

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

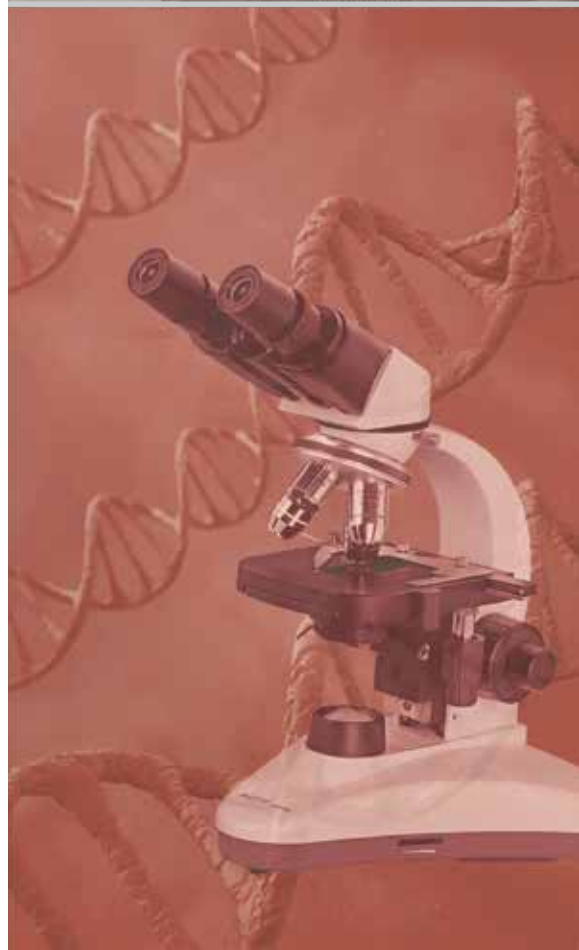


*Таргетирование комплекса
ремоделирования хроматина
SWI/SNF в терапии
онкологических заболеваний*

*Ассоциация рака молочной железы
с онкогенными папилломавирусами*

*Молекулярные маркеры ответа
на химиотерапию при местно-
распространенном раке желудка*

*Особенности транскрипционной
активности генов
при плоскоклеточном раке языка*

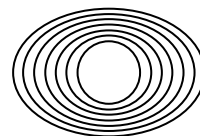


Журнал «Успехи молекулярной онкологии» входит в перечень ведущих рецензируемых научных периодических изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией (ВАК) для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук. Журнал включен в Научную электронную библиотеку и Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), имеет импакт-фактор, зарегистрирован в базе данных Scopus, в CrossRef, статьи индексируются с помощью идентификатора цифрового объекта (DOI).

Электронная версия журнала представлена в DOAJ.

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КАНЦЕРОГЕНЕЗА ФГБУ «НМИЦ ОНКОЛОГИИ ИМ. Н.Н. БЛОХИНА»
МИНЗДРАВА РОССИИ

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
«Национальный медицинский
исследовательский центр
онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

Е Ж Е К В А Р Т А Л Ы Й Н А У Ч Н О - П Р А К Т И Ч Е С К И Й Р Е Ц Е Н З И Р У Е М Ы Й Ж У Р Н А Л

Главная задача журнала «Успехи молекулярной онкологии» – публикация современной информации о проведенных фундаментальных и клинико-экспериментальных исследованиях в области молекулярной онкологии.

Цель издания – дать читателям представление об актуальных направлениях современной молекулярной онкологии, ознакомить с наиболее значимыми работами отечественных и зарубежных исследователей в этой области, создать общую площадку, на которой специалисты разных областей, включая онкологов, молекулярных биологов, генетиков, биохимиков, вирусологов, химиотерапевтов, смогут поделиться результатами своих научных исследований.

О С Н О В А Н В 2 0 1 4 Г .

1 ТОМ 10
'23

Учредители:
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
ООО «ИД «АБВ-пресс»

Адрес редакции:
115478, Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru

www.abvpress.ru

Прием статей:
онлайн на сайте
<http://umo.abvpress.ru/jour>

или по адресу
adv.mol.onc@ronc.ru

*Выпускающий редактор И.В. Пучкова
Корректор Е.С. Самойлова
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук*

*Служба подписки и распространения
И.В. Шургаева, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru*

*Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых*

*коммуникаций (ПИ № ФС77-57560
от 08.04.2014)*

**При полной или частичной
перепечатке материалов ссылка
на журнал «Успехи молекулярной
онкологии» обязательна.**

**Редакция не несет ответственности
за содержание публикуемых
рекламных материалов.**

**В статьях представлена точка
зрения авторов, которая может
не совпадать с мнением редакции.**

ISSN 2313-805X (Print)
ISSN 2413-3787 (Online)
Успехи молекулярной онкологии.
2023. Том 10. № 1. 1–96.

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2023.
Подписной индекс в каталоге
«Пресса России» – 93562.
Отпечатано в типографии
«Мэйл Текнолоджи».
105082, Москва, Переведеновский
пер., 13, стр. 16.
Тираж 1000 экз. Бесплатно.

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Красильников Михаил Александрович, д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) Минздрава России, директор Научно-исследовательского института канцерогенеза (НИИ канцерогенеза) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заведующий отделом экспериментальной биологии опухолей (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Якубовская Марианна Геннадиевна, д.м.н., заведующая отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Гудкова Маргарита Владимировна, к.б.н., ученый секретарь НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Берштейн Лев Михайлович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории онкоэндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Боженко Владимир Константинович, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии отдела патоморфологии и лабораторной диагностики, ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России, заслуженный врач РФ (Москва, Россия)

Бойчук Сергей Васильевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей патологии, декан медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (Казань, Россия)

Глушанкова Наталия Александровна, д.б.н., заведующая лабораторией механизмов канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Гудков Андрей Владимирович, д.б.н., профессор, старший вице-президент по фундаментальной науке и заведующий отделом биологии клеточного стресса Института онкологии им. Розвелла Парка (Баффало, Нью-Йорк, США)

Животовский Борис Давидович, д.б.н., профессор, лауреат Государственной премии СССР, заведующий лабораторией исследования механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», профессор Каролинского института (Стокгольм, Швеция)

Имянитов Евгений Наумович, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Казанский Дмитрий Борисович, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Карамышева Анда Фуадовна, д.б.н., заведующая лабораторией генетики опухолевых клеток НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Карпунин Александр Васильевич, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» (Москва, Россия)

Кжышкова Юлия Георгиевна, д.б.н., профессор, руководитель отдела врожденного иммунитета и толерантности Института трансфузионной медицины и иммунологии медицинского факультета Мангейма университета Гейдельберга (Гейдельберг, Германия)

Кирсанов Кирилл Игоревич, д.б.н., заведующий лабораторией канцерогенных веществ отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, доцент кафедры общей врачебной практики ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Москва, Россия)

Лазаревич Наталья Леонидовна, д.б.н., профессор, заведующая отделом иммунохимии НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Мазуренко Наталья Николаевна, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории онкогеномики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Миркин Сергей Моисеевич, именной профессор биологии Университета Тафтса (Медфорд, Орегон, США)

Сергеева Наталья Сергеевна, д.б.н., профессор, руководитель лаборатории прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., директор Департамента комплексных программ и проектов Минобрнауки России (Москва, Россия)

Чевкина Елена Максимовна, д.б.н., заведующая лабораторией регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Чердынцева Надежда Викторовна, д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии Научно-исследовательского института онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН» (Томск, Россия)

Щербаков Александр Михайлович, старший научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Юришич Владимир, профессор факультета медицинских наук Университета Крагуеваца (Крагуевац, Сербия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Белицкий Геннадий Альтерович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Гурцевич Владимир Эдуардович, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Давыдов Михаил Иванович, д.м.н., профессор, академик РАН, член президиума РАН, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Заридзе Давид Георгиевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом эпидемиологии и профилактики опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, заслуженный деятель науки РФ (Москва, Россия)

Копнин Борис Павлович, д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитогенетики НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кушлинский Николай Евгеньевич, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией клинической биохимии НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Лихтенштейн Анатолий Владимирович, д.б.н., руководитель группы биохимии опухолей отдела экспериментальной биологии опухолей НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Тюляндин Сергей Алексеевич, д.м.н., профессор, заведующий отделением клинической фармакологии и химиотерапии, заместитель директора по научной работе НИИ клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

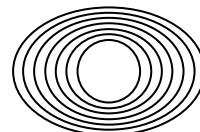
The journal "Advances in Molecular Oncology" is put on the Higher Attestation Commission (HAC) list of leading peer-reviewed scientific periodicals recommended to publish the basic research results of candidate's and doctor's theses.

The journal is included in the Scientific Electronic Library and the Russian Science Citation Index (RSCI) and has an impact factor; it is registered in the Scopus data base, CrossRef, its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

The journal's electronic version is available in the DOAJ.

RESEARCH INSTITUTE OF CARCINOGENESIS, N.N. BLOKHIN NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTER
OF ONCOLOGY, MINISTRY OF HEALTH OF RUSSIA

ADVANCES in MOLECULAR ONCOLOGY



N.N. Blokhin National Medical
Research Center of Oncology,
Ministry of Health of Russia

Online version of the journal
is available at:
<http://umo.abvpress.ru/jour>

QUARTERLY PEER-REVIEWED SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

The main objective of the journal "Advances in Molecular Oncology" is publication of current information on basic, clinical and experimental research in molecular oncology.

The publication aim to provide insight into currently important areas of modern molecular oncology; present the most significant studies from Russian and foreign specialists in this field; create a forum for various researchers, including oncologists, molecular biologists, geneticists, biochemists, virologists, chemotherapists to share the results of their scientific research.

FOUNDED IN 2014

1 VOL. 10
'23

Founders:

N.N. Blokhin National Medical
Research Center of Oncology,
Ministry of Health of Russia;
PH "ABV-press"

Editorial Office:

Research Institute
of Carcinogenesis,
Floor 3, Bld. 15
24 Kashirskoe Shosse, Moscow
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19.
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Article submission:

on-line at <http://umo.abvpress.ru/jour>
or by e-mail to adv.mol.onc@ronc.ru

*Managing editor I.V. Puchkova
Proofreader E.S. Samoylova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk*

*Subscription & Distribution Service
I.V. Shurgaeva, +7 (499) 929-96-19,
base@abvpress.ru*

*The journal was registered
at the Federal Service for Surveillance
of Communications, Information*

*Technologies, and Mass Media
(III No. ΦC77-57560
dated 08 April 2014).*

**If materials are reprinted in whole
or in part, reference must necessarily
be made to the journal "Uspekhi
molekulyarnoy onkologii".**

**The editorial board is not responsible
for advertising content.**

**The authors, point of view given
in the articles may not coincide
with the opinion of the editorial board.**

ISSN 2313-805X (Print)
ISSN 2413-3787 (Online)

Uspekhi molekulyarnoy onkologii.
2023. Vol. 10 No. 1. 1–96.

© PH "ABV-Press", 2023
Pressa Rossii catalogue
index: 93562.

Printed at the Mail Technology Ltd
Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane,
Moscow 105082.

1000 copies.

Free distribution.

EDITOR-IN-CHIEF

Krasil'nikov, Mikhail A., DSc, PhD, Professor, Deputy Director for Research Work of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Carcinogenesis, Head of Department of Experimental Biology of Tumors (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

Yakubovskaya, Marianna G., MD, PhD, Head of the Department of Chemical Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Gudkova, Margarita V., PhD, Scientific Secretary of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Berstein, Lev M., MD, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Oncoendocrinology of the N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

Bozhenko, Vladimir K., MD, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Biochemistry of the Department of Pathomorphology and the Laboratory Diagnostics of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology of the Ministry of Health of Russia, Honored Doctor of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Boychuk, Sergey V., MD, PhD, Professor, Head of the Department of General Pathology, Dean of the Faculty of Medicine and Biology, Kazan State Medical City of the Ministry of Health of Russia (Kazan, Russia)

Gloushankova, Natalia A., DSc, PhD, Head of the Laboratory of Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Gudkov, Andrey V., DSc, PhD, Professor, Sr. Vice-President for Basic Science and Head of the Department of Cell Stress Biology of the Roswell Park Cancer Institute (Buffalo, New York, USA)

Zhivotovskiy, Boris D., DSc, PhD, Professor, Laureate of the State Award of the USSR, Head of the Department of Apoptosis Mechanisms, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Professor of the Karolinska Institute (Stockholm, Sweden)

Imyanitov, Eugeny N., MD, PhD, Professor, Associate Member of RAS, N.N. Petrov National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

Kazansky, Dmitry B., DSc, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Immune Regulation Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Karamysheva, Aida F., DSci, PhD, Head of the Laboratory of the Genetics of Tumor Cells of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Karpukhin, Aleksander V., DSc, PhD, Professor, Head of the Laboratory of Molecular Genetics of Complex Inherited Diseases of the Medical Genetic Research Center (Moscow, Russia)

Kirsanov, Kirill I., DSc, Head of the Laboratory of Carcinogenic Compounds, Department of Chemical carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Associate Professor of the Department of General Medical Practice of the Peoples' Friendship University of Russia (Moscow, Russia)

Kzhyskovska, Juliya G., DSc, PhD, Professor, Head of Department of Innate Immunity and Tolerance, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University (Heidelberg, Germany)

Lazarevich, Natalia L., DSc, PhD, Professor, Head of the Department of the Immunochemistry of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Mazurenko, Natalia N., DSc, PhD, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Oncogenomics of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Mirkin, Sergey M., Professor, White Family Department of Biology, Head in Biology Tufts University (Medford, Oregon, USA)

Sergeeva, Natalia S., DSc, PhD, Professor, Head of the Prognostics of the Efficacy of Conservative Treatment Laboratory of the P.A. Herzen Moscow Oncology Research Center – branch of National Medical Research Radiology Center of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Shcherbakov, Alexander M., Senior Researcher, Acting Head of the Laboratory of Oncoproteomics of the Department of Experimental Biology of Tumors of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Stepanova, Evgenia V., MD, PhD, Director of the Department of Complex Programs and Projects, Ministry of Science and Higher Education of Russia (Moscow, Russia)

Tchevkina, Elena M., DSc, PhD, Head of the Laboratory of the Regulation of Cell and Viral Oncogenes of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Tcherdyntseva, Nadezhda V., DSc, PhD, Professor, Associate Member of RAS, Deputy Director for Research Work, Head of the Laboratory of Molecular Oncology and Immunology of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center (Tomsk, Russia)

Juriscic, Vladimir, Professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (Kragujevac, Serbia)

EDITORIAL COUNCIL

Belitsky, Gennady A., MD, PhD, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Chemical Carcinogenesis Mechanisms of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Gurtsevitch, Vladimir E., MD, PhD, Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Davydov, Mikhail I., MD, PhD, Professor, Academician of RAS, Member of the Presidium of the RAS, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Zaridze, David G., MD, PhD, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Department of Epidemiology and Prevention of Tumors of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia, Honored Scientist of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Kopnin, Boris P., DSc, PhD, Professor, Head Researcher at the Cytogenetics Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Kubasova, Irina Yu., PhD, Scientific Secretary of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Kushlinskii, Nikolay E., MD, PhD, Professor, Associate Member of RAS, Head of the Clinical Biochemistry Laboratory, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Lichtenstein, Anatoly V., DSc, PhD, Head of the Tumor Biochemistry Group, Department of Experimental Tumor Biology of the Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Tjulandin, Sergey A., MD, PhD, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology and Chemotherapy, Deputy Director for Scientific Research, N.N. Trapeznikov Research Institute of Clinical Oncology of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Ж У Р Н А Л Ы

Scopus
ОНКОУРОЛОГИЯ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Scopus
Опухоли **ГОЛОВЫ
и ШЕИ**
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

Scopus
**АНДРОЛОГИЯ
И ГЕНИТАЛЬНАЯ ХИРУРГИЯ**
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Scopus
РУССКИЙ
ЖУРНАЛ **ДЕТСКОЙ
НЕВРОЛОГИИ**
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Scopus
**ОНКО
ГЕМАТОЛОГИЯ**
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Scopus
**УСПЕХИ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ОНКОЛОГИИ**
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
http://jmo.abvpress.ru/ru/

Scopus
**Нервно-мышечные
БОЛЕЗНИ**
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Scopus
ОПУХОЛИ
**ЖЕНСКОЙ
РЕПРОДУКТИВНОЙ
СИСТЕМЫ**
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Scopus
НЕЙРОХИРУРГИЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

**ОНКО
ПАТОЛОГИЯ**
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

**Тазовая хирургия
и онкология**
ИЗДАНИЕ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

**Российский
Биотерапевтический
Журнал**
Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
КЛИНИЦИСТ

САРКОМЫ
костей, мягких тканей
и опухоли кожи

СА A Cancer Journal
for Clinicians.
Русское издание

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ
MD-ONCO

Г А З Е Т Ы

Онкология Сегодня
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЕ ИЗДАНИЕ ДЛЯ ОНКОЛОГОВ

Урология сегодня
специализированное издание для урологов

СОВРЕМЕННАЯ
КАРДИОЛОГИЯ

**ПЕДИАТРИЯ
СЕГОДНЯ** СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ГАЗЕТА
ДЛЯ ПЕДИАТРОВ

**Акушерство
и гинекология** СЕГОДНЯ

**Московская
Эндокринология
СЕГОДНЯ**

**Гастроэнтерология
СЕГОДНЯ**

**НЕВРОЛОГИЯ
СЕГОДНЯ** СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ГАЗЕТА
ДЛЯ НЕВРОЛОГОВ

ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ

М.В. Немцова, И.В. Буре

Таргетирование комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF в терапии онкологических заболеваний 8

Г.М. Волгарева

Ассоциация рака молочной железы с онкогенными папилломавирусами: аргументы за и против 18

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

С.Д. Аладьев, Д.К. Соколов, А.В. Строкотова, Г.М. Казанская, А.М. Волков, М.О. Политко, А.И. Шахмурадова, Е.Э. Кливер, А.Ю. Цидулко, С.В. Айдагулова, Э.В. Григорьева

Влияние дексаметазона на экспрессию и содержание гликозилированных компонентов в ткани головного мозга мышей 25

К.А. Оганян, А.А. Мусаелян, С.В. Лапин, Т.В. Купенская, А.А. Свечкова, М.А. Беляев, А.А. Захаренко, С.В. Орлов

