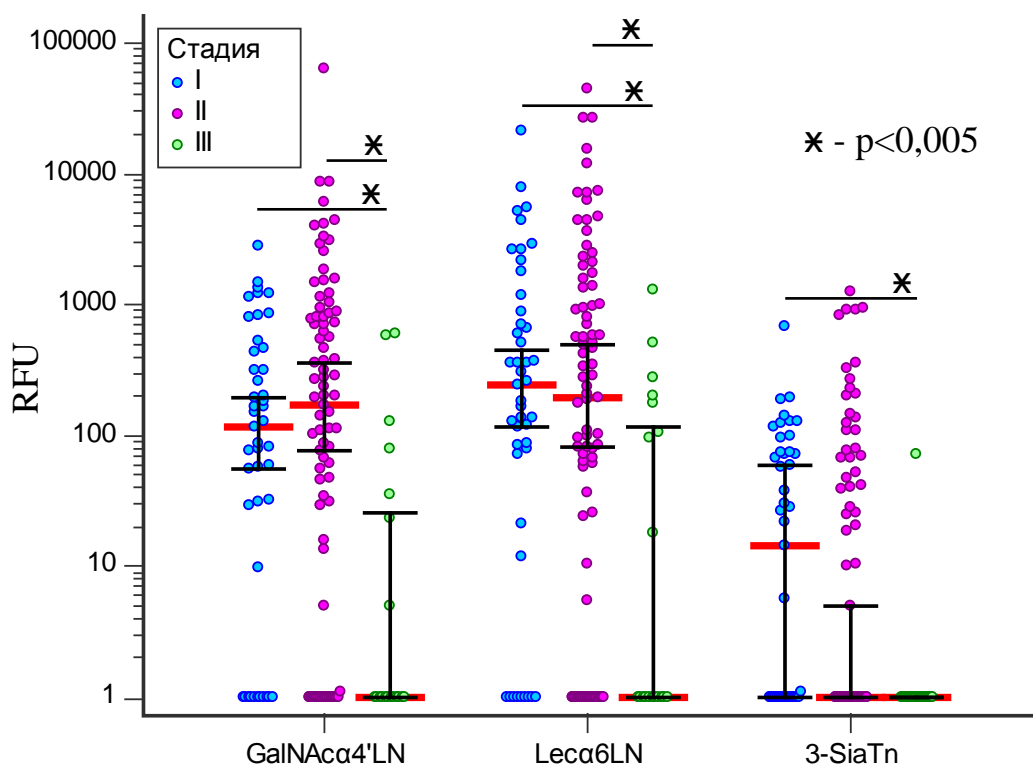
Мы разделили пациентов с I и II стадиями КРР на 4 группы: моложе 50 лет (n=13), 50-59 лет (n=36), 60-70 лет (n=58) и старше 70 лет (n=42). В этих подгруппах с помощью теста Краскела-Уоллиса и с учетом поправки на множественное сравнение ( $p < 0,0084$ ) обнаружили гликаны (Lec, Lec3Lec, GlcNAc3'Lec, 3'-O-su-Lec, 3'-SiaLec, Lec-long, core 6, T $\beta$ ), медианные уровни IgM к которым различались в этих группах. Для IgM к этим гликанам наблюдалась тенденция к снижению медианного уровня при повышении возраста во всех возрастных группах. При этом медианные уровни антител к перечисленным гликанам статистически значимо отличались в группах моложе 50 лет и старше 60 лет. Большинство из этих гликанов представляют собой производные дисахарида Lec (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ ). Подобное снижение уровней антител к гликанам с повышением возраста больных КРР может быть связано с изменением активности иммунной системы и возможным истощением пула В-1 лимфоцитов, продуцирующих антитела к гликанам.

### **Изменения уровней антител к гликанам в зависимости от стадии колоректального рака**

Нами был проведен анализ уровней антител класса М у больных КРР в группах с различной стадией заболевания. У 130 пациентов была начальная стадия КРР – I либо II, у 19 пациентов – III стадия. В исследование не были включены пациенты с отдаленными метастазами (IV стадия).