Молекулярные маркеры ответа на периоперационную химиотерапию при местно-распространенном раке желудка 40

О.И. Кит, И.А. Новикова, Н.Н. Тимошкина, Д.Ю. Гвалдин, А.А. Пушкин, О.Ю. Каймакчи, А.А. Маслов, А.В. Шапошников

Профиль экспрессии микроРНК в изолированных циркулирующих опухолевых клетках при колоректальном раке 49

Д.С. Кутилин, А.Э. Данилова, А.Ю. Максимов, А.В. Снежко, М.А. Енгибарян

Особенности транскрипционной активности генов в различных гистологических подтипах плоскоклеточного рака языка 57

В.К. Боженко, А.М. Шишкин, А.Н. Шкопоров, Я.Ю. Киселева, Т.М. Кулинич, О.Б. Большакова, Е.А. Кудинова, В.А. Солодкий

Исследование подавления роста опухоли, экспрессирующей раково-эмбриональный антиген, новым высокотехнологичным препаратом карплазмин (CAR-T-терапия) у мышей линии Balb/c nude 79

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

А.М. Данишевич, Т.С. Лисица, С.Э. Николаев, И.С. Абрамов, М.Г. Филиппова, Н.И. Поспехова, А.М. Строганова, М.П. Никулин, А.Е. Калинин, И.С. Стилиди, Л.Н. Любченко

Наследственный диффузный рак желудка, ассоциированный с неописанным герминальным вариантом с.1596G>A в гене CDH1 87

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ 94

REVIEW

- M.V. Nemtsova, I.V. Bure*
Targeting of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in cancer therapy 8
- G.M. Volgareva*
Breast cancer association with oncogenic papillomaviruses: arguments pro and con 18

EXPERIMENTAL REPORT

- S.D. Aladev, D.K. Sokolov, A.V. Strokotova, G.M. Kazanskaya, A.M. Volkov, M.O. Politko I, A.I. Shahmuradova, E.E. Kliver, A.Y. Tsidulko, S.V. Aidagulova, E.V. Grigorieva*
Dexamethasone effects on the expression and content of glycosylated components of mouse brain tissue 25
- K.A. Oganyan, A.A. Musaelyan, S.V. Lapin, T.V. Kupenskaya, A.A. Svechkova, M.A. Belyaev, A.A. Zakharenko, S.V. Orlov*
Molecular markers as predictors of response to perioperative chemotherapy in locally advanced gastric cancer 40
- O.I. Kit, I.A. Novikova, N.N. Timoshkina, D.Yu. Gvaldin, A.A. Pushkin, O.Yu. Kaimakchi, A.A. Maslov, A.V. Shaposhnikov*
MicroRNA expression profile in isolated circulating tumor cells in colorectal cancer 49
- D.S. Kutilin, A.E. Danilova, A.Yu. Maksimov, A.V. Snezhko, M.A. Engibaryan*
Genes transcriptional activity features in different histological subtypes of tongue squamous cell carcinoma 57
- V.K. Bozhenko, A.M. Shishkin, A.N. Shkoporov, Y. Yu. Kiseleva, T.M. Kulinich, O.B. Bolshakova, E.A. Kudinova, V.A. Solodkiy*
Study of the suppression of a tumor growth expressing a carcinoembryonic antigen with a new high-tech drug carplasmin (CAR-T therapy) in Balb/c nude mice 79

CLINICAL CASE

- A.M. Danishevich, T.S. Lisitsa, S.E. Nikolaev, I.S. Abramov, M.G. Filippova, N.I. Pospekhova, A.M. Stroganova, M.P. Nikulin, A.E. Kalinin, I.S. Stilidi, L.N. Lyubchenko*
Hereditary diffuse gastric cancer associated with a novel germline variant c.1596G>A in the CDH1 gene 87

INFORMATION FOR AUTHORS 94

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-8-17



Таргетирование комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF в терапии онкологических заболеваний

М.В. Немцова^{1,2}, И.В. Буре¹¹ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России; Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова»; Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1**Контакты:** Марина Вячеславовна Немцова nemtsova_m_v@mail.ru

Ремоделирование хроматина является одним из основных эпигенетических путей регуляции экспрессии генов как в норме, так и при онкологических заболеваниях. Гены, кодирующие белковые субъединицы комплексов ремоделирования SWI/SNF, часто мутируют и/или изменяют свою экспрессию в опухолях человека, влияя на программу экспрессии многих генов при канцерогенезе, что связано с возникновением и прогрессированием рака. Сегодня не существует терапевтических препаратов, которые бы непосредственно изменяли структуру хроматина, поскольку этот комплексный процесс требует привлечения большого количества генов, белков, некодирующих транскриптов и других молекул-посредников. Тем не менее воздействие на комплексы ремоделирования хроматина можно проводить, последовательно влияя на субъединицы и кодирующие их гены, а также некодирующие РНК, которые регулируют работу данных комплексов и направляют их в районы генов-мишеней. Предложены несколько успешных стратегий воздействия на эпигенетические регуляторы, связанные с хроматином, чтобы вызвать синтетическую летальность опухолевых клеток и блокировать опухолевый рост. Для воздействия на процессы ремоделирования хроматина исследуют различные стратегии и механизмы: от ингибиторов бромодоменов отдельных субъединиц до прямого воздействия на функцию SWI/SNF посредством разрушения его основной субъединицы аденозинтрифосфатазы.

В обзоре подробно проанализированы пути и механизмы воздействия на комплекс ремоделирования хроматина SWI/SNF (от экспериментов на опухолевых клетках и модельных животных до сочетанного использования клинических препаратов для лечения онкологических пациентов) с целью получения стойкого противоопухолевого эффекта.

Ключевые слова: ремоделирование хроматина, SWI/SNF, соматические мутации, синтетическая летальность опухолевых клеток, ингибиторы бромодоменов

Для цитирования: Немцова М.В., Буре И.В. Таргетирование комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF в терапии онкологических заболеваний. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(1):8–17. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-8-17

Targeting of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in cancer therapy

M. V. Nemtsova^{1,2}, I. V. Bure¹¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;²Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115478, Russia**Contacts:** Marina Vyacheslavovna Nemtsova nemtsova_m_v@mail.ru

Chromatin remodeling is the one of the main epigenetic ways of gene expression regulation both in normal cells and in oncological diseases. Genes encoding protein subunits of SWI/SNF remodeling complexes often mutate and/or change their expression in human tumors, affecting the expression programs of many genes during carcinogenesis, which is associated with the occurrence and progression of cancer. Today, there are no therapeutic drugs that could directly change the structure of chromatin because of complexity of this process with involvement of a large number of genes, proteins, non-coding transcripts and other intermediary molecules. However, the chromatin remodeling complexes can be affected by consistent influence on the subunits and the genes encoding them, as well as the non-coding RNAs that regulate the operation of these complexes and direct them to the target gene regions. Today, several successful strategies have

been proposed to influence epigenetic regulators associated with chromatin in order to cause synthetic lethality of cancer cells and block tumor growth. To influence the processes of chromatin remodeling, various strategies and mechanisms are being investigated, from inhibitors of bromodomains of individual subunits to direct effects on the function of SWI/SNF by destroying its main adenosine triphosphatase subunit. In our review, we analyze the ways and mechanisms of influencing the SWI/SNF chromatin remodeling complex in order to obtain a stable antitumor effect, from experiments on tumor cells and animal models to the combined use of clinical drugs for the treatment of cancer patients.

Keywords: chromatin remodeling, SWI/SNF, somatic mutations, synthetic lethality of cancer cells, bromodomain inhibitors

For citation: Nemtsova M.V., Bure I.V. Targeting of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in cancer therapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):8–17. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-8-17

ВВЕДЕНИЕ

В ядре клетки ДНК находится в ассоциации с белками и нуклеиновыми кислотами и формирует структуру, называемую хроматином. Хроматин является изменяемой структурой и может образовывать как плотную неактивную закрытую конформацию, называемую гетерохроматином, так и активную некомпактную структуру – эухроматин. В состоянии гетерохроматина ДНК суперспирализована и плотно ассоциирована с белками, что пространственно ограничивает связь регуляторных и энхансерных областей с транскрипционными факторами, в результате чего экспрессия генов в значительной степени инактивирована. Переход закрытого хроматина в открытое состояние (эухроматин) осуществляется с помощью различных эпигенетических механизмов, таких как деметилирование ДНК или ацетилирование гистонов, а также действие комплексов ремоделирования хроматина. В состоянии эухроматина факторы транскрипции, ассоциированные белковые факторы и молекулы-посредники получают доступ к своим генам-мишеням и активируют их экспрессию, включая сигнальные каскады и биологические пути, необходимые для жизни клетки в определенный момент [1].

Ремоделирование хроматина является одним из основных эпигенетических путей регуляции экспрессии генов как в норме, так и при различных видах патологии человека. Комплексы ремоделирования хроматина изменяют его конфигурацию, воздействуя вместе с другими эпигенетическими механизмами, такими как метилирование/деметилирование ДНК и модификации гистонов. Эти комплексы реконструируют нуклеосомы АТФ-зависимым (АТФ – аденозинтрифосфат) образом или заменяют стандартные гистоновые белки на варианты и играют большую роль в осуществлении процессов клеточной жизни, таких как репарация повреждений ДНК, рекомбинация, репликация и контроль транскрипции. Сегодня очевидно, что осуществление этих процессов связано с участием нового класса транскриптов-регуляторов – некодирующих РНК (нкРНК). Взаимодействие между белками, участвующими в ремоделировании хроматиновой структуры, и нкРНК является основой функционирования эпигенетических процессов в клетках в норме и при патологии [2].

Гены, кодирующие белковые субъединицы комплексов ремоделирования хроматина, мутируют и/или изменяют свою экспрессию в опухолях человека, влияя на программу экспрессии многих генов при канцерогенезе, что связано с возникновением и прогрессированием рака [3].

Современный технологический прогресс, способствующий совершенствованию молекулярно-генетических методов и увеличению массива исследований, позволяет получить значительное количество информации о нарушении эпигенетических механизмов, в том числе и о нарушении хроматиновой архитектуры, при канцерогенезе. Одним из основных механизмов, влияющих на белки-регуляторы хроматиновой конформации, является их изменение в опухолевой ткани в результате соматических мутаций и структурных перестроек ДНК. Также к механизмам, приводящим к невозможности поддержания исходной структуры хроматина в опухолевых клетках, можно отнести непосредственное или опосредованное изменение экспрессии белков, ремоделирующих хроматин. Это может происходить как в результате направленного влияния на экспрессию гена, так и при изменении функции посредника, осуществляющего взаимодействие белка с другими белками и молекулами. Также способом, влияющим на хроматиновую конформацию, является нарушение эффективного связывания комплексов с молекулами-посредниками, к которым относятся регулирующие некодирующие транскрипты, такие как длинные некодирующие РНК (днкРНК) и микроРНК. Некодирующие транскрипты выступают основными регуляторами и мессенджерами, участвующими в реализации различных эпигенетических механизмов, в том числе в установлении и поддержании определенной хроматиновой конформации.

Таргетирование молекулярных мишеней, связанных с формированием злокачественного потенциала опухоли, сегодня активно используется при лечении онкологических пациентов в практической медицине. Тем не менее не для всех типов опухолей выявлены потенциальные мишени и предложены эффективные средства лечения. Воздействие на эпигенетические регуляторы злокачественного роста представляет большой интерес, но его механизмы еще недостаточно изучены. Определение стратегий непосредственного

или опосредованного влияния на эпигенетические механизмы позволит более эффективно контролировать процессы канцерогенеза с целью блокирования опухолевого роста.

Хроматин является сложной и подвижной во времени и пространстве структурой, законы функционирования которой нам до конца не понятны. Действие терапевтических средств, направленных на ремоделирующие комплексы, может распространяться как непосредственно на белковые субъединицы, составляющие комплексы и кодирующие их гены, так и на нкРНК, которые активируют или инактивируют работу этих комплексов и направляют их в районы генов-мишеней. При этом необходимо учитывать, что белки-ремоделлеры могут параллельно осуществлять дополнительные функции, способствующие или препятствующие опухолевому росту. Поэтому направленное воздействие на комплексы ремоделирования и их субъединицы может затрагивать эти дополнительные молекулярные механизмы, способствуя более качественному использованию противоопухолевого потенциала. Еще одна сложность терапевтического влияния на комплексы ремоделирования хроматина при канцерогенезе состоит в их точной направленности на определенный тип клеток, поскольку белки ремоделирования хроматина могут действовать различными путями в разных типах опухолевых клеток, выполняя супрессивную или онкогенную функцию.

Данный обзор посвящен стратегиям воздействия на комплексы ремоделирования хроматина и формирующие их субъединицы, которые уже используются или находятся в фазе клинических испытаний. Применение этих стратегий в клинической практике позволит обеспечить более эффективное влияние на опухолевый рост, что может привести к значительному успеху в лечении онкологических пациентов.

КОМПЛЕКСЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА SWI/SNF И ФОРМИРУЮЩИЕ ИХ СУБЪЕДИНИЦЫ

АТФ-зависимые комплексы ремоделирования хроматина представляют собой группу эпигенетических регуляторов, которые изменяют сборку нуклеосом и регулируют доступность факторов транскрипции к ДНК, что приводит к динамической регуляции экспрессии генов. Они делятся на 4 эволюционно консервативных семейства: SWI/SNF, ISWI, CHD и INO80 [4]. Комплекс ремоделирования хроматина SWI/SNF изменяет доступность хроматина за счет его репозиционирования, удаления нуклеосом или гистоновых димеров. Кроме того, комплекс SWI/SNF контролирует транскрипцию, активируя промоторные/энхансерные области и частично регулируя ацетилирование гистона H3K27 (H3K27ac), который является маркером активно работающих промоторов/энхансеров [5]. Комплексы ISWI и CHD контролируют созревание, сборку и размещение нуклеосом, тогда как INO80 осуществляет удаление и замену гистонов.

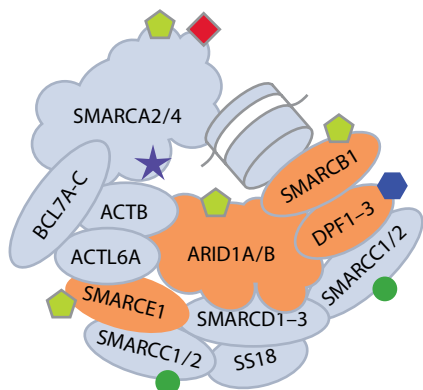
Комплексы ремоделирования хроматина SWI/SNF представлены 3 типами: каноническими сBAF, PBAF, а также неканоническим ncBAF. Все они содержат одинаковые АТФазы (SMARCA2/4), но различаются формирующими их субъединицами и вспомогательными белками, определяющими специфичность связывания с ДНК для каждого комплекса (см. рисунок). У человека в состав комплексов SWI/SNF входят взаимоисключающие АТФазы BRM (SMARCA2) и BRG1 (SMARCA4), которые связываются с белковыми факторами BAF155 (SMARCA1) и BAF170 (SMARCA2), стабилизирующими формирование комплекса, и субъединицей SNF5 (SMARCB1), содержащей неспецифический домен для связывания с ДНК. Вспомогательные субъединицы BAF250a (ARID1A), BAF250b (ARID1B) и BAF200 (ARID2) непосредственно взаимодействуют с ДНК. Белок BAF180 (PBRM1) связывается с ARID2 и формирует полибромассоциированный BAF (PBAF), но при этом не взаимодействует с ARID1A или ARID1B [6].

Комплексы SWI/SNF играют фундаментальную роль в поддержании и регуляции доступа факторов транскрипции к генам-мишеням и проявляют значительную активность, моделирующую опухоль, запуская перепрограммирование клеточных процессов и активируя онкогенные программы. Процесс ремоделирования хроматина как в нормальной, так и в опухолевой клетке является подвижным и многоступенчатым. Сегодня наших знаний о его формировании в норме и при канцерогенезе явно недостаточно, но использование имеющихся данных о последовательных этапах и механизмах, участвующих в этом процессе, позволяет разрабатывать эффективные способы воздействия на них с целью получения новых противоопухолевых препаратов.

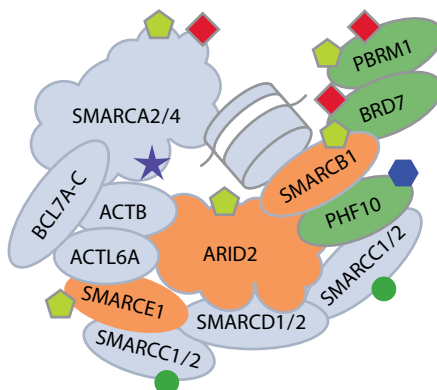
СОМАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ В ГЕНАХ SWI/SNF КОМПЛЕКСА РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА

Большое число белковых субъединиц, формирующих комплекс SWI/SNF, кодируется многочисленными генами, которые часто мутируют в процессе канцерогенеза [8]. Аномалии в генах, кодирующих субъединицы комплексов SWI/SNF, обнаруживаются примерно у 20 % пациентов с различными видами опухолей [6]. При исследовании структуры комплекса BAF человека было показано, что основная часть онкогенных мутаций изменяет те белковые области, которые осуществляют взаимодействие между субъединицами, отвечают за связь с регуляторными белками или взаимодействуют с нуклеосомами, в результате чего активность комплекса по ремоделированию хроматина изменяется [9]. Однако показано, что в генах комплекса SWI/SNF возникают не только мутации потери функции; некоторые из них амплифицируются при определенных видах рака. Распространенность амплификации сильно зависит от типа опухоли и чаще всего встречается при плоскоклеточном раке легкого,

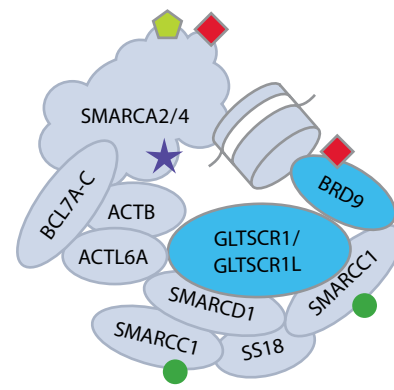
Канонический cBAF / Canonical cBAF



Комплекс PBAF / PBAF complex



Неканонический ncBAF / Non-canonical ncBAF



- ★ АТФазный домен / ATPase domain
- ⬠ ДНК-связывающий домен / DNA-binding domain
- ◆ Бромодомен / Bromodomain
- Хромодомен / Chromodomain
- ⬠ PHD-пальцевой домен / PHD-finger domain

Комплексы ремоделирования хроматина SWI/SNF [7]. Все 3 комплекса имеют центральную аденозинтрифосфатазу (АТФазу) (SMARCA2/4), а также различные общие и уникальные субъединицы, которые содержат определенные белковые домены (АТФазный, ДНК-связывающий, бромодомен, хромодомен, PHD-пальцевой домен). Канонический cBAF содержит ARID1A или ARID1B и DPF1/2/3 в качестве дополнительных субъединиц. Комплекс PBAF включает SMARCA2/4 в качестве АТФазы и ARID2, PBRM1, BRD7 и PHF10 в качестве специфических субъединиц. Неканонический ncBAF содержит BRD9 и GLTSCR1/GLTSCR1L в качестве специфических субъединиц и SMARCA2/4 в качестве АТФазы. Одинаковые белки в комплексах имеют один и тот же цвет, различающиеся белки — разные цвета

SWI/SNF chromatin remodeling complexes [7]. All three complexes have a central adenosine triphosphatase (ATPase) (SMARCA2/4), as well as various common and unique subunits that contain certain protein domains (ATPase, DNA-binding, bromodomain, chromodomain, PHD-finger domain). Canonical cBAF contains ARID1A or RAID 1B and DPF1/2/3 as additional subunits. The PBAF complex contains SMARCA2/4 as an ATPase and ARID2, PBRM1, BRD7 and PHF10 as specific subunits. Non-canonical ncBAF contains BRD9 and GLTSCR1/GLTSCR1L as specific subunits and SMARCA2/4 as ATPase. The same proteins in complexes have the same color; different proteins are colored differently

раке яичников и саркоме. Так, гены неканонического комплекса GBAF *BRD9* и *ACTL6A* продемонстрировали высокую частоту амплификации в различных типах опухолей. Показано, что их гиперэкспрессия связана со снижением выживаемости пациентов, но механизмы, приводящие к этому, до сих пор неизвестны [10].