Группа больных со II стадией заболевания, T3-T4N0M0 – самая многочисленная в нашем исследовании, 85 образцов сывороток пациентов было проанализировано и показано, что медианы уровней IgM к производным лактозамина - GalNAc $\alpha$ 4'LN и Lec $\alpha$ 6LN отличались у групп пациентов со II и III стадией рака. Для 45 пациентов с I стадией были найдены гликаны GalNAc $\alpha$ 4'LN, Lec $\alpha$ 6LN и 3-SiaTn, медианные уровни IgM к которым отличались от соответствующих уровней в группе больных с III стадией КРР (рис. 6). Гликаны, антитела к которым различали бы первую и вторую стадии рака, не были нами обнаружены.

При этом для большинства изучаемых антител характерной, обнаруженной нами особенностью было повышение медианного уровня на начальных стадиях заболевания и значительное его снижение (более чем в 10 раз) при III стадии КРР. Это может быть связано с истощением пула антител при распространении опухоли в регионарные лимфоузлы.



**Рисунок 6.** Уровни антител к гликанам *GalNAcα4'LN*, *Leca6LN* и *3-SiaTn* у больных колоректальным раком I, II и III стадии. Точками обозначены уровни IgM к гликану у каждого пациента, горизонтальными красными отрезками - медианные значения уровней IgM, а черными линиями обозначены их 95% доверительные интервалы (CI).

### Уровни антител к гликанам с учетом вовлеченности регионарных лимфатических узлов

Далее нами были проанализированы уровни антител к выбранным опухолеассоциированным гликанам в зависимости от наличия (N1 – 19 пациентов) либо отсутствия (N0 – 130 пациентов) регионарных метастазов у пациентов с КРР.

Мы обнаружили IgM к гликанам (*Leca6LN*, *GalNAcα4'LN*, *3-SiaTn*, *core 3*, *core 4*, *P1*, *Ley*, *Atri*, *Atri-long*, *Tαα*, *di-GalNAcβ*, *TF-long*, *β-SiaTn*, *core 2*), уровни которых различаются ( $p < 0,05$ ) более чем в 10 раз у пациентов с наличием и отсутствием метастазов в регионарные лимфоузлы.

Особенностью изменения уровней антител к гликанам у больных КРР в группах с различным показателем распространенности заболевания N, в соответствии с классификацией TNM, было то, что наибольшие значения медиан уровней антител к гликанам наблюдались при отсутствии регионарных метастазов (N0). Отсюда можно сделать вывод, что анализ изменения уровней антител к вышеперечисленным гликанам может оказаться полезным при ведении больных КРР для уточнения распространенности опухолевого процесса.

## **Анализ связи уровней антител к гликанам со степенью дифференцировки колоректального рака**

У 143 больных КРР с оцененной степенью дифференцировки опухоли (G1 – 26 пациентов, G2 – 106 пациентов, G3 – 11 пациентов) определили медианы уровней антител к изучаемым гликанам.

Установлено значительное снижение медиан уровней антител к большинству гликанов при неблагоприятной низкой степени дифференцировки опухоли (G3). Для IgM к Man $\beta$ 1-4GlcNAc такое снижение было статистически значимым, и медианные уровни различались более чем в 10 раз между группой пациентов с G3 и группой здоровых доноров ( $p=0,0041$ ). Уровни антител к сульфатированному лактозамину, 6-O-Su-LacNAc статистически значимо различались у больных с умеренно дифференцированной (G2) и высоко дифференцированной (G1) аденокарциномой, при этом медиана IgM к этому лактозамину у пациентов с G1 была выше, чем у пациентов с G2 дифференцировкой опухоли более чем в 10 раз.

### **Изменение уровней антител у больных колоректальным раком в зависимости от локализации опухоли**

Для анализа связей уровней антител к гликанам и локализации опухоли в толстой кишке сформировали следующие группы: 1) Опухоли левосторонней локализации (дистальная треть поперечной ободочной кишки, селезеночный изгиб, нисходящая ободочная кишка и сигмовидная кишка) – 47 образцов; 2) Опухоли правосторонней локализации (слепая кишка, восходящая ободочная кишка, печеночный изгиб и проксимальная треть поперечной ободочной кишки) – 40 образцов; 3) Опухоли прямой кишки – 62 образца.