Соматические делеции гена *SMARCB1*, приводящие к потере нормального аллеля, выявлены в педиатрических рабдоидных опухолях у пациентов с герминальными мутациями *SMARCB1*. Белок, кодируемый этим геном, снимает репрессивные структуры хроматина, позволяя транскрипционным факторам более эффективно получать доступ к генам-мишеням. В последнее время соматические мутации в *SMARCB1* связывают с развитием спорадических множественных менингиом и шванном [11]. Делеции *SMARCB1* в качестве второго события часто находят в недифференцированных желудочно-кишечных карциномах (UGCs), которые отличаются широким спектром морфологических проявлений: от «рабдоидных» признаков до аденокарциномы низкодифференцированной формы. Недавно было обнаружено, что и другие гены в комплексе SWI/SNF, включая *SMARCA4* и *SMARCA2*, участвуют в молекулярных механизмах, приводящих к развитию этого типа опухолей [12]. Часто такие новообразования характеризуются наличием микросателлитной нестабильности и мутациями генов репарации неспаренных оснований (mismatch repair genes, MMR) [13]. Инактивирующие мутации в гене *SMARCA4*

(*BRG1*), приводящие к потере функции одной из двух АТФаз комплекса SWI/SNF, выявляют примерно в 90 % случаев мелкоклеточной карциномы яичника гиперкальциемического типа [14].

Мутации *PBRM1* определены в 40 % случаев карциномы почек [15]. Известно, что *PBRM1* действует как ген-супрессор при канцерогенезе почек; его инактивация играет критическую роль в развитии и прогрессировании светлоклеточной карциномы почки (скПКР). Потеря экспрессии *Vhl* и *Pbrm1* в почках мыши приводит к развитию светлоклеточных карцином [16]. Частота соматических мутаций *PBRM1* при скПКР у человека, по данным COSMIC и Атласа генома рака (The Cancer Genome Atlas, TCGA), уступает лишь гену *VHL*. Полагают, что измененные гены *PBRM1* и *VHL* совместно участвуют в канцерогенезе почки, и снижение их экспрессии ассоциировано с повышенной агрессивностью опухоли [17]. Исследования, в которых участвовали больные скПКР, показали, что биаллельная потеря *PBRM1* связана с лучшим ответом на лечение анти-PD-1- или анти-PD-L1-препаратами (PD-1 — рецептор программируемой клеточной гибели 1; PD-L1 — лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1) при скПКР, независимо от мутационной нагрузки опухоли [18]. Мутации в *PBRM1*, *ARID2* и в других компонентах SWI/SNF чаще встречаются у пациентов с полным или частичным ответом на лечение ингибиторами контрольных точек по сравнению с пациентами, которые не отвечают на

терапию [19]. Возможно, эффективное использование иммунотерапии при скПКР связано с инактивацией генов эпигенетической регуляции, участвующих в ремоделировании хроматина, но их роль в формировании иммунного микроокружения опухоли остается неясной и противоречивой [20].

Ген *ARID1A* кодирует один из ключевых компонентов комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF. Изменения *ARID1A* выявлены в различных типах опухолей: в 45 % случаев светлоклеточного рака яичников, в 37 % – рака эндометрия, в 20–30 % – рака желудка, в 20 % – рака мочевого пузыря, в 14 % – гепатоцеллюлярного рака, в 12 % – меланом, в 9 % – колоректального рака, в 8 % – рака легкого, в 4 % – рака поджелудочной железы и в 3 % – рака молочной железы [21]. Исследования соматических мутаций в опухолях желудка, проведенные с помощью высокопроизводительного параллельного секвенирования (next generation sequencing, NGS), показали, что до 47 % случаев аденокарцином желудка имеют мутации хроматин-ремоделирующих генов, причем соматические мутации *ARID1A* отличались наибольшей частотой [22]. Дефицит *ARID1A* в опухолях также часто коррелирует с наличием микросателлитной нестабильности. Соматические мутации в *ARID1A* являются ключевым событием для опухолей желудка с микросателлитной нестабильностью и часто определяются в опухолях, связанных с EBV-инфекцией (EBV – вирус Эпштейна–Барр). Клинически потеря экспрессии *ARID1A* коррелирует с более крупными размерами опухоли, более глубокой инвазией, метастазами в лимфатические узлы и плохим прогнозом [23]. Как и другие опухоли с нарушением функции белков комплексов ремоделирования хроматина, карциномы желудка, имеющие мутации *ARID1A*, характеризуются более интенсивной экспрессией PD-L1, способствуя более активному ответу на иммунотерапию и лучшей выживаемости пациентов. Поэтому мутации *ARID1A* могут служить биомаркером чувствительности к иммунотерапии у больных раком желудочно-кишечного тракта [24]. Связь соматических мутаций в генах *ARID1A*, *PBRM1* и *SMARCB1* с микросателлитной нестабильностью позволяет предположить наличие в мутантных опухолях проблемы с системами репарации ДНК. Нарушение механизмов репарации ДНК приводит к накоплению соматических мутаций в опухоли и увеличению мутационной нагрузки, поэтому эффективное использование терапии ингибиторами контрольных точек опосредованно связано с нарушением функции генов-ремоделлеров хроматина.

СТРАТЕГИИ ТАРГЕТИРОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ СУБЪЕДИНИЦ КОМПЛЕКСА РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА SWI/SNF И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ

Одной из стратегий воздействия на эпигенетические регуляторы, связанные с хроматином, является

дополнительное блокирование белков ремоделирующего комплекса в опухолевой ткани, чтобы вызвать искусственную летальность опухолевых клеток. Ингибирование роста рабдоидных опухолей с дефицитом SNF5 (*SMARCB1*), полученное с помощью нокдауна BRG1 (*SMARCA4*) каталитической субъединицы SWI/SNF, позволяет предположить, что выживание опухолевых клеток, дефицитных по *SMARCB1*, может зависеть от остаточной активности комплекса SWI/SNF. Это подтверждается существованием взаимоисключающих субъединиц, входящих в состав SWI/SNF [25]. Исходя из того, что белки *ARID1A* и *ARID1B* в комплексе SWI/SNF являются взаимоисключающими, выживание опухолевых клеток с мутациями *ARID1A* может зависеть от присутствия *ARID1B* в остаточном комплексе SWI/SNF.

Такой же механизм работает и для BRM (*SMARCA2*) и BRG1 (*SMARCA4*), поскольку они формируют взаимоисключающие комплексы. Выживаемость *SMARCA2*-мутантных клеток может зависеть от остаточной активности *SMARCA4*-содержащего комплекса, и наоборот, нокдаун BRM (*SMARCA2*) избирательно подавляет рост BRG1-дефицитных клеток. Таким образом, появляется возможность нацеливания на остаточный комплекс SWI/SNF путем блокирования белков различных субъединиц для достижения противоопухолевого эффекта [26].

Другая стратегия получения синтетической летальности опухолевых клеток заключается в нацеливании на репрессивный комплекс поликомб (PRC2), роль которого противоположна комплексу SWI/SNF. PRC2 содержит гистоновую метилтрансферазу, которая накладывает репрессивную метку, триметилируя лизин в 27-м положении гистона H3 (H3K27me3), и таким образом приводит к формированию неактивной конформации хроматина. Ингибирование EZH2 – каталитической субъединицы PRC2 – предложено в качестве мишени для синтетической летальности опухолей с мутациями генов комплекса SWI/SNF [27]. При исследовании 5 химических ингибиторов EZH2 на культурах клеток, мутантных по *PBRM1*, было выявлено соединение L501–1669, которое избирательно ингибировало пролиферацию клеток с дефицитом *PBRM1* и подавляло триметилирование гистона H3 по 27-му лизину (H3K27me3). При этом было отмечено усиление апоптотической активности в клетках, дефицитных по *PBRM1*, что способствовало их летальности [28].

Показано также, что ингибиторы EZH2 могут снижать жизнеспособность *ARID1A*-дефицитных клеток дозозависимым образом у пациентов с раком желудка. Подтверждение селективной чувствительности к *ARID1A*-дефицитным клеткам в системе *in vitro* позволяет предположить потенциальную эффективность таргетной терапии ингибиторами EZH2 опухолей с соматическими мутациями *ARID1A* [29].

Наряду с ремоделированием хроматина субъединицы комплекса SWI/SNF *ARID1A*, *ARID1B* и *ARID2*

активно участвуют в процессах репарации поврежденного ДНК, двухцепочечных разрывов (DSB) и негомологичного соединения концов (NHEJ) [8]. Мутации *ARID1A* препятствуют восстановлению повреждений ДНК несколькими способами. Белок *ARID1A* требуется для установления открытого хроматина при повреждении ДНК, который необходим для нормального функционирования механизма NHEJ. Неспособность *ARID1A*-мутантных клеток к репарации NHEJ приводит к развитию частичной цитотоксической реакции при облучении клеток. Использование у модельных мышей, дефицитных по *ARID1A*, облучения в сочетании с *PARP*-ингибиторами действует синергетически, усиливая цитотоксичность в *ARID1A*-негативных опухолевых клетках [30]. Также субъединицы комплексов *SWI/SNF* участвуют в репарации повреждений ДНК, располагаясь в местах двухцепочечных разрывов ДНК, и облегчают фосфорилирование гистона H2AX через *ATM/ATR* [31]. Поэтому опухоли, имеющие мутации в генах комплекса *SWI/SNF*, чувствительны к лечению химиотерапевтическими препаратами, способствующими повреждению ДНК. Опухоли с дефицитом *ARID1A* имеют сниженную способность к репарации, что при лечении ингибиторами *PARP* усиливает противоопухолевый эффект в моделях как *in vitro*, так и *in vivo* [32].

Показано, что дефекты в *PBAF*-специфической субъединице (*PBRM1*) также способствуют синтетической летальности опухолевых клеток при использовании ингибиторов *PARP*. Механизм этой чувствительности связан с накоплением R-петель и репликативным стрессом, возникающим при делении клеток. R-петли — трехцепочечные структуры нуклеиновых кислот — возникают в процессе репликации и транскрипции, когда РНК взаимодействует с двухцепочечной ДНК в структуре хроматина, образуя гибриды РНК:ДНК. Их накопление также связано с повышенным уровнем повреждения ДНК, особенно в условиях репликативного стресса. При этом стрессе возникают остановки репликативной вилки вследствие накопления одноцепочечных разрывов (*SSB*) и появления аномальных структур (сшивок или модифицированных оснований) на участках ДНК, где происходит репликация. В опухолевых клетках с дефицитом *PBRM1* отмечена более высокая нагрузка на R-петли, что усиливает репликативный стресс и повреждение ДНК. Воздействие ингибиторов *PARP* при наличии дефекта *PBRM1* дополнительно усугубляет репликативный стресс, способствуя накоплению повреждений ДНК и образованию микроядер, что приводит к летальности опухолевых клеток [33].

Поскольку *PARP1/2* представляют собой ферменты, облегчающие репарацию *SSB*, эксцизионную репарацию оснований и гомологичную рекомбинацию, их дополнительная инактивация в опухолевых клетках позволяет эффективно блокировать репарационные механизмы, дополнительно к дефектам репарации, возникающей

из-за мутаций в субъединицах хроматин-ремоделирующих комплексов, и способствуют развитию синтетической летальности опухолевых клеток [34].

Еще одним механизмом, в котором участвуют гены комплекса *SWI/SNF*, является модулирование репарации неспаренных оснований ДНК (*MMR*), что напрямую связано с усилением мутационной нагрузки и микросателлитной нестабильности. *ARID1A* взаимодействует с белком *MMR MSH2*, функционально регулирует его присутствие в местах несовпадения оснований ДНК и, не влияя на его экспрессию, приводит к усилению мутационной нагрузки и последующей иммуногенности. Кроме того, субъединицы комплекса регулируют экспрессию генов, чувствительных к интерферону (*IFN*-чувствительных генов), ограничивая хроматиновую доступность комплекса *EZH2* и *PRC2* для генов, реагирующих на *IFN* [35]. Аберрации *ARID1A* ослабляют экспрессию *IFN*-зависимых генов и экспрессию хемокинов Th1-типа (*CXCL9* и *CXCL10*), а *SNF5 (SMARCB1)* и *BRG1 (SMARCA4)* модулируют экспрессию *IFN*-чувствительных генов через взаимодействие с белками *MYC* и *MAX* соответственно, блокируя их ингибирующую функцию в отношении генов, чувствительных к *IFN*. *SNF5* напрямую взаимодействует с *MYC* через *MYC HLH-LZ* и *SNF5 Rpt*-мотивы, а *BRG1* регулирует *MAX* — функционального партнера *MYC* [35]. Эти механизмы демонстрируют важность использования мутационного статуса *ARID1A*, *SMARCB1* и *SMARCA4* в качестве маркера микросателлитной нестабильности и чувствительности к терапии ингибиторами контрольных точек. Сегодня до конца не ясны все механизмы, посредством которых комплексы ремоделирования хроматина влияют на противоопухолевый иммунитет, но известно, что потеря *PBRM1* и *ARID2* приводит к усилению экспрессии генов, которые играют роль в передаче сигналов интерферона γ (*IFN-\gamma*), что может усиливать ответ на иммунотерапию [36]. Это связано с тем, что гиперэкспрессия *IFN-\gamma* активирует Янускиназу (*JAK*) и активатор транскрипции (*STAT*), которые передают сигналы, влияющие на все аспекты иммунной системы, в том числе запускают экспрессию *PD-L1* [37]. Кроме того, известно, что *SMARCB1*-мутантные рабдоидные опухоли обнаруживают инфильтрацию субпопуляциями Т-клеток, что свидетельствует об опухолеспецифическом иммунном ответе [38]. Недостаток *ARID1A* при его взаимодействии с *MSH2* — белком *MMR* — способствует увеличению опухолевой мутационной нагрузки с последующей активацией противоопухолевого иммунитета [39].

Также было выявлено, что комплексы *SWI/SNF* и *PRC2* непосредственно участвуют в контроле транскрипции *PD-L1*. При этом *BRM*-содержащий комплекс *SWI/SNF* может действовать как репрессор транскрипции локуса *PD-L1*, а *BRG1*-содержащий *SWI/SNF* и *PRC2* — совместно активировать экспрессию *PD-L1*. При мутациях и потере *PBRM1* оставшийся

комплекс BRG1 взаимодействует с PRC2, приводит к изменениям плотности хроматина и изменению позиции репрессивной метки H3K23me₃, хотя механизм, стоящий за этим, остается неясным. Таким образом, таргетные эпигенетические лекарства, ингибирующие EZH2, могут быть использованы в качестве иммуномодуляторов при лечении рака [40].

В настоящее время исследуется эффективность некоторых ингибиторов иммунных контрольных точек – ниволумаба, полностью человеческого антитела IgG4 к PD-1, пембролизумаба (МК-3475 или ламбролизумаба), высокоаффинного гуманизированного моноклонального антитела IgG4, нацеленного на PD-1, и MPDL3280A, сконструированного антитела IgG против PD-L1, – в лечении пациентов, имеющих повреждение компонентов SWI/SNF [41].