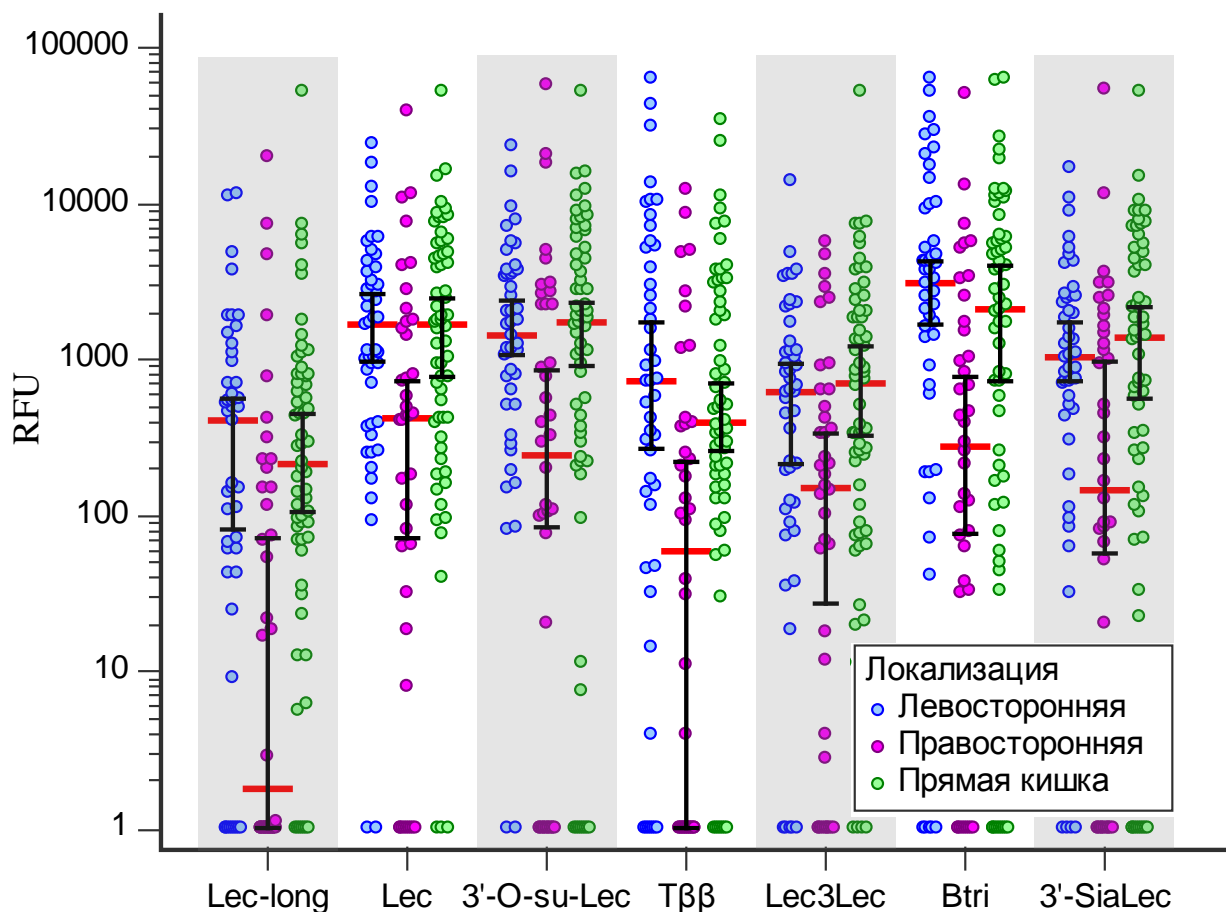
Для 62 образцов пациентов с раком прямой кишки выявлены статистически значимые различия в медианных уровнях IgM к 7 гликанам (Lec-long, Lec, 3'-O-su-Lec, T $\beta$  $\beta$ , Lec3Lec, Vtri, 3'-SiaLec) по сравнению с опухолями правосторонней локализации (рис. 7).

В свою очередь, медианные уровни IgM в образцах пациентов с левосторонней и правосторонней локализациями опухолями были статистически значимо отличны для 5 гликанов (Lec-long, Lec, 3'-O-su-Lec, T $\beta$  $\beta$ , Vtri).

Большинство из этих гликанов принадлежат к системам групп крови, например Lewis. При этом aberrantное гликозилирование, по-видимому, может происходить по-разному в разных разделах кишечника, что может быть опосредованно связано с разным прогнозом и выживаемостью пациентов в зависимости от локализации опухоли. Отличия в уровнях IgM к гликанам также

могут зависеть от разной бактериальной популяции в различных отделах кишечника, воздействия различных питательных веществ и желчных кислот или различного эмбриологического происхождения.

Можно отметить, что в группе больных с локализацией опухоли в правом отделе толстого кишечника наблюдались наименьшие медианы IgM к 7 гликанам по сравнению с другими локализациями опухоли (рис. 7).



**Рисунок 7.** Уровни IgM к гликанам *Lec-long*, *Lec*, *3'-O-su-Lec*, *Tββ*, *Lec3Lec*, *Btri*, *3'-SiaLec* в зависимости от локализации опухоли. Точками обозначены уровни IgM к гликану у каждого пациента, горизонтальными красными отрезками - медианные значения уровней IgM, а черными линиями обозначены их 95% доверительные интервалы (CI).

## **Анализ концентраций растворимых форм белка запрограммированной клеточной гибели 1 (sPD-1) и его лиганда (sPD-L1), и корреляции с уровнями IgM к гликанам**

Белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1) и его лиганд PD-L1 участвуют в механизмах иммунного ответа организма. Было показано, что уровни растворимых форм PD-1 и PD-L1 (sPD-1 и sPD-L1) в крови могут быть биомаркерами ответа на лечение и иметь прогностическое значение в оценке выживаемости онкологических пациентов (Zhu and Lang, 2017).

Ранее рядом авторов были оценены концентрации sPD-1 и sPD-L1 у больных различными видами рака и здоровых доноров, однако публикаций об уровнях этих молекул у пациентов с КРР нами обнаружено не было, поэтому нами были измерены уровни растворимых форм PD-1 и PD-L1 в 96 образцах сывороток крови больных с начальными I и II стадиями КРР и в 30 образцах сывороток крови здоровых доноров.

Медианная концентрация sPD-1 у больных КРР составила 37 пг/мл, sPD-L1 – 8,9 пг/мл, а у здоровых доноров эти значения соответственно равнялись 46 пг/мл и 7,6 пг/мл. Нами не обнаружено статистически значимых различий в концентрациях sPD-1 и sPD-L1 между больными КРР и здоровыми донорами. Также мы не обнаружили статистически значимых различий в концентрациях этих маркеров при подгрупповом анализе среди больных КРР, показавшем, что уровни sPD-1 и sPD-L1 не зависят от стадии заболевания, дифференцировки или локализации опухоли, возраста или пола пациентов.

Недавние публикации подтверждают факт того, что функции белка PD-L1 могут регулироваться его гликозилированием (Li et al., 2016, 2018). Поскольку было показано, что анализ степени гликозилирования PD-L1 может повысить эффективность клинической диагностики ряда онкологических заболеваний (Wang et al., 2020), нами был проведен корреляционный анализ концентраций sPD-1, sPD-L1 и уровней антител к 66 гликанам и определены ранговые коэффициенты корреляции Кэнделла.

Можно отметить, однако, что только для медианных значений уровней IgM к мальтозе наблюдается слабая положительная связь с концентрацией sPD-1, коэффициент корреляции Кэнделла равнялся 0,23. Также показано, что уровень IgM к Man $\beta$ 1-4GlcNAc положительно связан с концентрацией sPD-L1 (коэффициент корреляции Кэнделла 0,18). Отрицательная корреляция наблюдалась между концентрацией sPD-L1 и уровнями антител класса М к SiaTn, 3'-sialyl-TF, core 4 и Lesc $\alpha$ 6LN. Однако все эти взаимосвязи были слабо отрицательные, и коэффициент корреляции Кэнделла не превышал 0,2 в абсолютном значении.