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ, НЕПОСРЕДСТВЕННО ВЛИЯЮЩИЕ НА КОМПЛЕКСЫ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА

Кроме подходов, опосредованно влияющих на комплексы ремоделирования хроматина и их дополнительные функции, сегодня активно исследуются химические и фармакологические агенты, которые могут непосредственно блокировать комплексы и их субъединицы. Разработка эффективных химических зондов прямого нацеливания на компоненты SWI/SNF с целью усиления синтетической летальности напрямую зависит от наличия определенных районов в молекуле белка, которые можно использовать для взаимодействия с химическими соединениями. Поэтому создание целевых лекарств для лечения онкологических пациентов сегодня в основном сосредоточено на субъединицах, имеющих АТФазные домены и содержащих бромодомены. Среди белков, составляющих комплекс, SMARCA2/4 содержат бромодомен и АТФазный домен, BRD7 и BRD9 – бромодомены, а PBRM1 имеет 6 tandemно действующих PBI-бромодоменов, что делает эти белки возможными мишенями для непосредственной инактивации комплекса. Бромодомены представляют собой высококонсервативные модули белок-белкового взаимодействия, которые распознают ацетилированные лизины на гистоновых хвостах, способствуя экспрессии генов-мишеней. Взаимодействие с ацетилированными лизинами происходит через специфический карман, который можно использовать для связывания с химическим ингибитором [42]. Бромодомены генов *BRD7/9*, *SMARCA2/4* и *PBI* считывают метки ацетилирования гистонов H3K14ac, H3K27ac или H3K9ac, тем самым рекрутируя комплексы ремоделирования хроматина SWI/SNF в районы генов-мишеней и активируя их экспрессию [7]. Хотя они и являются оптимальными мишенями для инактивации специфических субъединиц SWI/SNF, бромодомены идентифицированы во многих белках человека и не всегда связаны с ремоделированием хроматина. Использовать ингибиторы

бромодоменов для лечения опухолей было предложено довольно давно, и некоторые из них уже находятся на I–II стадиях клинических испытаний, но их применение в качестве специфических ингибиторов комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF не получило широкого распространения, поскольку специфические ингибиторы бромодомена не продемонстрировали способность индуцировать синтетическую летальность. Экспериментально было показано, что ингибиторы бромодомена не обладают специфичностью и имеют недостаточное значение для инактивации комплекса по сравнению с ингибиторами АТФазного домена [43].

При определении кристаллической структуры АТФазного домена SMARCA2 человека был обнаружен аллостерический карман, расположенный вблизи сайта связывания АТФ и пригодный для связывания химических соединений [44]. С использованием этого кармана для связывания был проведен скрининг химических соединений, который выявил несколько двойных низкомолекулярных ингибиторов BRM/BRG1, подавляющих BRM-зависимую экспрессию генов и проявляющих противоопухолевую активность в модели ксенотрансплантата рака легкого с мутацией *BRG1* при пероральном введении [44]. При оценке двойных ингибиторов АТФаз BRG1/BRM на разнообразных линиях опухолевых клеток обнаружено, что наибольшую чувствительность к их действию показали линии гемопоэтических клеток. При исследовании экспрессии генов и доступности хроматина в клетках острого миелоидного лейкоза было показано, что двойные ингибиторы направленно воздействуют на геномные локусы, связанные с онкогенными факторами транскрипции, подавляя гены, активированные в лейкозных клетках, включая *MYC*, который является мишенью для действия BRG1 при данной патологии [45].

Чтобы таргетировать комплекс SWI/SNF, играющий решающую роль в ремоделировании хроматина, использовали еще одну стратегию. Недавно разработали деструктор (PROTAC) AU-15330, который расщепляет субъединицы АТФазы SWI/SNF, SMARCA2 и SMARCA4 [46]. Высокоспецифичный и VHL-зависимый ингибитор компонентов АТФазы SWI/SNF (SMARCA2, SMARCA4 и PBRM1) проявляет цитотоксичность в опухоли при низких концентрациях. Показано, что полная инактивация АТФаз SWI/SNF индуцирует целенаправленную и быструю потерю доступности хроматина к генам *AR*, *FOXA1*, *MYC* и *ERG*, ослабляя их транскрипцию, а также транскрипцию связанных с ними генов и подавляя связанную с энхансером гиперэкспрессию драйверных онкогенов. Эти результаты подтверждают, что для сохранения энхансеров в открытой, свободной от нуклеосом конформации необходима постоянная активность комплекса ремоделирования SWI/SNF. Лечение деструктором SMARCA2/4 индуцировало значительное

ингибирование опухолевого роста в моделях ксенотрансплантатов, полученных из клеточных линий множественной миеломы и рака предстательной железы. При этом при длительном лечении деструктором SMARCA2/4 у мышей не наблюдалось выраженной токсичности, включая отсутствие тромбоцитопении, истощения бокаловидных клеток желудочно-кишечного тракта или дегенерации зародышевых клеток [47, 48].

Кроме непосредственного таргетирования комплекса SWI/SNF для противоопухолевого эффекта можно использовать дополнительные подходы и стратегии воздействия. Поскольку для достижения определенного эффекта в регуляции экспрессии необходимо участие нескольких эпигенетических механизмов, активация других эпигенетических механизмов может влиять на ремоделирование хроматина. Новые данные указывают, что такие эпигенетические ферменты, как лизин-специфическая деметилаза (LSD1), могут индуцировать противоопухолевый иммунный ответ при инактивации SWI/SNF. LSD1 демонстрирует высокий уровень экспрессии в SWI/SNF-мутантных опухолях яичника (мелкоклеточной карциномы яичника гиперкальциемического типа), а ингибирование ее активности вызывает противоопухолевый эффект в сочетании с блокадой иммунных контрольных точек [49]. Эти данные свидетельствуют о возможном потенциале использования лизин-специфической деметилазы 1 в качестве мишени при комбинированной иммунотерапии SWI/SNF-мутированных опухолей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время стало возможным использование эпигенетических механизмов в качестве мишеней для создания противоопухолевых препаратов и стратегий терапевтического воздействия на рост опухоли. В поисках эффективных методов лечения новообразований исследуют все известные эпигенетические механизмы: метилирование/деметиляция ДНК, химическую модификацию гистоновых белков (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и др.), влияние нкРНК, а также ремоделирование хроматина. Некоторые соединения сегодня уже одобрены в качестве терапевтических агентов для различных типов опухолей или находятся в стадии клинических испытаний. Это препараты, воздействующие на метилирование/деметиляцию ДНК (азациитидин, децитабин, зебуларин и др.) и химическую модифика-

цию гистоновых белков (ингибиторы гистоновых деацетилаз и гистоновых метилтрансфераз и др.) [50]. Комплексы ремоделирования хроматина, включая комплекс SWI/SNF, являются заманчивой мишенью для противоопухолевого воздействия, поскольку имеют высокую частоту мутаций в своих белковых субъединицах примерно в 20–25 % опухолей различного типа.

Результаты проведенных исследований подтверждают, что любая клетка (нормальная или опухолевая) зависит от поддержания определенной хроматиновой конформации, а при блокировке функции, регулирующей состояние хроматина, однозначно погибает. Недостаточно ясен механизм формирования состояния хроматина, который необходим на определенный момент времени и для определенного типа клеток, но были достигнуты некоторые успехи в изучении его составляющих: так, были найдены способы использования этих процессов для влияния на жизнеспособность опухолевых клеток. Как известно, регуляция состояния хроматина невозможна без некодирующих транскриптов (днРНК, микроРНК и др.); их роль в осуществлении этого сложного процесса сегодня активно изучается. Уже разрабатываются и исследуются фармакологические агенты, способные блокировать роль данных посредников и регуляторов в формировании структуры хроматина и экспрессии генов.

Фармакологические агенты, которые сегодня предложены для воздействия на процессы ремоделирования хроматина, используют различные стратегии и механизмы для получения противоопухолевого эффекта: от применения ингибиторов бромодоменов отдельных субъединиц комплекса до прямого воздействия на функцию SWI/SNF путем разрушения его основной субъединицы. Пока не удалось предложить контролируемую стратегию изменения состояния хроматина, но стратегия воздействия на процессы жизнедеятельности опухолевых клеток активно исследуется в различных фазах клинических испытаний. И хотя использование антиэпигенетических средств в виде монотерапии не всегда приводит к успеху, комбинированное воздействие на эпигенетические механизмы в сочетании с дополнительной химио-, иммуно- или таргетной терапией позволяет добиться хороших результатов как в экспериментах на моделях клеток и животных, так и при лечении пациентов.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;128(4):693–705. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.005
- Patty B.J., Hainer S.J. Non-coding RNAs and nucleosome remodeling complexes: an intricate regulatory relationship. *Biology* 2020;9(8):213. DOI: 10.3390/biology9080213
- Sharma T. Cancer epigenetics: chromatin remodeling and other epigenetic mechanisms. In: *Understanding cancer*. Elsevier, 2022. Pp. 149–58.
- Clapier C.R., Iwasa J., Cairns B.R. et al. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18(7):407–22. DOI: 10.1038/nrm.2017.26
- Krishnamurthy N., Kato S., Lippman S. et al. Chromatin remodeling (SWI/SNF) complexes, cancer, and response to immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2022;10:e004669. DOI:10.1136/jitc-2022-004669
- Mullen J., Kato S., Sicklick J.K. et al. Targeting ARID1A mutations in cancer. *Cancer Treat Rev* 2021;100:102287. DOI: 10.1016/j.ctrv.2021.102287
- Wanior M., Krämer A., Knapp S. et al. Exploiting vulnerabilities of SWI/SNF chromatin remodelling complexes for cancer therapy. *Oncogene* 2021;40(21):3637–54. DOI: 10.1038/s41388-021-01781-x
- Mathur R. ARID1A loss in cancer: Towards a mechanistic understanding. *Pharmacol Ther* 2018;190:15–23. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.05.001
- Mashtalir N., Suzuki H., Farrell D.P. et al. A Structural model of the endogenous human BAF complex informs disease mechanisms. *Cell* 2020;183(3):802–17.e24. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.051
- Sima X., He J., Peng J. et al. The genetic alteration spectrum of the SWI/SNF complex: the oncogenic roles of BRD9 and ACTL6A. *PLoS One* 2019;14(9):e0222305. DOI: 10.1371/journal.pone.0222305
- Torres-Martin M., Kusak M.E., Isla A. et al. Whole exome sequencing in a case of sporadic multiple meningioma reveals shared NF2, FAM109B, and TPRXL mutations, together with unique SMARCB1 alterations in a subset of tumor nodules. *Cancer Genet* 2015;208(6):327–32. DOI: 10.1016/j.cancergen.2015.03.012
- Tokunaga R., Xiu J., Goldberg R.M. et al. The impact of ARID1A mutation on molecular characteristics in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2020;140:119–29. DOI: 10.1016/j.ejca.2020.09.006
- Ahadi M.S., Fuchs T.L., Clarkson A. et al. Switch/sucrose-non-fermentable (SWI/SNF) complex (SMARCA4, SMARCA2, INI1/SMARCB1)-deficient colorectal carcinomas are strongly associated with microsatellite instability: an incidence study in 4508 colorectal carcinomas. *Histopathology* 2022;80(6):906–21. DOI: 10.1111/his.14612
- Clarke B.A., Witkowski L., Ton Nu T.N. et al. Loss of SMARCA4 (BRG1) protein expression as determined by immunohistochemistry in small-cell carcinoma of the ovary, hypercalcaemic type distinguishes these tumours from their mimics. *Histopathology* 2016;69(5):727–38. DOI: 10.1111/his.12988
- Wang J., Xi Z., Xi J. et al. Somatic mutations in renal cell carcinomas from Chinese patients revealed by whole exome sequencing. *Cancer Cell Int* 2018;18:159. DOI: 10.1186/s12935-018-0661-5
- Nargund A.M., Pham C.G., Dong Y. et al. The SWI/SNF protein PBRM1 restrains VHL-loss-driven clear cell renal cell carcinoma. *Cell Rep* 2017;18(12):2893–906. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.02.074
- Högner A., Krause H., Jandrig B. et al. PBRM1 and VHL expression correlate in human clear cell renal cell carcinoma with differential association with patient's overall survival. *Urol Oncol* 2018;36(3):94.e1–14. DOI: 10.1016/j.urolonc.2017.10.027
- Braun D.A., Hou Y., Bakouny Z. et al. Interplay of somatic alterations and immune infiltration modulates response to PD-1 blockade in advanced clear cell renal cell carcinoma. *Nat Med* 2020;26(6):909–18. DOI: 10.1038/s41591-020-0839-y
- Miao D., Margolis C.A., Gao W. et al. Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma. *Science* 2018;359(6377):801–6. DOI: 10.1126/science.aan5951
- Liu X.-D., Kong W., Peterson C.B. et al. PBRM1 loss defines a nonimmunogenic tumor phenotype associated with checkpoint inhibitor resistance in renal carcinoma. *Nat Commun* 2020;11(1):2135. DOI: 10.1038/s41467-020-15959-6
- Wu J.N., Roberts C.W.M. ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor? *Cancer Discov* 2013;3(1):35–43. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0361
- Nemtsova M.V., Kalinkin A.I., Kuznetsova E.B. et al. Mutations in epigenetic regulation genes in gastric cancer. *Cancers* 2021;13(18):4586. DOI: 10.3390/cancers13184586
- Yamamoto H., Watanabe Y., Maehata T. et al. An updated review of gastric cancer in the next-generation sequencing era: insights from bench to bedside and vice versa. *World J Gastroenterol* 2014;20(14):3927–37. DOI: 10.3748/wjg.v20.i14.3927
- Li L., Li M., Jiang Z. et al. ARID1A Mutations are associated with increased immune activity in gastrointestinal cancer. *Cells* 2019;8(7):678. DOI: 10.3390/cells8070678
- Moe K.C., Maxwell J.N., Wang J. et al. The SWI/SNF ATPase BRG1 facilitates multiple pro-tumorigenic gene expression programs in SMARCB1-deficient cancer cells. *Oncogenesis* 2022;11(1):30. DOI: 10.1038/s41389-022-00406-6
- Oike T., Ogiwara H., Tominaga Y. et al. A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. *Cancer Res* 2013;73(17):5508–18. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4593
- Bitler B.G., Aird K.M., Zhang R. Epigenetic synthetic lethality in ovarian clear cell carcinoma: EZH2 and ARID1A mutations. *Mol Cell Oncol* 2016;3(1):e1032476. DOI: 10.1080/23723556.2015.1032476
- Huang K., Sun R., Chen J. et al. A novel EZH2 inhibitor induces synthetic lethality and apoptosis in PBRM1-deficient cancer cells. *Cell Cycle* 2020;19(7):758–71. DOI: 10.1080/15384101.2020.1729450
- Yamada L., Saito M., Thar Min A.K. et al. Selective sensitivity of EZH2 inhibitors based on synthetic lethality in ARID1A-deficient gastric cancer. *Gastric Cancer* 2021;24(1):60–71. DOI: 10.1007/s10120-020-01094-0
- Park Y., Chui M.H., Suryo Rahmanto Y. et al. Loss of ARID1A in tumor cells renders selective vulnerability to combined ionizing radiation and PARP inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* 2019;25(18):5584–94. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4222
- Park J.-H., Park E.-J., Lee H.-S. et al. Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA double-strand break repair by promoting γ -H2AX induction. *EMBO J* 2006;25(17):3986–97. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601291
- Shen J., Peng Y., Wei L. et al. ARID1A deficiency impairs the DNA damage checkpoint and sensitizes cells to PARP inhibitors. *Cancer Discov* 2015;5(7):752–67. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0849
- Chabanon R.M., Morel D., Eychenne T. et al. PBRM1 deficiency confers synthetic lethality to DNA repair inhibitors in cancer. *Cancer Res* 2021;81(11):2888–902. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0628
- Tsuda M., Fukuda A., Kawai M. et al. The role of the SWI/SNF chromatin remodeling complex in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2021;112(2):490–7. DOI: 10.1111/cas.14768
- Zhou M., Yuan J., Deng Y. et al. Emerging role of SWI/SNF complex deficiency as a target of immune checkpoint blockade

- in human cancers. *Oncogenesis* 2021;10(1):3. DOI: 10.1038/s41389-020-00296-6
36. Pan D., Kobayashi A., Jiang P. et al. A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell-mediated killing. *Science* 2018;359(6377):770–5. DOI: 10.1126/science.aao1710
 37. Villarino A.V., Kanno Y., O’Shea J.J. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol* 2017;18(4):374–84. DOI: 10.1038/ni.3691
 38. Leruste A., Tosello J., Ramos R.N. et al. Clonally expanded T cells reveal immunogenicity of rhabdoid tumors. *Cancer Cell* 2019;36(6):597–612.e8. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.10.008
 39. Shen J., Ju Z., Zhao W. et al. ARID1A deficiency promotes mutability and potentiates therapeutic antitumor immunity unleashed by immune checkpoint blockade. *Nat Med* 2018;24(5):556–62. DOI: 10.1038/s41591-018-0012-z
 40. Jancewicz I., Szarkowska J., Konopinski R. et al. PD-L1 Overexpression, SWI/SNF Complex deregulation, and profound transcriptomic changes characterize cancer-dependent exhaustion of persistently activated CD4+ T Cells. *Cancers* 2021;13(16):4148. DOI: 10.3390/cancers13164148
 41. Carbognin L., Pilotto S., Milella M. et al. Differential activity of nivolumab, pembrolizumab and MPDL3280A according to the tumor expression of programmed death-ligand-1 (PD-L1): sensitivity analysis of trials in melanoma, lung and genitourinary cancers. *PLoS One* 2015;10(6):e0130142. DOI: 10.1371/journal.pone.0130142
 42. Cochran A.G., Conery A.R., Sims R.J. Bromodomains: a new target class for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2019;18(8):609–28. DOI: 10.1038/s41573-019-0030-7
 43. Vangamudi B., Paul T.A., Shah P.K. et al. The SMARCA2/4 ATPase domain surpasses the bromodomain as a drug target in SWI/SNF-mutant cancers: insights from cDNA rescue and PFI-3 inhibitor studies. *Cancer Res* 2015;75(18):3865–78. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3798
 44. Papillon J.P.N., Nakajima K., Adair C.D. et al. Discovery of orally active inhibitors of brahma homolog (BRM)/SMARCA2 ATPase activity for the treatment of brahma related gene 1 (BRG1)/SMARCA4-mutant cancers. *J Med Chem* 2018;61(22):10155–72. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01318
 45. Rago F., Rodrigues L.U., Bonney M. et al. Exquisite sensitivity to dual BRG1/BRM ATPase inhibitors reveals broad SWI/SNF dependencies in acute myeloid leukemia. *Mol Cancer Res* 2022;20(3):361–72. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-21-0390
 46. Xiao L., Parolia A., Qiao Y. et al. Targeting SWI/SNF ATPases in enhancer-addicted prostate cancer. *Nature* 2022;601(7893):434–9. DOI: 10.1038/s41586-021-04246-z
 47. Schick S., Grosche S., Kohl K.E. et al. Acute BAF perturbation causes immediate changes in chromatin accessibility. *Nat Genet* 2021;53(3):269–78. DOI: 10.1038/s41588-021-00777-3
 48. Iurlaro M., Stadler M.B., Masoni F. et al. Mammalian SWI/SNF continuously restores local accessibility to chromatin. *Nat Genet* 2021;53(3):279–87. DOI: 10.1038/s41588-020-00768-w
 49. Soldi R., Ghosh Halder T., Weston A. et al. The novel reversible LSD1 inhibitor SP-2577 promotes anti-tumor immunity in SWItch/Sucrose-NonFermentable (SWI/SNF) complex mutated ovarian cancer. *PLoS One* 2020;15(7):e0235705. DOI: 10.1371/journal.pone.0235705
 50. Patnaik S., Anupriya. Drugs targeting epigenetic modifications and plausible therapeutic strategies against colorectal cancer. *Front Pharmacol* 2019;10:588. DOI: 10.3389/fphar.2019.00588

Вклад авторов

М.В. Немцова, И.В. Буре: обзор литературы по теме статьи, написание текста статьи, редактирование.