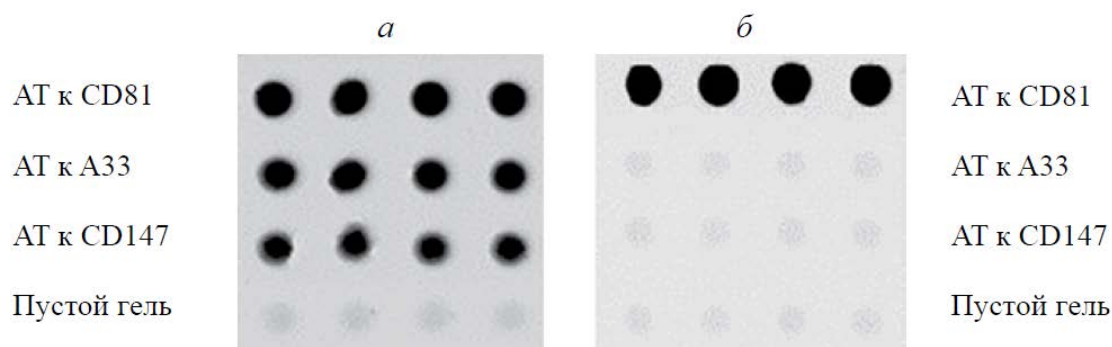
## Иммунофлуоресцентный анализ трансмембранных белков – маркеров экзосом на биологических микрочипах

Нами рассмотрена возможность применения гидрогелевых микрочипов для иммунофлуоресцентного определения поверхностных белковых маркеров экзосом в случае колоректального рака (КРР). Экзосомы – это микровезикулы размером 30-100 нм, и их размер сопоставим с пентамерами IgM. Таким образом, возможность исследования таких объектов на гидрогелевых микрочипах представляла особый интерес.

Были изготовлены микрочипы, содержащие иммобилизованные антитела (АТ) к белку тетраспанину CD81, универсальному маркеру экзосом, к гликопротеину А33, экспрессируемому эпителиальными опухолевыми клетками при КРР, и к CD147 басигину - гликопротеину, принадлежащему к суперсемейству иммуноглобулинов, также экспрессируемому клетками КРР.

Из исследуемых сывороток крови нами были выделены экзосомы ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы (Théry et al., 2006). Полученные экзосомы из сывороток крови здорового донора и пациента с КРР, а также сами сыворотки были проанализированы на биологических микрочипах.

В результате проведенных экспериментов мы обнаружили высокие флуоресцентные сигналы от ячеек с иммобилизованными антителами к белкам А33 и CD147 как в сыворотке крови пациента с КРР (рис. 8), так и в препарате экзосом, выделенных из этой сыворотки крови. Необходимо также отметить, что при анализе сыворотки крови здорового донора нами не были получены значимые сигналы флуоресценции от ячеек, содержащих антитела к белкам А33 и CD147.



**Рисунок 8.** Флуоресцентные изображения микрочипов, после проведения сэндвич-анализа сывороток крови: а – флуоресцентное изображение после инкубации микрочипа с сывороткой крови больного колоректальным раком; б – флуоресцентное изображение после инкубации микрочипа с сывороткой крови здорового донора.

Эти данные позволяют нам сделать вывод о том, что анализируемые нами экзосомы из сыворотки крови больного КРР принадлежат к A33<sup>+</sup>/CD147<sup>+</sup> субпопуляциям экзосом, характерным для КРР.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы нами разработан метод анализа антител к гликанам с помощью биологических микрочипов. С использованием разработанного метода получены профили циркулирующих антигликановых антител класса М в сыворотках крови пациентов с начальными стадиями колоректального рака (КРР). Выявлены потенциальные маркеры, представляющие собой гликан-специфичные IgM, медианные уровни которых статистически значимо различаются в группах больных КРР и здоровых доноров, что актуально для развития методов диагностики этого заболевания. Также выявлены закономерности изменения медианных уровней антигликановых антител, позволяющие дифференцировать различные подгруппы пациентов с КРР в зависимости от стадии заболевания или локализации опухоли. В ходе работы нами были определены концентрации растворимых форм белка запрограммированной клеточной гибели 1 и его лиганда в сыворотке крови больных I-II стадиями КРР и здоровых доноров. Установленные закономерности могут оказаться полезными при исследовании механизмов развития КРР.

Результаты работы вносят вклад в понимание механизмов взаимодействия врожденного иммунитета и опухоли и расширяют наши знания о том, как репертуар антигликановых антител изменяется при КРР. Переход от широко известных в клинической практике серологических маркеров к новым перспективным кандидатам может улучшить диагностику КРР и позволит проводить более эффективную персонализированную терапию.

## ВЫВОДЫ

1. На основе технологии гидрогелевых микрочипов разработан метод мультиплексного анализа IgM к гликанам и проведено сопоставление уровней антител к гликанам в образцах сывороток крови больных колоректальным раком и здоровых доноров.
2. Показано, что наиболее эффективными потенциальными биомаркерами для выявления колоректального рака на начальных (I и II) стадиях являются IgM к гликанам maltose, LN $\beta$ 6'LN, GN4'LN, Zymosan, GN6'LN, Man $\beta$ 1-4GlcNAc, 6-Su-3'-SiaLec,  $\alpha$ GalLex, 3'-O-su-Lec, Neu5Gc-Tn, для каждого из которых значения чувствительности или специфичности превышали 70%.

3. По результатам анализа профилей IgM к гликанам в образцах сывороток крови больных колоректальным раком, показано, что:
  - медианные уровни IgM к 3-м гликанам (GalNAc $\alpha$ 4'LN, Lec $\alpha$ 6LN, 3-SiaTn) различаются более чем в 10 раз в группе пациентов с начальными стадиями и группе пациентов с III стадией колоректального рака ( $p < 0,0084$ );
  - медианные уровни IgM к 14-ти гликанам (Lec $\alpha$ 6LN, GalNAc $\alpha$ 4'LN, 3-SiaTn, core 3, core 4, P1, Ley, Atri, Atri-long, T $\alpha\alpha$ , di GalNAc $\beta$ , TF-long,  $\beta$ -SiaTn, core 2) различаются более чем в 10 раз в группах больных колоректальным раком с отсутствием и наличием регионарных метастазов, при этом медианные уровни IgM у больных достоверно ниже по сравнению со здоровыми донорами ( $p < 0,017$ );
  - медианные уровни IgM к 7-ми гликанам (Lec-long, Lec, 3'-O-su-Lec, T $\beta\beta$ , Lec3Lec, Btri, 3'-SiaLec) различаются в 4-11 раз в группах пациентов с различной локализацией опухоли ( $p < 0,0084$ ). Наименьшие медианные уровни IgM к гликанам наблюдаются в случае опухолей правосторонней локализации;
  - медианные уровни IgM к 8-ми гликанам (Lec, Lec3Lec, GlcNAc3'Lec, 3'-O-su-Lec, 3'-SiaLec, Lec-long, core 6, T $\beta\beta$ ) различаются в 2-20 раз в разных возрастных группах больных колоректальным раком ( $p < 0,0084$ ), при этом наблюдается снижение уровней антител с повышением возраста пациентов.
4. Продемонстрировано, что концентрации растворимых форм белка запрограммированной клеточной гибели 1 (sPD-1) и его лиганда (sPD-L1) не отличаются у пациентов с колоректальным раком и у здоровых доноров.
5. Показано, что с использованием метода мультиплексного иммуноанализа на гидрогелевых биологических микрочипах можно выявлять A33<sup>+</sup>/CD147<sup>+</sup> субпопуляции экзосом, характерные для колоректального рака.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

### • Статьи в рецензируемых научных журналах:

- 1) **Tikhonov A.**, Smoldovskaya O., Feyzkhanova G., Kushlinskii N., Rubina A. Glycan-specific antibodies as potential cancer biomarkers: a focus on microarray applications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2020, 58(10), 1611-1622.
- 2) **Тихонов А.А.**, Савватеева Е.Н., Черниченко М.А., Масленников В.В., Сидоров Д.В., Рубина А.Ю., Кушлинский Н.Е. Анализ уровней антигликановых антител классов G и M при колоректальном раке. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2018, Том 166, №10, с. 485-490.