Authors' contributions

M.V. Nemtsova, I.V. Bure: literature review on the topic of the article, article writing, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.В. Немцова / M.V. Nemtsova: <https://orcid.org/0000-0002-2835-5992>

И.В. Буре / I.V. Bure: <https://orcid.org/0000-0003-2043-5848>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interests.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-75-10117).

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (project Ref. No. 20-75-10117).

Статья поступила: 13.01.2023. **Принята к публикации:** 07.02.2023.

Article submitted: 13.01.2023. **Accepted for publication:** 07.02.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-18-24



Ассоциация рака молочной железы с онкогенными папилломавирусами: аргументы за и против

Г.М. Волгарева*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24***Контакты:** Галина Михайловна Волгарева galina.volgareva@ronc.ru

Возможная ассоциация рака молочной железы (РМЖ) с онкогенными вирусами папилломы человека (ВПЧ) остается предметом дискуссий. В подавляющем большинстве исследований, посвященных данной проблеме, ДНК этих вирусов обнаружена во многих образцах РМЖ, что служит главным аргументом в пользу их причастности к развитию данной формы рака. Основное возражение против этой точки зрения – то, что количество геномов ВПЧ, приходящихся на одну опухолевую клетку в ВПЧ-положительном РМЖ, на несколько порядков уступает аналогичному показателю для рака шейки матки. Актуальность вопроса о возможной ассоциации РМЖ с онкогенными ВПЧ возрастает в условиях, когда созданы эффективные профилактические вакцины против ВПЧ-инфекции. Прояснению этого вопроса способствуют данные, подтверждающие или опровергающие активность генома онкогенных папилломавирусов в ДНК ВПЧ-положительном РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, онкогенные вирусы папилломы человека, активность вирусного генома**Для цитирования:** Волгарева Г.М. Ассоциация рака молочной железы с онкогенными папилломавирусами: аргументы за и против. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(1):18–24. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-18-24

Breast cancer association with oncogenic papillomaviruses: arguments pro and con

G.M. Volgareva*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia***Contacts:** Galina Mikhailovna Volgareva galina.volgareva@ronc.ru

Possible breast cancer (BC) association with oncogenic human papilloma viruses (HPV) remains subject for discussion. DNA of these viruses was found in numerous BC samples in predominant majority of researches into the problem, that being the main argument in favour of their involvement into genesis of the given tumor. The principal objection to the opinion is that the HPV genomes number per a single cancer cell in HPV-positive BC is several orders of magnitude inferior to the similar indicator for cervical cancer. Urgency of the issue of possible BC association with oncogenic HPVs increases under the development of effective preventive vaccines against HPV infection. To clarify this matter the data might help either confirming or disproving the oncogenic HPV genome activity in DNA HPV-positive BC.

Keywords: breast cancer, oncogenic human papilloma viruses, viral genome activity**For citation:** Volgareva G.M. Breast cancer association with oncogenic papillomaviruses: arguments pro and con. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):18–24. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-18-24

ВВЕДЕНИЕ

Рейтинг ведущих онкологических заболеваний в настоящее время претерпевает изменения: происходит смена «лидера». По данным Международного агентства по изучению рака (МАИР) (International Agency for Research on Cancer, IARC), заболеваемость раком молочной железы (РМЖ) превосходит заболеваемость раком легкого (РЛ) [1, 2]. Так, заболеваемость РМЖ

в США в период с 2014 по 2018 г. ежегодно возрастала на 0,5 %, тогда как выявление случаев РЛ на запущенных стадиях в тот же период резко снизилось; сходные тенденции демонстрировали и показатели смертности от РМЖ и РЛ [2]. Причину специалисты видят в резком изменении образа жизни и окружающей среды, что привело к увеличению распространенности факторов риска РМЖ; при этом у РМЖ отсутствует

главствующий этиологический фактор, устранение которого позволило бы сократить заболеваемость, как это произошло в случае РЛ, напрямую связанного с «табачной эпидемией» [1–3].

Вопрос о возможном участии вирусов в генезе РМЖ остается дискуссионным. Мы проанализировали результаты попыток обнаружения ДНК онкогенных вирусов папилломы человека (ВПЧ) в РМЖ [4]. Как оказалось, ВПЧ типов высокого онкогенного риска были обнаружены в РМЖ большинством исследователей; нередко выявлялась коинфекция клеток РМЖ онкогенными ВПЧ нескольких типов. У больных с ВПЧ-положительным РМЖ ДНК ВПЧ того же типа, что и в первичном очаге, присутствовала также в метастазах. Однако вирусная нагрузка в ВПЧ-положительных образцах РМЖ оказалась существенно меньшей, чем в образцах рака шейки матки (РШМ). Этот факт, а также то, что в немногочисленных работах ДНК ВПЧ в образцах РМЖ не была обнаружена, явились основаниями для сомнений в сколь-нибудь значимой роли онкогенных ВПЧ в генезе данной формы рака [5–7].

Актуальность прояснения вопроса о роли ВПЧ типов высокого риска в этиологии РМЖ возросла после создания профилактических вакцин против РШМ: в случае, если ассоциация РМЖ с онкогенными ВПЧ существует, открывается перспектива предупреждения также и этой широко распространенной формы рака. При обосновании участия ВПЧ в генезе РШМ, признанного «золотым стандартом» в исследованиях по папилломавирусному канцерогенезу, помимо регулярного обнаружения вирусного генетического материала в опухолевых клетках принимаются во внимание и другие факты: клонированные вирусные гены в системах *in vitro* способны индуцировать злокачественную трансформацию клеток человека; вирусные гены *E6* и *E7* регулярно экспрессируются в опухолевых клетках; вирусные онкобелки *E6* и *E7* взаимодействуют с белками клетки-хозяина, которые контролируют важнейшие функции – пролиферацию, апоптоз, репарацию и другие, нарушая функционирование этих клеточных белков; у лиц с иммунодефицитами РШМ развивается достоверно чаще, чем у людей с полноценным иммунитетом [8, 9].

Цель настоящего обзора – анализ данных литературы, позволяющих оценить перечисленные выше параметры применительно к ДНК ВПЧ-положительному РМЖ.

ИММОТАЛИЗАЦИЯ НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОНКОГЕННЫХ ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Иммортализацию нормальных клеток молочной железы, полученных при косметических операциях по уменьшению груди, под действием канцерогенных ВПЧ наблюдали несколько исследовательских групп

[10–12]. Так, в опытах по трансфекции таких клеток с помощью плазмид, содержащих линейные формы геномов ВПЧ16 и ВПЧ18, полученные трансфектанты хорошо росли на протяжении 60 пассажей, тогда как исходные клетки «старели» после 18–20 пассажей. Размеры клеток-трансфектантов сильнее варьировали. В отличие от исходных клеток они обнаруживали тенденцию к многослойному росту. В целом трансфектанты морфологически напоминали клетки РМЖ, культивируемые в такой же среде. У трансфектантов резко снизились потребности в компонентах среды культивирования: все они оказались способны расти в минимальной среде, если в нее добавляли эпидермальный фактор роста; исходные клетки в этой среде не росли. Однако ни один из трансфектантов не обладал способностью к росту в полужидкой среде и не образовывал опухолей у бестимусных мышей [10].

Было установлено, что трансфекция одним лишь *E6* ВПЧ16 позволяет иммортализовать нормальные клетки молочной железы и значительно уменьшать их ростовые потребности [11]. Методом иммунопреципитации в этой работе было показано, что в трансфектантах резко снижалось содержание *p53*, однако содержание белка ретинобластомы, *pRb*, не менялось по сравнению с исходными клетками (об этих супрессорах опухолевого роста известно, что в зараженном канцерогенными ВПЧ эпителии шейки матки вирусные онкобелки *E6* и *E7* их инактивируют [13]). Ген *E7* ВПЧ16, по данным V. Vand и соавт., оказался не способен иммортализовать нормальные клетки молочной железы. О существовании в эпителии молочной железы нескольких клеточных субпопуляций, обладающих разной чувствительностью к онкогенам ВПЧ16, сообщили D. E. Wazeg и соавт. [12]. Так, клетки одного из типов, преобладающие в культуре на поздних пассажах (10–20-м), иммортализовались исключительно под действием *E6*. Клетки, присутствующие в культуре только на ранних пассажах (4–5-м), оказались способными к иммортализации под действием одного лишь *E7*. Наконец, для иммортализации клеток, которые выделяли из грудного молока (такие клетки присутствовали также на ранних пассажах в культурах), были необходимы и *E6*, и *E7*. Инактивацию *p53* и *pRb* в этих экспериментах авторы подтвердили с помощью иммунопреципитации. На основании полученных результатов они предположили, что клеточные субпопуляции, обладающие разной чувствительностью к онкогенам ВПЧ16, возможно, являются предшественниками разных типов РМЖ.

При интерпретации приведенных в настоящем разделе результатов уместно упомянуть, что и в случае РШМ для поддержания состояний «бессмертности» и/или злокачественности необходима (но не достаточна) постоянная экспрессия онкогенов *E6* и *E7* ВПЧ типов высокого онкогенного риска в инфицированных вирусом клетках цервикального эпителия [8].

ЭКСПРЕССИЯ ОНКОГЕНОВ *E6* И *E7* В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СОДЕРЖАЩИХ ДНК ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ТИПОВ ВЫСОКОГО ОНКОГЕННОГО РИСКА

Об активности геномов ВПЧ в незлокачественных и раковых тканях молочной железы свидетельствует обнаружение в них койлоцитов, клеток плоского эпителия, ядро и цитоплазма которых, по опыту исследований эпителия шейки матки, претерпевают ряд деформаций в результате продуктивной ВПЧ-инфекции и которые признаны индикаторами этой инфекции (некоторые подробности – в [4]).

Попытки подтвердить или опровергнуть активность генома ВПЧ в ДНК ВПЧ-положительном РМЖ предпринимались путем детекции транскриптов вирусных онкогенов [14–17] и/или выявления онкобелков *E6* и *E7* ВПЧ с помощью специфических антител к этим белкам [15, 16, 18–20].

Среди этих работ нам известно единственное сообщение – О.М. Gannon и соавт. (2015) [14], – авторы которого не подтвердили факт активности генома ВПЧ в ДНК ВПЧ-положительном РМЖ. В выборке из 80 образцов РМЖ, полученных у австралийских пациенток, ВПЧ-положительными оказались 5, преобладал ВПЧ18; ни в одном из этих образцов транскриптов, соответствующих вирусным онкогенам *E6* и *E7*, исследователи не выявили. J.S. Lawson и соавт. (2015) проанализировали данные о 855 образцах РМЖ из Австралии, содержащиеся в Атласе ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA), и обнаружили 30 (3,5 %) транскриптов ВПЧ низкого риска и 20 (2,3 %) транскриптов ВПЧ высокого риска; среди последних преобладал ВПЧ18 [15]. В собственных экспериментах экспрессию *E7* эти авторы изучили на неслучайной группе женщин, у которых были последовательно диагностированы сначала доброкачественное, а позднее – злокачественное новообразование молочной железы. Окрашивая иммуногистохимически все образцы, как ДНК-положительные (которые составили здесь 60 %), так и ДНК-отрицательные, они обнаружили вирусный онкобелок *E7* в 72 % образцов доброкачественных тканей и в 59 % образцов РМЖ. Неожиданным оказалось следующее наблюдение: нередко встречались случаи, когда вирусный онкобелок *E7* выявлялся в доброкачественном новообразовании, но отсутствовал или был представлен крайне слабо в РМЖ, развившемся в дальнейшем у этой пациентки (авторы представили убедительные гистологические иллюстрации). К данному наблюдению мы обратимся далее при обсуждении вероятных отличий роли онкогенных ВПЧ в генезе РМЖ от их роли в возникновении РШМ.

Конкордантность результатов, свидетельствующих об экспрессии онкогенов *E6* и *E7* ВПЧ16, полученных в ходе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, с результатами иммуногистохимического теста зафиксировали S. Islam и соавт.; эти авто-

ры обнаружили различную степень стабильности у вирусных онкобелков, соответствующих разным сплайс-формам вирусных онкогенов [16].

Гиперэкспрессия клеточного белка $p16^{INK4a}$ является маркером активности вирусного онкогена *E7* ВПЧ типов высокого риска в эпителии шейки матки; путь вовлечения этого белка в генез РШМ мы описывали ранее [21]. J.S. Lawson и соавт. (2015) предприняли попытку подтверждения полученных ими данных, свидетельствующих об экспрессии онкобелка *E7* ВПЧ18 в доброкачественных и злокачественных новообразованиях молочной железы, путем иммуногистохимической детекции $p16^{INK4a}$ в этих новообразованиях [15]. Вопреки ожиданиям авторы не зафиксировали достоверных различий в экспрессии $p16^{INK4a}$ между нормальными тканями молочной железы, доброкачественными новообразованиями в данном органе и РМЖ; не было обнаружено и различия между ВПЧ-положительными и ВПЧ-отрицательными образцами РМЖ. Отметив принципиально различный характер экспрессии этого клеточного белка в нормальном эпителии шейки матки и нормальном эпителии молочной железы, на основании полученных данных авторы заключили, что роль $p16^{INK4a}$ в ВПЧ-положительном РМЖ остается неясной и требует дальнейшего изучения. В дальнейшем В. Biesaga и соавт. сообщили о значительной гиперэкспрессии $p16^{INK4a}$ в 2 ВПЧ16-положительных образцах протокового РМЖ III стадии и дали убедительные иммуногистохимические иллюстрации [22]. В целом представляется целесообразным продолжение исследований экспрессии $p16^{INK4a}$ в ВПЧ-положительном РМЖ.

АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ КЛЕТКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРИСУТСТВИЯ ИЛИ ОТСУТСТВИЯ В НИХ ГЕНОМА ПАПИЛЛОМАВИРУСА

Как отмечалось ранее, при изучении РШМ было установлено, что для трансформации клеток цервикального эпителия необходимы их длительная инфекция онкогенным ВПЧ и экспрессия вирусных онкогенов *E6* и *E7* [8]. Онкобелки *E6* и *E7* ВПЧ типов высокого риска взаимодействуют со многими белками клетки, влияя на их функционирование. Важнейшими эффектами этих онкобелков принято считать следующие два. Онкобелок *E7* взаимодействует с супрессором опухолевого роста, известным как белок ретинобластомы (*pRb*). Этот белок регулирует активность транскрипционных факторов семейства *E2F*. *E7*, связываясь с *pRb*, вызывает его разрушение. Как следствие – клетки беспрепятственно преодолевают точку рестрикции G1/S клеточного цикла [23]. Онкобелок *E6* взаимодействует с супрессором опухолевого роста *p53*, что ведет к быстрому разрушению *p53* [24]. Таким образом, в совокупности эти 2 вирусных онкобелка нарушают нормальное протекание митотического цикла, репарации генома, апоптоза и других процессов.

N. Khodabandehlou и соавт. оценили статус pRb и p53 в ДНК ВПЧ-положительном РМЖ [17]. На выборке из 72 опухолевых образцов, среди которых ВПЧ-положительными были около 50 % и преобладал ВПЧ18, с использованием иммуноферментного анализа авторы зафиксировали высоко достоверное снижение содержания этих белков-супрессоров опухолевого роста в ВПЧ-положительных тканях РМЖ ($p < 0,001$ для обоих белков). О достоверном подавлении экспрессии p53 в содержащих ДНК канцерогенных ВПЧ образцах РМЖ сообщили также Y.-W. Wang и соавт., использовавшие иммуногистохимический метод. Что касается pRb, то различий в содержании этого супрессора опухолевого роста между ВПЧ-положительными и ВПЧ-отрицательными образцами РМЖ исследователи не зафиксировали. Помимо p53 в ВПЧ-положительных образцах РМЖ значимо по сравнению с ВПЧ-отрицательными образцами менялась экспрессия онкобелка BCL2; этот антиапоптотический белок был гиперэкспрессирован. На основании полученных результатов Y.-W. Wang и соавт. пришли к заключению, что ВПЧ типов высокого онкогенного риска участвуют в развитии РМЖ, вовлекая в этот процесс клеточные белки p53 и BCL2 [25].

Белки-супрессоры опухолевого роста BRCA1 и BRCA2, участвующие в репарации разрывов ДНК, по результатам иммуноферментного тестирования, проведенного N. Khodabandehlou и соавт., в ВПЧ-положительном РМЖ экспрессировались достоверно слабее, чем в ВПЧ-отрицательном и в тканях молочной железы здоровых женщин (в материалах, полученных при косметической хирургии); экспрессия воспалительных цитокинов интерлейкинов 1, 6, 17, трансформирующего фактора роста β (TGF- β), фактора некроза опухоли α (TNF- α), транскрипционного ядерного фактора каппа В (NF- κ B) положительно коррелировала с наличием ДНК ВПЧ в РМЖ. В итоге проведенной работы авторы пришли к заключению, что онкогенные ВПЧ участвуют в генезе РМЖ, нарушая функционирование нескольких супрессоров опухолевого роста — pRb, p53, BRCA1, BRCA2, а также способствуя развитию воспалительного процесса [17].

Небольшой короткоживущий белок, кодируемый геном *Id1* (ингибитор дифференцировки и связывания с ДНК), способен образовывать гетеродимеры с различными транскрипционными факторами семейства HLH (helix-loop-helix, спираль-петля-спираль) и нарушать таким образом функционирование этих транскрипционных факторов. *Id1* имеет множество функций: так, он ингибирует дифференцировку, ускоряет пролиферацию клеток и тормозит репликативное старение [26]. Известно, что у больных РМЖ гиперэкспрессия *Id1* коррелирует с большей агрессивностью опухоли [27–29].

Связь ДНК ВПЧ-статуса РМЖ с экспрессией *Id1* изучили N. Akil и соавт. (2008) на выборке из 113 образцов РМЖ. ДНК ВПЧ в этом исследовании была

выявлена в 61 % образцов; преобладали ВПЧ33 и ВПЧ35 [18]. Авторы провели иммуногистохимическое исследование на тканевых микрочипах с антителами к E6 ВПЧ и *Id1*. Экспрессия E6 ВПЧ и *Id1* коррелировала в образцах инвазивного РМЖ в 94,3 % случаев, в образцах РМЖ *in situ* — в 30,8 % случаев. Присутствие онкогенов ВПЧ в *Id1*-экспрессирующих образцах была подтверждена в ходе полимеразной цепной реакции с типоспецифическими праймерами к E6 и E7 ВПЧ. Полученные результаты авторы рассматривают как свидетельство в пользу того, что ген *Id1* в ВПЧ-положительном РМЖ, по-видимому, является мишенью онкобелков E6 и E7.

K. Ohba и соавт. исследовали связь между ДНК ВПЧ-положительностью РМЖ и экспрессией рецепторов эстрогенов на поверхности раковых клеток [30]. Они протестировали 209 образцов РМЖ, среди которых в 31 % случаев выявили ДНК ВПЧ типов высокого риска. В вирус-положительных образцах преобладал ВПЧ16. Оказалось, что достоверно чаще ВПЧ-положительным является РМЖ, на клетках которого экспрессируются эстрогеновые рецепторы (ER), по сравнению с ER-отрицательным РМЖ. Это наблюдение позволило исследователям предположить, что эстроген способен непосредственно воздействовать на транскрипцию онкогенов E6 и E7 ВПЧ в РМЖ и что нормальные ER-положительные клетки молочной железы могут быть первоначальной мишенью для ВПЧ, поскольку они активируются ростовым сигналом эстрогенов. По-видимому, ER-положительный РМЖ — более ранняя стадия рака, а при инициации РМЖ имеет место взаимодействие эстрогена с вирусными онкогенами E6 и E7. Следует, однако, отметить, что описанная корреляция между ДНК ВПЧ-статусом РМЖ и экспрессией эстрогеновых рецепторов на клетках опухоли не нашла подтверждения в двух других работах [31, 32]. Существование этой корреляции позволят прояснить дальнейшие исследования.

K. Ohba и соавт. обнаружили связь между уровнем экспрессии цитидиндезаминазы APOBEC3B (A3B) и ВПЧ18-положительным или ВПЧ18-отрицательным статусом РМЖ [30]. Тема их исследования была продиктована некоторыми сделанными ранее наблюдениями. Так, для РМЖ характерно высокое содержание мутаций типа транзиций C \rightarrow T, выясняя природу которого, M. V. Burns и соавт. показали, что содержание матричной РНК A3B в многочисленных клеточных линиях из РМЖ, а также в клетках первичного РМЖ превышало контрольный показатель (в качестве контроля они использовали ткани молочных желез, полученные при косметических операциях) не менее чем в 3 раза, а нередко — в 10 раз. Эндогенная A3B была единственным источником редактирующей активности C \rightarrow T в экстрактах из клеточных линий РМЖ. При индукции повышения экспрессии A3B наблюдались сбой клеточного цикла, клеточная гибель, фрагментация ДНК, учащение транзиций C \rightarrow T и другие

нарушения [33]. К. Ohba и соавт., используя нормальные клетки эпителия молочной железы, трансфицированные ВПЧ18, наблюдали гиперэкспрессию матричной РНК цитидиндезаминазы АЗВ. По сравнению с уровнем экспрессии в исходных клетках молочной железы, не содержащих генома ВПЧ18, присутствие вирусного генома в этой системе приводило к усилению экспрессии АЗВ в 2,5 раза. При этом экспрессия остальных цитидиндезаминаз была подавлена. Таким образом, усиление экспрессии АЗВ было специфическим. После получения этих результатов *in vitro* авторы исследовали уровень экспрессии АЗВ в ВПЧ18-положительных и ВПЧ18-отрицательных образцах РМЖ. Тенденция, описанная ими *in vitro*, прослеживалась и в данном случае. В целом полученные результаты были интерпретированы авторами как аргумент в пользу вовлечения ВПЧ в канцерогенез в молочной железе на ранних стадиях этого процесса. Они предположили, что роль канцерогенных ВПЧ в этиологии РМЖ отлична от их роли в генезе РШМ: в молочной железе не требуется постоянного присутствия и экспрессии вирусного генома, ВПЧ проявляют в этом случае активность на ранних этапах, индуцируемая ими активация АРОВЕСЗВ приводит к геномной нестабильности и прогрессии новообразования.

РАК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У БОЛЬНЫХ С ИММУНОДЕФИЦИТАМИ

Одним из традиционных аргументов в пользу участия того или иного вируса в генезе онкологического заболевания является увеличение частоты его встречаемости у лиц, страдающих иммунодефицитами. Так, РШМ является основным онкологическим заболеванием женщин-носительниц ВИЧ [34]. Стандартизованный коэффициент заболеваемости РШМ у женщин, подвергавшихся трансплантации органов и прошедших лечение иммуносупрессорами, высоко достоверно превышает этот показатель для популяции в целом ($p < 0,001$) [35].

Достоверного увеличения случаев возникновения РМЖ у реципиентов органов, получавших иммуносупрессоры, выявлено не было, несмотря на то, что в целом онкологическая заболеваемость среди этих пациентов превышала среднюю по популяции в 2–3 раза [35, 36]. Носители вируса иммунодефицита человека характеризуются высоким риском возникновения определенных онкологических заболеваний, однако РМЖ при неоднократных проверках не вошел в их перечень [37, 38].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным аргументом в пользу точки зрения, согласно которой онкогенные ВПЧ причастны к возникновению РМЖ, является обнаружение ДНК этих вирусов в образцах карцином молочной железы в подавляющем большинстве лабораторий, занимавшихся данной проблемой. Главным возражением против этой точки зрения служат данные о чрезвычайно низкой вирусной нагрузке в ВПЧ-положительном РМЖ: количество геномов ВПЧ на клетку здесь существенно менее 1, что на порядки уступает аналогичному показателю для РШМ.

В случае РШМ на канцерогенность ВПЧ определенных типов, так называемых типов высокого онкогенного риска, помимо факта присутствия ДНК этих вирусов в большинстве образцов цервикальных карцином указывают также: обнаружение экспрессии онкогенов *E6* и *E7* в раковых клетках; способность геномов этих вирусов и отдельных клонированных онкогенов при трансфекции в нормальные клетки эпителия шейки матки вызывать иммортализацию и трансформацию данных клеток; способность ВПЧ влиять на экспрессию многих генов клетки-хозяина.

Одной из наиболее важных находок, которые, по-видимому, позволяют объяснить и низкую вирусную нагрузку в ВПЧ-положительном РМЖ, и отсутствие влияния иммунодефицита на заболеваемость РМЖ, явилось недавнее обнаружение связи между уровнем экспрессии цитидиндезаминазы АЗВ и ВПЧ-статусом РМЖ. В системах *in vitro* (на нормальных клетках молочной железы, трансфицированных ВПЧ18) и *in vivo* (на ВПЧ18-положительных образцах РМЖ) было показано значимое увеличение содержания этого фермента под действием вируса. АЗВ вызывает транзиции $C \rightarrow T$, характерные для карцином молочных желез безотносительно к их ВПЧ-статусу. В ВПЧ-положительных клетках нестабильность генома многократно возрастала. Эти результаты послужили основанием для предположения о принципиальном отличии роли онкогенных ВПЧ в индукции РМЖ по сравнению с той ролью, которую данные вирусы играют в канцерогенезе в эпителии шейки матки. В случае канцерогенного действия ВПЧ на клетки эпителия молочной железы постоянное присутствие вируса и экспрессия его онкогенов, по-видимому, не являются обязательными. Вызываемая онкогенными ВПЧ активация АЗВ приводит к геномной нестабильности и последующей прогрессии новообразования.

В целом имеющиеся данные указывают на участие папилломавирусов типов высокого риска в генезе РМЖ. Представляется актуальным исследовать ВПЧ-статус российских больных РМЖ.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3): 209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
- Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022;72(1):7–33. DOI: 10.3322/caac.21708
- Украинец Р., Корнева Ю. Структура заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований сегодня и прогноз на завтра. *Онкология сегодня* 2021;6(46):1–2. Ukrainets R., Korneva Yu. Malignant malformations' incidence and mortality structure and forecast. *Onkologiya segodnya = Oncology Today* 2021;6(46):1–2. (In Russ.).
- Волгарева Г.М. Ассоциация рака молочной железы с онкогенными папилломавирусами: обнаружение ДНК папилломавирусов в клетках рака молочной железы. *Успехи молекулярной онкологии* 2022;9(2):10–22. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-10-22. Volgareva G.M. Breast cancer association with oncogenic papillomaviruses: papillomaviral DNA detection in breast cancer cells. *Uspехи molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022; 9(2):10–22. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-10-22
- Khan N.A., Castillo A., Koriyama C. et al. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. *Br J Cancer* 2008;99(3):408–14. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604502
- Hedau S., Kumar U., Hussain S. et al. Breast cancer and human papillomavirus infection: no evidence of HPV etiology of breast cancer in Indian women. *BMC Cancer* 2011;11:27. DOI: 10.1186/1471-2407-11-27
- Bakhtiyarizadeh S., Hosseini S.Y., Yaghoobi R. et al. Almost complete lack of human cytomegalovirus and human papillomaviruses genome in benign and malignant breast lesions in Shiraz, Southwest of Iran. *Asian Path J Cancer Prev* 2017;18(12):3319–24. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.12.3319
- Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):690–8. DOI: 10.1093/jnci/92.9.690
- International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 90. Human Papillomaviruses. Lyon, 2007. 672 p.
- Band V., Zajchowski D., Kulesa V., Sager R. Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87(1):463–7. DOI: 10.1073/pnas.87.1.463
- Band V., De Caprio J.A., Delmolino L. et al. Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6-immortalized human mammary epithelial cells. *J Virol* 1991;65(12):6671–6. DOI: 10.1128/JVI.65.12.6671-6676.1991.
- Wazer D.E., Liu X.L., Chu Q. et al. Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papilloma virus 16 E6 or E7. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92(9):3687–91 DOI: 10.1073/pnas.92.9.3687
- Волгарева Г.М. Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы. Ч. 1. Общие представления о папилломавирусах. Формы рака, ассоциированные с вирусами папилломы человека. *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(1):6–12. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-6-12 Volgareva G.M. Papillomaviral carcinogenesis. Major achievements and certain challenges. Part 1. General notions of papillomaviruses. Human papillomaviruses-associated cancers. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2020;19(1):6–12. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-6-12
- Gannon O.M., Antonsson A., Milevskiy M. et al. No association between HPV positive breast cancer and expression of human papilloma viral transcripts. *Sci Rep* 2015;5:18081. DOI: 10.1038/srep18081
- Lawson J.S., Glenn W.K., Salyakina D. et al. Human papilloma viruses and breast cancer. *Front Oncol* 2015;5:277. DOI: 10.3389/fonc.2015.00277
- Islam S., Dasgupta H., Roychowdhury A. et al. Study of association and molecular analysis of human papillomavirus in breast cancer of Indian patients: Clinical and prognostic implication. *PLoS One* 2017;12(2):e0172760. DOI: 10.1371/journal.pone.0172760
- Khodabandehlou N., Mostafaei S., Etemadi A. et al. Human papilloma virus and breast cancer: the role of inflammation and viral expressed proteins. *BMC Cancer* 2019;19(1):61. DOI: 10.1186/s12885-019-5286-0
- Akil N., Yasmeen A., Kassab A. et al. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. *Br J Cancer* 2008;99(3):404–7. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604503
- Lawson J.S., Glenn W.K., Salyakina D. et al. Human papilloma virus identification in breast cancer patients with previous cervical neoplasia. *Front Oncol* 2016;5:298. DOI: 10.3389/fonc.2015.00298
- Salman N.A., Davies G., Majidy F. et al. Association of high risk human papillomavirus and breast cancer: a UK based study. *Sci Rep* 2017;7:43591. DOI: 10.1038/srep43591
- Волгарева Г.М. Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы. Ч. 3. Три уровня профилактики и лечения рака шейки матки. *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(3):6–11. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-00-00 Volgareva G.M. Papillomaviral carcinogenesis. Major achievements and certain challenges. Part 3. Three levels of cervical cancer prevention and treatment. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2020;19(3):6–11. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-00-00
- Biesaga B., Janecka-Widla A., Kolodziej-Rzepa M. et al. Low frequency of HPV positivity in breast tumors among patients from south-central Poland. *Infect Agent Cancer* 2021;16(1):67. DOI: 10.1186/s13027-021-00405-z
- Dyson N., Howley P.M., Münger K., Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243(4893):934–7. DOI: 10.1126/science.2537532
- Werness B.A., Levine A.J., Howley P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248(4951):76–9. DOI: 10.1126/science.2157286
- Wang Y.-W., Zhang K., Zhao S. et al. HPV status and its correlation with BCL2, p21, p53, Rb, and survivin expression in breast cancer in a Chinese population. *BioMed Res Int* 2017;2017:6315392. DOI: 10.1155/2017/6315392
- Lin C.Q., Singh J., Murata K. et al. A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2000;60(5):1332–40.
- Jang K.-S., Han H.X., Paik S.S. et al. Id-1 overexpression in invasive ductal carcinoma cells is significantly associated with intratumoral microvessel density in ER-negative/node-positive breast cancer. *Cancer Letters* 2006;244(2):203–10. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.12.016
- Roschger C., Cabrele C. The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways. *Cell Commun Signal* 2017;15(1):7. DOI: 10.1186/s12964-016-0161-y
- Zhao Z., Bo Z., Gong W., Guo Y. Inhibitor of differentiation 1 (Id1) in cancer and cancer therapy. *Int J Med Sci* 2020;17(8):95–1005. DOI: 10.7150/ijms.42805
- Ohba K., Ichiyama K., Yajima M. et al. *In vivo* and *in vitro* studies suggest a possible involvement of HPV infection in the early stage of breast carcinogenesis via APOBEC3B induction. *PLoS One* 2014;9(5):e97787. DOI: 10.1371/journal.pone.0097787

31. Herrera-Goepfert R., Vela-Chavez T., Carrillo-Garcia A. et al. High-risk human papillomavirus (HPV) DNA sequences in metaplastic breast carcinomas of Mexican women. *BMC Cancer* 2013;13:445. DOI: 10.1186/1471-2407-13-445
32. Elagali A.M., Suliman A.A., Altayeb M. et al. Human papillomavirus, gene mutation and estrogen and progesterone receptors in breast cancer: a cross-sectional study. *Pan Afr Med J* 2021;38:43. DOI: 10.11604/pamj.2021.38.43.22013
33. Burns M.B., Lackey L., Carpenter M.A. et al. APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature* 2013;494(7437):366–70. DOI: 10.1038/nature11881.
34. Stelzle D., Tanaka L.F., Lee K.K. et al. Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV. *Lancet Glob. Health* 2021;9(2):e161–e169. DOI: 10.1016/S2214-109X(20)30459-9
35. Huo Z., Li C., Xu X. et al. Cancer risks in solid organ transplant recipients: results from a comprehensive analysis of 72 cohort studies. *Oncoimmunology* 2020;9(1):1848068. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1848068
36. Park B., Yoon J., Kim H.J. et al. De novo cancer incidence after kidney and liver transplantation: results from a nationwide population based data. *Sci Rep* 2019;9(1):17202. DOI: 10.1038/s41598-019-53163-9
37. Goedert J.J., Schairer C., McNeel T.C. et al. Risk of breast, ovary, and uterine corpus cancers among 85268 women with AIDS. *Br J Cancer* 2006;95(5):642–8. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603282
38. Grulich A.E., Vajdic C.M. The epidemiology of cancers in human immunodeficiency virus infection and after organ transplantation. *Semin Oncol* 2015;42(2):247–57. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2014.12.029

ORCID автора / ORCID of the author

Г.М. Волгарева / Г.М. Волгарева: <https://orcid.org/0000-0002-6817-2103>

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was done without external funding.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-25-39



Влияние дексаметазона на экспрессию и содержание гликозилированных компонентов в ткани головного мозга мышей

С.Д. Аладьев¹, Д.К. Соколов¹, А.В. Строкотова¹, Г.М. Казанская¹, А.М. Волков², М.О. Политко¹, А.И. Шахмурадова¹, Е.Э. Кливер², А.Ю. Цидулко¹, С.В. Айдагулова^{1,3}, Э.В. Григорьева¹

¹Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Минобрнауки России; Россия, 630117 Новосибирск, ул. Тимакова, 2/12;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России; Россия, 630055 Новосибирск, ул. Речкуновская, 15;

³ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 630091 Новосибирск, Красный проспект, 52

Контакты: Станислав Дмитриевич Аладьев s.aladev@alumni.nsu.ru

Введение. Глюкокортикоиды активно используются при лечении различных заболеваний, однако их длительное применение приводит ко множеству побочных эффектов, молекулярные механизмы развития которых остаются недостаточно изученными.

Цель исследования – изучение краткосрочного (1–10 сут) влияния различных доз дексаметазона (Dex) (0,1–10 мг/кг) на экспрессию глюкокортикоидного рецептора (GR, *Nr3c1*), коровых белков основных протеогликанов и ферментов биосинтеза углеводных цепей гепарансульфата, а также содержание углеводных макромолекул гликозаминогликанов в ткани головного мозга экспериментальных животных.

Материалы и методы. В исследовании использовали мышей линии C57Bl/6. Экспрессию GR, коровых белков протеогликанов и генов, кодирующих ферменты биосинтеза гепарансульфата, определяли с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени. Содержание и локализация белковой молекулы GR были изучены методами Вестерн-блоттинга и иммуногистохимического анализа, а содержание гликозаминогликанов – с помощью дот-блот анализа и окраски альциановым синим.