3) Бутвиловская В.И., **Тихонов А.А.**, Савватеева Е.Н., Рагимов А.А., Салимов Э.Л., Волошин С.А., Сидоров Д.В., Черниченко М.А., Поляков А.П., Филюшин М.М., Цыбульская М.В., Рубина А.Ю. Гидрогелевый микрочип - инструмент для исследования экзосом в сыворотке крови человека. *Молекулярная биология*, 2017, Том 51, №5, с. 817-823.

4) Савватеева Е.Н., **Тихонов А.А.**, Бутвиловская В.И., Цыбульская М.В., Рубина А.Ю. Поверхностные белковые маркеры экзосом в диагностике колоректального рака. *Молекулярная биология*, 2017, Том 51, №5, с. 752-760.

5) **Tikhonov A.**, Tsybul'skaya M., Butvilovskaya V., Savvateeva E., Belousov P., Kuprash D., Solopova O., Chernichenko M., Filushin M., Rubina A. Differential quantification of SCCA1 and SCCA2 cancer antigens using a hydrogel biochip. *Analytical Methods*, 2016, 8(44), 7920-7928.

6) Бутвиловская В.И., Цыбульская М.В., **Тихонов А.А.**, Талибов В.О., Белоусов П.В., Сазыкин А.Ю., Шварц А.М., Путляева Л.В., Суржигов С.А., Стомахин А.А., Солопова О.Н., Рубина А.Ю. Получение рекомбинантных серпинов В3 и В4 и исследование специфичности их взаимодействия с антителами на биологическом микрочипе. *Молекулярная биология*, 2015, Том 49, №5, с. 790-799.

#### • Патенты:

1) Бутвиловская В.И., Савватеева Е.Н., **Тихонов А.А.**, Цыбульская М.В., Рубина А.Ю. Биологический микрочип для обнаружения опухолевых экзосом в сыворотке/плазме крови человека для диагностики колоректального рака. Патент № 2682721, Дата приоритета 17.11.2016, Дата публикации 21.03.2019.

2) **Тихонов А.А.**, Рубина А.Ю., Бутвиловская В.И., Савватеева Е.Н., Цыбульская М.В., Поплетаева С.Б., Чечеткин В.Р., Волошин С.А. Способ диагностики/скрининга колоректального рака, основанный на одновременном количественном определении онкомаркеров белковой природы, антител к гликанам, иммуноглобулинов G, A и M в крови человека на биологическом микрочипе. Патент № 2625018, Дата приоритета 16.12.2015, Дата публикации 11.07.2017.

#### • Материалы конференций и научных школ:

1) **Tikhonov A.**, Kushlinskii N., Rubina A. Anti-glycan antibodies in colorectal cancer diagnosis. The 16th Midwest Carbohydrate and Glycobiology Symposium (MCGS), 20 November 2020, Michigan, USA, Virtual event.

2) **Тихонов А.А.**, Рубина А.Ю., Кушлинский Н.Е. Антигликановые антитела в диагностике онкологических заболеваний. XXV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Наука и практика лабораторных исследований». 16-18 сентября 2020 г., Москва. *Лабораторная служба*, 2020. Том 9, № 1. с. 62-63.

3) **Тихонов А.А.** Антитела к гликанам в диагностике рака кишечника. XI Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, 23-25 апреля 2020 г., Москва. *Евразийский онкологический журнал*, 2020, Том 8, №2, с. 872.

4) **Тихонов А.А.**, Черниченко М.А., Бутвиловская В.И., Фейзханова Г.У., Сидоров Д.В., Кушлинский Н.Е., Рубина А.Ю. Антитела к сахарам в диагностике рака кишечника. 46 научная сессия ЦНИИ гастроэнтерологии «Генетика в гастроэнтерологии: возможности и перспективы», 27-28 февраля 2020 г, Москва. *Доказательная гастроэнтерология*, 2020, Том 9, № 1, Выпуск 2, с. 64.