Результаты. Было показано, что однократное введение Dex приводило к быстрой (на 1–3-и сутки) кратковременной активации экспрессии GR (+1,5 раза; $p < 0,05$) некоторых генов коровых белков протеогликанов (синдекан-3, *Sdc3*; перлекан, *Hspg2*; фосфакан, *Ptprz1*; нейрокан, *Ncan*; +2–3 раза; $p < 0,05$) и генов ферментов биосинтеза гепарансульфатов (*Ndst1*, *Glce*, *Hs2st1*, *Hs6st1*, *Sulf1/2*; +1,5–2 раза; $p < 0,05$) в мозге мышей с возвращением к контрольным показателям к 7–10-м суткам после введения Dex. При этом влияние данного препарата на углеводные макромолекулы гликозаминогликанов имело более отсроченный и стабильный характер, дозозависимо увеличивая содержание общих гликозаминогликанов в ткани мозга, начиная с 1-х суток после введения Dex. Высокосульфатированные гликозаминогликаны демонстрировали более медленный ответ на введение препарата, повышение их содержания наблюдалось только при более высоких дозах (2,5 и 10 мг/кг) и только на 7–10-е сутки после его введения в основном за счет повышения содержания гепарансульфата.

Заключение. Влияние однократного применения Dex на транскрипционную активность GR, протеогликанов и ферментов биосинтеза гепарансульфата носит кратковременный характер, и экспрессия генов быстро возвращается к нормальному уровню. Однако даже однократное применение Dex значительно повышает содержание общих и высокосульфатированных гликозаминогликанов в ткани головного мозга мышей, что может привести к изменению состава и структуры ткани головного мозга, а также его функциональных характеристик.

Ключевые слова: глюкокортикоиды, дексаметазон, головной мозг, глюкокортикоидный рецептор, гликозилирование, протеогликан, гликозаминогликан

Для цитирования: Аладьев С.Д., Соколов Д.К., Строкотова А.В. и др. Влияние дексаметазона на экспрессию и содержание гликозилированных компонентов в ткани головного мозга мышей. Успехи молекулярной онкологии 2023; 10(1):25–39. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-25-39

Dexamethasone effects on the expression and content of glycosylated components of mouse brain tissue

S.D. Aladev¹, D.K. Sokolov¹, A.V. Strokovtova¹, G.M. Kazanskaya¹, A.M. Volkov², M.O. Politko¹, A.I. Shahmuradova¹, E.E. Kliver², A.Y. Tsidulko¹, S.V. Aidagulova^{1,3}, E.V. Grigorieva¹

¹Institute of Molecular Biology and Biophysics of the Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation; 2/12 Timakova St., Novosibirsk 630117, Russia;

²E.N. Meshalkin National Medical Research Center; 15 Rechkunovskaya St., Novosibirsk 630055, Russia;

³Novosibirsk State Medical University; 52 Krasnyi Prospect, Novosibirsk 630091, Russia

Contacts: Stanislav Dmitrievich Aladev s.aladev@alumni.nsu.ru

Introduction. Glucocorticoids are actively used in the treatment of various diseases, however their long-term use leads to numerous negative side-effects, the molecular mechanisms of which remain poorly understood.

Aim. Study of the short-term (1–10 days) effects of various doses of dexamethasone (Dex) (0,1–10 mg/kg) on the expression of the glucocorticoid receptor (GR, *Nr3c1*), core proteins of main proteoglycans and heparan sulfate metabolism-involved genes, as well as the content of carbohydrate macromolecules of glycosaminoglycans in the brain tissue of experimental animals.

Materials and methods. In the study, C57Bl/6 mice were used. The expression of GR, proteoglycan core proteins and heparan sulfate metabolism-involved genes was determined by real-time polymerase chain reaction with reverse transcription. The content and localization of GR protein molecule were studied by Western blot and immunohistochemical analysis, and the glycosaminoglycan content was determined by dot-blot analysis and Alcian Blue staining.

Results. It was shown that a single Dex administration leads to fast (1–3 days) short-term activation of GR expression (+1.5 times, $p < 0.05$), proteoglycan's genes (*syndecan-3*, *Sdc3*; *perlecan*, *Hspg2*; *phosphacan*, *Ptprz1*; *neurocan*, *Ncan*; +2–3-fold; $p < 0.05$) and heparan sulfate-metabolism-involved genes (*Ndst1*, *Glce*, *Hs2st1*, *Hs6st1*, *Sulf1/2*; +1.5–2-fold; $p < 0.05$) in the mouse brain, with a return to control values by 7–10 days after Dex administration. At the same time, the effect of Dex on carbohydrate macromolecules of glycosaminoglycans was more delayed and stable, increasing the content of low-sulfated glycosaminoglycans in the brain tissue in a dose-dependent manner starting from day 1 after Dex administration. Highly-sulfated glycosaminoglycans showed more delayed response to Dex administration, and an increase in their content was observed only at higher doses (2.5 and 10 mg/kg) and only on 7–10 days after its administration, apparently, mainly due to an increase in heparan sulfate content.

Conclusion. In general, the effect of a single injection of Dex on the transcriptional activity of GR, proteoglycan core proteins and heparan sulfate metabolism-involved genes were short-termed, and the genes expression quickly returned to the normal levels. However, even a single use of Dex significantly increased the content of total as well as highly sulfated glycosaminoglycans in the mouse brain tissue, which can lead to the changes in the composition and structure of the brain tissue, as well as its functional characteristics.

Keywords: glucocorticoids, dexamethasone, brain, glucocorticoid receptor, glycosylation, proteoglycan, glycosaminoglycan

For citation: Aladev S.D., Sokolov D.K., Strokovtova A.V. et al. Dexamethasone effects on the expression and content of glycosylated components of mouse brain tissue. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):25–39. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-25-39

ВВЕДЕНИЕ

Дексаметазон (dexamethasone, Dex) – синтетический глюкокортикостероид (glucocorticoid, GC), широко используемый для лечения широкого спектра заболеваний. Несмотря на клиническую эффективность при лечении и/или предотвращении отека головного мозга в терапии злокачественных глиом, применение Dex связано с многочисленными системными побочными эффектами, включая бессонницу, психические изменения, тремор, гипергликемию, мышечную атрофию, гипертензию и иммуносупрессию [1]. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов побочных эффектов GC имеет большое значение для оптимизации терапии глиобластомы этими препаратами.

Головной мозг является важной мишенью GC, которые вызывают в мозге плейотропные эффекты, влияя на поведение, познание, настроение и програм-

мирование реакции на стресс. Сдвиги уровней GC связаны со сложными изменениями активности нейронов, которые различаются во времени и в зависимости от исследуемого участка мозга [2]. Глюкокортикоиды оказывают влияние на головной мозг через геномные механизмы, включающие как глюкокортикоидный рецептор (glucocorticoid receptor, GR), так и минералокортикоидные рецепторы, напрямую связывающиеся с ДНК, а также негеномные механизмы. Кроме того, GC взаимодействуют как геномно, так и негеномно с нейротрансмиттерами, нейротрофическими факторами, половыми гормонами и другими медиаторами стресса [3].

Помимо воздействия на клеточные компоненты ткани головного мозга, GC влияют также и на ее межклеточное вещество. Особенностью внеклеточного матрикса (ВКМ) головного мозга является присутствие

большого количества сложных белково-углеводных макромолекул протеогликанов (ПГ), состоящих из корового белка и углеводных цепей гликозаминогликанов (ГАГ) – гепарансульфатов (ГС) и хондроитинсульфатов (ХС) [4]. Влияние ГС на гликозилированные макромолекулы ПГ и ГАГ в различных тканях описано в обзоре [5].

При этом данные о влиянии ГС на ПГ и ГАГ в ткани головного мозга очень немногочисленны. Показано, что метилпреднизолон снижает экспрессию коровых белков фосфакана и нейрокана в модели острого повреждения спинного мозга *in vitro*, причем изменения в экспрессии нейрокана были опосредованы GR [6]. Введение Dex взрослым мышам в течение 7 сут снижает экспрессию корового белка агрина базальной мембраны в коре головного мозга мышей [7]. Показано, что обработка Dex дозозависимо влияет как на экспрессию коровых белков ПГ (синдекан-1, глипикан-1, декорин, бигликан, люмикан, версикан, бревикан и хондроитинсульфат протеогликан-4/NG2), так и на содержание ГС/ХС в органотипической культуре срезов головного мозга крысы *ex vivo* и экспериментальных животных *in vivo* [8]. Аналогичные эффекты Dex были показаны на модели рецидива глиобластомы у мышей SCID, где наблюдалось увеличение экспрессии глипикана-1, синдекана-1 и версикана и снижение содержания ХС в подкорковых структурах головного мозга, тогда как в коре головного мозга происходило только снижение уровня экспрессии бигликана [9]. Эти немногочисленные данные указывают на способность ГС оказывать влияние на гликозилированные компоненты ткани головного мозга, однако молекулярный механизм такого воздействия остается неясным.

Известно, что основная функциональная активность ГС реализуется через их связывание с GR, который кодируется геном *Nr3C1* (nuclear receptor family 3, member 1). В отсутствие внутриклеточных ГС GR находится в цитоплазме в виде мономера в составе сложного белкового комплекса, а после связывания с ГС конформация GR изменяется, белковый комплекс диссоциирует, активированный GR транслоцируется в клеточное ядро и запускает молекулярные механизмы трансактивации и трансрепрессии [10]. Оказавшись внутри ядра, GR связывается с чувствительными к нему ДНК-последовательностями в промоторной области различных генов (glucocorticoid responsive element, GRE) и действует как транскрипционный фактор, напрямую активируя и подавляя экспрессию множества генов, участвующих в различных аспектах развития, метаболизма, стрессовых реакций, воспаления и других ключевых процессах [11].

Нами была высказана гипотеза, что активное приращение Dex в качестве сопровождающей терапии при лечении глиобластомы может влиять на экспрессию и содержание гликозилированных макромолекул (ПГ, ГАГ) в ткани головного мозга через участие GR

в регуляции экспрессии генов, кодирующих коровые белки ПГ и систему биосинтеза их углеводных цепей ГАГ. Согласно имеющимся немногочисленным данным, GRE присутствуют в промоторных областях генов, кодирующих коровые белки серглицина [12], агрекана [13] и нейрокана [14]. Для некоторых коровых белков показано, что под действием ГС экспрессия гена изменяется через GR: синдекан-1 [15], агрекан [16], нейрокан [6], CD44 [17].

Цель исследования – изучить влияние дексаметазона на экспрессию GR, коровых белков основных ПГ и системы биосинтеза углеводных цепей ГС, содержание ГАГ, а также возможную взаимосвязь между этими параметрами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Все исследования проводили на мышах-самцах линии C57Bl/6 (возраст 7–8 нед, масса тела 22–30 г). Животных содержали в поликарбонатных клетках со свободным доступом к пище и воде. Клетки находились в хорошо вентилируемом помещении с 12/12-часовым циклом свет/темнота при температуре 25 ± 1 °C и влажности 50–60 %. В контрольную группу ($n = 15$) вошли мыши, получавшие однократную инъекцию физиологического раствора. Остальным мышам ($n = 99$) внутрибрюшинно выполняли однократную инъекцию Dex (KRKA Pharma, Словения) в дозировке 0,1; 1; 2,5 или 10 мг/кг (24 животных в каждой группе). Дозировки Dex были подобраны согласно данным литературы [18, 19]. Сроки выведения животных из эксперимента для каждой из дозировок Dex составляли 1, 3, 7 и 10 сут. Мышей забивали декапитацией с использованием гильотины согласно руководству по эвтаназии животных (National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory, 2011). Головной мозг мышей разделяли на 2 половины: одну фиксировали в растворе RNALater (ThermoFisher Scientific, США) согласно инструкции производителя и использовали для полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), Вестерн-блоттинга и дот-блот анализа, а другую фиксировали в забуференном 10 % растворе формалина и заключали в парафин (BioVital, Россия) для гистологического и иммуногистохимического исследований, а также окрашивания срезов альциановым синим. Все процедуры с экспериментальными животными проводили в соответствии с Директивой Совета Европейского сообщества 2010/63/ЕС.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с использованием QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Германия), обратную транскрипцию проводили с помощью RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали из 0,5 мкг суммарной РНК, в ПЦР брали 0,25 мкл итоговой кДНК/реакцию. Полимеразную цепную реакцию в реальном

времени на GR, ПГ и ферменты биосинтеза ГС проводили на приборе CFX-96 (BioRad, США) с использованием HS-qPCR SYBR Blue (Biolabmix, Россия) и праймеров (табл. 1). Программа амплификации: предварительная денатурация 95 °С 5 мин, затем денатурация 95 °С 10 с, отжиг 59 °С 15 с, элонгация 72 °С 30 с в течение 39 циклов; суммарный объем реакции – 20 мкл. Уровень экспрессии определяли по формуле:

$$E = (2^{\Delta Ct}) \cdot 1000,$$

где $\Delta Ct = Ct(\text{Gapdh}) - Ct(\text{гена})$ для каждого образца (животного).

Для статистического анализа использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Вестерн-блоттинг. Ткань головного мозга мыши гомогенизировали в RIPA буфере (ThermoFisher Scientific, США) с ингибиторами протеаз cOmplete Mini (Roche, Германия). Вертикальный электрофорез проводили в 7,5 % полиакриламидном геле, белки переносили на мембрану Immobilon-PVDF (Millipore, Германия) и проводили блокировку с использованием 5 % сухого молока (BioRad, США) в PBST в течение 60 мин. Затем мембраны инкубировали с первичными кроличьими антителами к белкам GR (ab183127, Abcam, Великобритания, 1 : 15000) или Gapdh (ab181602, Abcam, Великобритания, 1 : 5000), а далее – с вторичными антителами (ab3578, Abcam, Великобритания, 1 : 10000) в течение 60 мин при комнатной температуре. Сигнал визуализировали с использованием Amersham ECL Prime (Cytiva, США), детекцию проводили в Bio Rad Chemidoc (BioRad, США). Полученные

данные обрабатывали с помощью ImageLab 6.0.1 (BioRad, США). Статистический анализ проводили в программе MS Excel (Microsoft, США).

Гистологическое исследование. Для гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) анализов использовали полушарие головного мозга мышей, которое фиксировали в забуференном 10 % растворе формалина и заключали в парафин (BioVitrum, Россия). Парафиновые срезы толщиной 3–4 мкм монтировали на предметные стекла, окрашивали гематоксилином и эозином (BioVitrum, Россия). На коронарных срезах (полученных на расстоянии $5 \pm 0,5$ мм от Bregma) исследовали неокортекс в пределах первичной (M1) и вторичной (M2) моторной коры и первичной соматосенсорной коры (SIHL, SIFL, S1BF и иногда S1DZ), начиная от центральной борозды по окружности полушария. Окрашенные препараты анализировали с использованием микроскопа AxioScore A1 (Zeiss, Германия) при $\times 400$.

Иммуногистохимический анализ. Для оценки содержания и локализации GR проводили демаскировку антигена с использованием Dewax and HIER Buffer H (Thermo Fisher Scientific, США) и непрямую иммунопероксидазную реакцию с первичными антителами против GR (ab. 183127, Abcam, Великобритания, 1 : 1000). Для визуализации продуктов реакции применяли Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit (ab. 64264, Abcam, Великобритания). При подсчете клеток, имеющих ядерную экспрессию GR, тестовая площадь каждого поля зрения была равна 5000 мкм², на каждом препарате анализировали не менее 5 неперекрывающихся полей зрения. Экспрессия GR

Таблица 1. Последовательности праймеров для генов, кодирующих коровые белки протеогликанов и ферменты биосинтеза гепарансульфата, мыши
Table 1. Primer sequences for PG core proteins- and HS biosynthetic enzymes-coding mouse genes

Ген Gen	Обозначение гена Gene designation	Последовательность праймеров The sequence of primers
Синдекан-1 Syndecan-1	<i>Sdc1</i>	F 5'-GGTCTGGGCAGCATGAGAC-3' R 5'-GGAGGAACATTTACAGCCACA-3'
Синдекан-3 Syndecan-3	<i>Sdc3</i>	F 5'-GGTCAGGCTCTGGCTACTTC-3' R 5'-GGGACTGGTGACTGGTTCAG-3'
Глипикан-1 Glypican-1	<i>Gpc1</i>	F 5'-CTTTAGCCTGAGCGATGTGC-3' R 5'-GGCCAAATTCTCCTCCATCT-3'
Перлекан Perlecan	<i>Hspg2</i>	F 5'-CCGTGCTATGGACTTCAACG-3' R 5'-TGAGCTGTGGAGGGTGTATG-3'
Декорин Decorin	<i>Dcn</i>	F 5'-CCCCTGATATCTATGTGCCC-3' R 5'-GTTGTGTCCGGGTGGAAATC-3'
Бигликан Biglycan	<i>Bgn</i>	F 5'-GCCTGACAACCTAGTCCACC-3' R 5'-CAGCAAGGTGAGTAGCCACA-3'
Люмикан Lumican	<i>Lum</i>	F 5'-GCTCGAGCTTGATCTCTCCT-3' R 5'-CAGTGGTCCCAGGATCTTACA-3'
Бревикан Brevican	<i>Bcan</i>	F 5'-GTGGAGTGGCTGTGGCTC-3' R 5'-AACATAGGCAGCGGAAACC-3'