- 5) **Тихонов А.А.**, Бутвиловская В.И., Фейзханова Г.У., Кушлинский Н.Е., Рубина А.Ю. Антигликановые антитела в диагностике онкологических заболеваний. VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум "Белки и пептиды", 1-6 октября 2019 г., Сочи. *Acta Naturae*, 2019, Том 11, № S2, с. 278.
- 6) **Тихонов А.А.** Разработка метода *in vitro* диагностики колоректального рака с использованием гликочипов. IV Российский конгресс лабораторной медицины, 03-05 октября 2018 г., Москва. *Лабораторная служба*, 2018, № 4, с. 148.
- 7) **Tikhonov A.** IgG and IgM anti-glycan antibodies for colorectal cancer diagnosis. The 8<sup>th</sup> DKTK Summer school in translational cancer research, 8-12 October 2018, Albufeira, Portugal. Abstract book, p. 123.
- 8) **Tikhonov A.**, Chernichenko M., Butvilovskaya V., Sidorov D., Rubina A. IgM anti-glycan antibodies in sera of colorectal cancer patients. The 4<sup>th</sup> Molecular Analysis for Personalised Therapy (MAP) Conference, 14-15 September 2018, Paris, France. *Annals of Oncology*, 2018, Volume 29, Issue suppl\_6, mdy318. 018.
- 9) Смолдовская О.В., Фейзханова Г.У., Бутвиловская В.И., **Тихонов А.А.**, Филиппова М.А., Волошин С.А., Рубина А.Ю. Мультиплексный анализ с использованием белковых и гликановых микрочипов. III Российский конгресс лабораторной медицины, 11-13 сентября 2017 г., Москва. *Лабораторная служба*, 2017, № 3, с. 148.
- 10) **Tikhonov A.**, Butvilovskaya V., Chernichenko M., Savvateeva E., Feyz Khanova G., Lysov Y., Sidorov D., Rubina A. Anti-glycan IgG antibodies profiling for colorectal cancer diagnosis using hydrogel microarrays. 4th AACR The New Horizons in Cancer Research Conference, 6-9 November 2017, Shanghai, China. *Proceeding of the New Horizons in Cancer Research Conference*, p. 70.
- 11) **Тихонов А.А.**, Бутвиловская В.И., Савватеева Е.Н., Рагимов А.А., Салимов Э.Л., Сидоров Д.В., Черниченко М.А., Рубина А.Ю. Комбинации серологических маркеров для диагностики колоректального рака. IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017», 18-20 апреля 2017 г., Москва. Сборник тезисов, с. 201-202.
- 12) **Tikhonov A.**, Butvilovskaya V., Chernichenko M., Savvateeva E., Feyz Khanova G., Lysov Y., Sidorov D., Rubina A. Diagnostic value of anti-glycan antibodies in patients with colorectal cancer. 3rd Molecular Analysis for Personalised Therapy (MAP) Conference, 13-14 October 2017, Zurich, Switzerland. *Annals of Oncology*, 2017, Volume 28, Issue suppl\_7, mdx508.022.
- 13) Бутвиловская В.И., Савватеева Е.Н., **Тихонов А.А.**, Рагимов А.А., Салимов Э.Л., Пожарицкая Е.И., Рубина А.Ю. Возможности биологических микрочипов в скрининге колоректального рака. Второй российский конгресс лабораторной медицины, 12-14 октября 2016 г., Москва. *Клиническая лабораторная диагностика*. Том 61, №9, с.520.
- 14) **Тихонов А.А.** Белковые и гликановые сигнатуры для ранней диагностики колоректального рака на биологическом микрочипе. XIX Российский онкологический конгресс. 17-19 ноября 2015 г., Москва.
- 15) **Тихонов А.А.**, Бутвиловская В.И., Цыбульская М.В., Белоусов П.В., Сазыкин А.Ю., Стомахин А.А., Солопова О.Н., Рубина А.Ю. Получение рекомбинантных серпинов В3 и В4 и исследование специфичности их взаимодействия с антителами на биологическом микрочипе. I Всероссийская конференция с международным участием «Химический анализ и медицина». 9-12 ноября 2015 г., Москва. Сборник тезисов, с. 55-56.