Окончание табл. 1

The end of table 1

Ген Gen	Обозначение гена Gene designation	Последовательность праймеров The sequence of primers
Нейрокан Neurocan	<i>Ncan</i>	F 5'-CCAGCGACATGGGAGTAGAT-3' R 5'-GGGACACTGGGTGAGATCAA-3'
Агрекан Aggrecan	<i>Acan</i>	F 5'-TTCGCAGGGATAAAGGACTG-3' R 5'-CCCTCAGAGTCACAAAGACCA-3'
Версикан Versican	<i>Vcan</i>	F 5'-GGAGGTCTACTTGGGGTGAG-3' R 5'-GGGTGATGAAGTTTCTGCGAG-3'
Хондроитинсульфат протеогликан-4/NG2 Cspg4/Ng2	<i>Cspg4/NG2</i>	F 5'-TCTTACCTTGGCCCTGTTGG-3' R 5'-ACTCTGGTCAGAGCTGAGGG-3'
Хондроитинсульфат протеогликан-5 Cspg5	<i>Cspg5</i>	F 5'-TTGGCTTCGTCAGGCACAAT-3' R 5'-GTTACACCTGCAGAAAGCCCC-3'
CD44	<i>CD44</i>	F 5'-CAAGTTTTGGTGGCACACAG-3' R 5'-AGCGGCAGGTTACATTCAA-3'
Фосфакан-1 Phosphacan-1	<i>Ptprz1</i>	F 5'-CCCCTGAAGATGCCGAAC-3' R 5'-GTCGTGGTAGAAACCTGGGG-3'
Ext1	<i>Ext1</i>	F 5'-AGCACAAGGATTCTCGCTGT-3' R 5'-GGAACCAGACAGAAAGTGGC-3'
Ext2	<i>Ext2</i>	F 5'-ACATCCCACAGAGGCAGATT3' R 5'-GATCTGTAGGGTGGCCAGAG3'
Ndst1	<i>Ndst1</i>	F 5'-CACACAGAACGAACACGC-3' R 5'-CCCGTTGATGATCTTGTCC-3'
Ndst2	<i>Ndst2</i>	F 5'-TGGTCCAAGGAGAAAACCTG-3' R 5'-GCAGGCTCAGGAAGAAGTGA-3'
Glee	<i>Glee</i>	F 5'-GCTCGCTTCAGTTTTCTCA-3' R 5'-TCTTAGTACATTTCTGGCTTCAATTC-3'
Hs2st1	<i>Hs2st1</i>	F 5'-TCTTGGAGAACCAGATCCAGA3' R 5'-ATGGCGCTGTTCAATTTCTC3'
Hs3st1	<i>Hs3st1</i>	F 5'-GGAGGAGCATTACAGCCAAG-3' R 5'-TTTGGGCGAAGTGAATAGG-3'
Hs3st2	<i>Hs3st2</i>	F 5'-AACTACGGACGAGGACTGGA-3' R 5'-ATTACCTCTGGGGCAAATCC-3'
Hs6st1	<i>Hs6st1</i>	F 5'-TGGCTCTTCTCTCGCTTCTC-3' R 5'-GTCTAGCACACCGGGCAC-3'
Hs6st2	<i>Hs6st2</i>	F 5'-CCAGGCTGAGACCTTCCAG-3' R 5'-TGTGGAGGATGGAGAGTTGG-3'
Sulf1	<i>Sulf1</i>	F 5'-CCTTGCAGGGAAGCTTCAA-3' R 5'-GCTGAGTTCTGGGAGCTTGA-3'
Sulf2	<i>Sulf2</i>	F 5'-GTTCCCTCCGCGATCTAGC-3' R 5'-GTGTCGTGAGGATGGGATTC-3'
Hpse	<i>Hpse</i>	F 5'-GGCTAGAGGCTTATCTCCTGC-3' R 5'-TCTTTCTTCGGAAGTCGGTT-3'
Глюкокортикоидный рецептор Glucocorticoid receptor	<i>Nr3c1</i>	F 5'-ACGGTGGCAGTGTGAAATTG-3' R 5'-GACCTCCAAGGACTCTCGTT-3'
Gapdh	<i>Gapdh</i>	F 5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGT-3' R 5'-TTGATGGCAACAATCTCCAC-3'

определена в каждом образце по визуально-аналоговой шкале, согласно S. Franceschi и соавт. [20]: в образце рассчитывали процент ядер клеток с различной интенсивностью окраски (3 балла – сильная, 2 балла – умеренная и 1 балл – слабая).

Поскольку во всех группах ядерная экспрессия GR была практически тотальной и различалась только по интенсивности окрашивания клеточных ядер, после полуколичественной оценки экспрессии по 3-балльной шкале каждое животное во всех группах было отнесено к одному из 3 паттернов фенотипа, которые расценивались как высокий, умеренный и низкий. Если более чем 50 % полей зрения в препарате занимали клетки с ядерной экспрессией GR в 3 балла, его относили к высокому фенотипу, если >50 % полей зрения – к умеренному фенотипу. Если полей зрения с экспрессией маркера в 3, 2 и 1 балл было одинаковое количество, такой фенотип считался низким. Окрашенные препараты анализировали при $\times 400$.

Определение содержания общих и высокосульфатированных гликозаминогликанов. Содержание ГАГ в препаратах определяли с помощью окрашивания парафиновых срезов альциановым синим с различным pH (2,5 для общих ГАГ и 1,0 для ГАГ с высоким содержанием сульфатированных групп) (BioVitrum, Россия) по протоколу, указанному в инструкции производителя, с добавлением гематоксилина Эрлиха. Окрашенные препараты анализировали с использованием микроскопа AxioScore A1 (Zeiss, Германия) при $\times 400$.

Дот-блот анализ на содержание гепарансульфатов и хондроитинсульфатов. Ткань головного мозга мыши гомогенизировали в RIPA буфере (ThermoFisher Scientific, США) с ингибиторами протеаз cOmplete Mini (Roche, Германия), наносили полученные лизаты на активированную в 95 % этаноле мембрану PVDF (Millipore Immobilon-P, Германия), блокировали в 5 % обезжиренном молоке в PBST (BioRad, США), инкубировали с первичными антителами к GC (MAВ2040, Millipore, Германия, 1: 100) или XC (кат. № 8035, Sigma-Aldrich, США, 1: 100), а затем с вторичными антителами (кат. № 150077, ThermoFisher Scientific, США, 1: 1000) в течение 60 мин при комнатной температуре. Сигнал проявляли с использованием Amersham ECL Prime (Cytiva, США). Детекцию проводили в BioRad Chemidoc, полученные данные обрабатывали с помощью ImageLab 6.0.1 (BioRad, США).

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы MS Excel 7.0 (Microsoft, США). Проверку соответствия выборок закону нормального распределения оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова в программе OriginPro 8.5 (OriginLab, США). Статистическую значимость определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа, для изучения взаимосвязи параметров определяли коэффициент Пирсона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения воздействия Dex на морфологические и молекулярные характеристики ткани головного мозга мышей были сформированы экспериментальные группы, в которых животные получали однократную инъекцию физиологического раствора (контрольная группа, $n = 15$) или различные дозы Dex (0,1; 1; 2,5 и 10 мг/кг; в каждой группе 24 животных) и исключались из эксперимента на 1, 3, 7 или 10-е сутки после введения Dex (6 животных на каждую временную точку). Такие временные точки для анализа эффектов Dex были выбраны для того, чтобы изучить отдаленные молекулярные последствия, которые могут быть инициированы однократным введением препарата, несмотря на его быстрое (3–8 ч) выведение из плазмы крови. Дозировки Dex подобраны, согласно данным литературы [18, 19], с целью их максимально возможного соответствия применяемым в клинике (0,1–1 мг/кг) и заведомо более высоким (2,5–10 мг/кг) дозам GC.

Чтобы убедиться в отсутствии очевидной токсичности выбранных дозировок Dex, был проведен гистологический анализ препаратов ткани головного мозга мышей в контрольной и экспериментальных группах. Окрашивание гематоксилином и эозином не выявило выраженных структурных изменений ткани неокортекса у животных, получавших Dex, и лишь при воздействии больших дозировок (2,5 и 10 мг/кг) наблюдались очаговые изменения тинкториальных свойств ядер и цитоплазмы клеточных элементов нервной ткани. В целом эти данные подтвердили отсутствие значительной токсичности выбранных дозировок данного препарата на кору головного мозга мышей.

Влияние дексаметазона на экспрессию и содержание глюкокортикоидного рецептора в ткани головного мозга мышей. Основным молекулярным механизмом передачи сигнала от GC является их связывание с GR, который транслоцируется в клеточное ядро и запускает механизмы трансактивации и транскрепции. Чтобы изучить, насколько однократная доза Dex влияет на экспрессию и/или содержание GR в клетках головного мозга, уровень экспрессии и содержания GR был определен с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени и Вестерн-блоттинга (рис. 1).

Согласно данным ОТ-ПЦР, однократное введение Dex в низких дозировках (0,1 и 1 мг/кг) приводило к кратковременному повышению уровня экспрессии матричной РНК (мРНК) GR в 1,5 раза ($p < 0,05$) на 1–3-и сутки после введения препарата, который возвращался к нормальным показателям к 7–10-м суткам (см. рис. 1а). При этом на белковом уровне GR демонстрировал тенденцию к стабильному дозозависимому повышению (на 30–40 %) во всех изученных временных точках, хотя данные изменения не были статистически достоверны (см. рис. 1б, в).

Однако, помимо содержания GR в клетках, большое значение имеют его распределение по клеточным

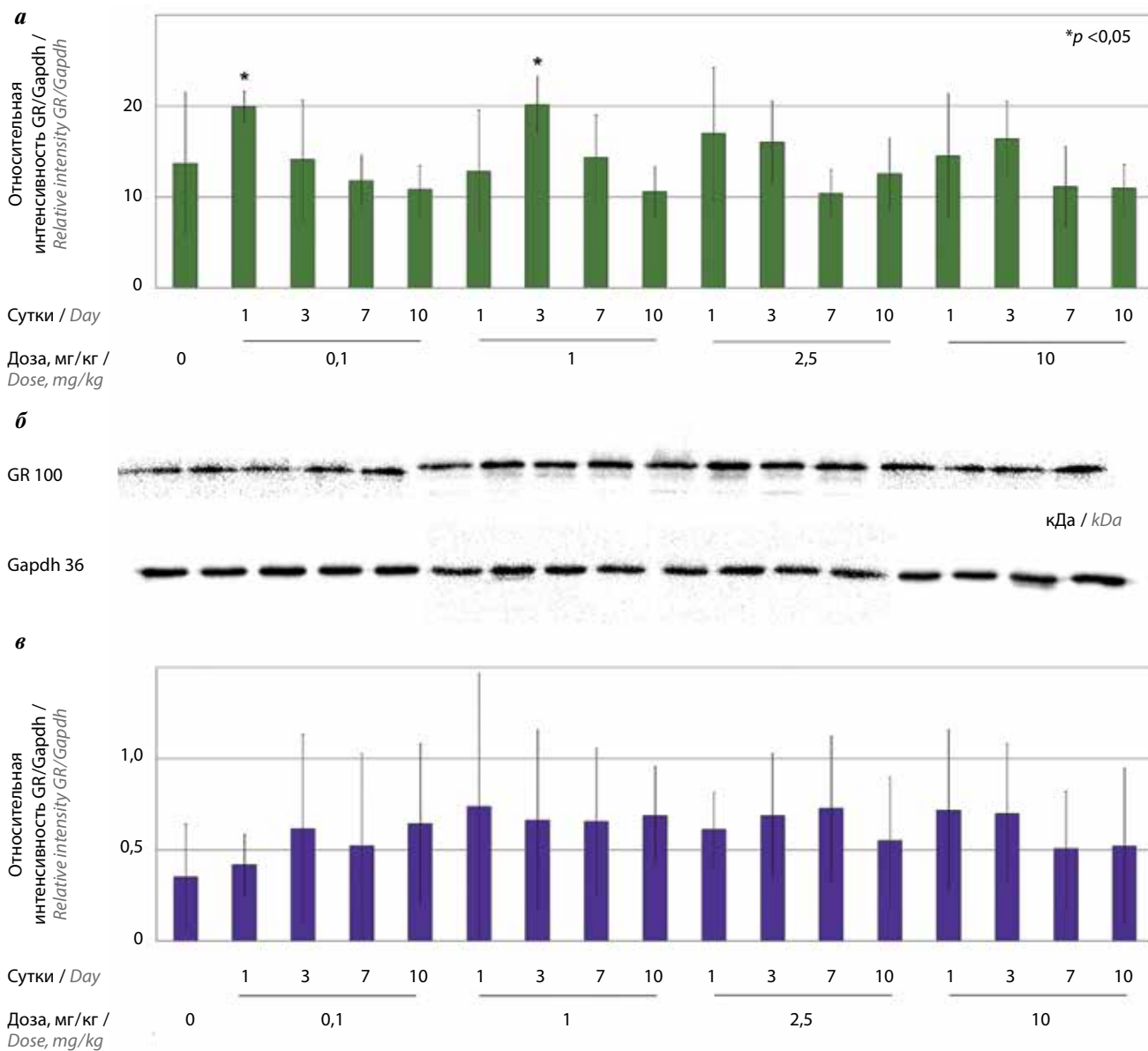


Рис. 1. Экспрессия глюкокортикоидного рецептора (GR) в коре головного мозга под воздействием однократного введения дексаметазона: а – уровень матричной РНК. GR, полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой в реальном времени, нормировка на Gapdh. ANOVA + тест Фишера; б – содержание GR, Вестерн-блоттинг, оригинальные данные; в – полуколичественный анализ Вестерн-блоттинга на GR по отношению к Gapdh. Обсчет – ImageLab 6.0.1, ANOVA + тест Фишера. Контроль – мыши, получавшие физиологический раствор
Fig. 1. Expression of the glucocorticoid receptor (GR) in the cerebral cortex after a single injection of dexamethasone; а – GR matrix RNA level, real-time polymerase chain reaction, normalized for Gapdh. ANOVA + Fisher test; б – GR protein content, Western blotting, original data; в – semiquantitative Western blotting analysis of GR. Calculation – ImageLab 6.0.1, ANOVA + Fisher test. Control – mice treated with saline solution

компартаментам и степень интенсивности окрашивания в клеточных ядрах. Для изучения этого вопроса было проведено ИГХ-окрашивание образцов ткани мозга на GR. В силу того, что согласно результатам Вестерн-блоттинга Дех оказывал влияние на содержание GR только при более высоких дозировках и этот эффект имел отсроченный характер, ИГХ-анализ был проведен для мышей, получавших 2,5 и 10 мг/кг препарата и выведенных из эксперимента через 7 и 10 сут после инъекции. Важно отметить, что во всех группах ядерная экспрессия GR была практически тотальной и различалась только по интенсивности DAB-окрашивания клеточных ядер, которые демонстриро-

вали высокую гетерогенность по этому параметру в каждом препарате мозга. Поэтому для оценки содержания GR мы использовали интегральный показатель, который одновременно учитывал степень интенсивности ядерного окрашивания (от 1 до 3 баллов) и процент клеток, обладающих интенсивностью в 1,2 или 3 балла [20]. Он выражался как фенотип с высоким (>50 % полей зрения в препарате занимали клетки с ядерной экспрессией GR в 3 балла), умеренным (medium – <50 % полей зрения с экспрессией маркера в 3 балла) и низким (low – экспрессия только в 1 и 2 балла) содержанием GR. Распределение животных в зависимости от уровня GR представлено на рис. 2.



Рис. 2. Содержание глюкокортикоидного рецептора (GR) в коре головного мозга мышей до и после однократного введения различных дозировок дексаметазона. Процентное распределение отражает количество животных в экспериментальной группе, относящихся к высокому, умеренному или низкому фенотипам по содержанию GR в коре головного мозга мышей. Экспериментальные животные получали однократную инъекцию дексаметазона в дозах 2,5 и 10 мг/кг. Сроки выведения мышей из эксперимента – 7-е и 10-е сутки

Fig. 2. Glucocorticoid receptor (GR) content in mouse brain before and after administration of various dexamethasone dosages. Percentage of animals belonging to the high, medium and low phenotypes according GR content in mouse brain. Experimental animals received a single dexamethasone injection at a dosage of 2.5 and 10 mg/kg. Animals were sacrificed in 7 and 10 days after injection

Было обнаружено, что однократное введение Dex мышам вызывало изменение фенотипа животных по содержанию GR в ткани головного мозга: при использовании обеих дозировок доля мышей с высокой интенсивностью экспрессии GR уменьшалась, тогда как увеличивалась доля животных, относящихся к группам с низким и умеренным фенотипами. При дозировке 2,5 мг/кг наиболее выраженный эффект Dex проявлялся на 7-е сутки после инъекции, а при дозировке 10 мг/кг – на 10-е сутки.

Таким образом, однократное введение Dex в низких дозировках оказывало кратковременное влияние на уровень мРНК GR (на 1–3-и сутки), в то время как более высокие дозировки вызывали изменение фенотипа мышей по содержанию GR в ткани головного мозга.

Влияние дексаметазона на экспрессию протеогликанов и ферментов биосинтеза гепарансульфата в ткани головного мозга. Для изучения влияния однократного введения Dex на молекулярные характеристики ВКМ ткани головного мозга мышей был определен профиль экспрессии генов, вовлеченных в биосинтез коровых белков основных ПГ и их углеводных цепей ГС. Уровень мРНК гепарансульфат протеогликанов (синдекан-1, синдекан-3, глипикан-1, перлекан), хондроитинсульфат протеогликанов (декорин, бигликан, бревикан, нейрокан, версикан, агрекан, люмикан, CD44, NG2/CSPG4, CSPG5, фосфакан/PPTRZ1) (рис. 3) и генов, вовлеченных в биосинтез углеводных молекул ГС (рис. 4), был выявлен с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

Общий уровень транскрипционной активности генов, кодирующих основные ПГ ткани мозга (см. рис. 3а), показал тенденцию к умеренному повышению в ткани головного мозга на 1–3-и сутки после инъекции Dex с последующим возвращением к контрольному уровню к 7–10-м суткам, независимо от дозы. Основной вклад в общий уровень транскрипционной активности изучаемых генов вносило увеличение уровней экспрессии синдекана-3 (+2–3 раза; $p < 0,05$), перлекана (+2–3 раза; $p < 0,05$), фосфакана (+2–3 раза; $p < 0,05$) и нейрокана (+2–3 раза; $p < 0,05$), которые,

таким образом, являются наиболее чувствительными к воздействию Dex (см. рис. 3б). Также было отмечено снижение экспрессии версикана (–2 раза; $p < 0,05$) на 7-е и 10-е сутки почти для всех дозировок препарата.

Введение Dex приводило также к быстрому (на 1–3-и сутки) кратковременному повышению общей транскрипционной активности системы биосинтеза ГС (в 1,5–2 раза) в коре головного мозга мышей (рис. 4а). В основном этому способствовали такие гены, как *Ndst1*, *Glce*, *Hs2st1*, *Hs6st1*, *Sulf1* и *Sulf2*, уровень экспрессии которых повышался в 1,5–2 раза на 1–3-и сутки и возвращался к нормальным значениям к 7–10-м суткам после введения Dex (рис. 4б).

Влияние дексаметазона на экспрессию протеогликанов и ферментов биосинтеза гепарансульфата содержания гликозаминогликанов и степени их сульфатирования в коре головного мозга. Поскольку ПГ являются сложными белково-углеводными молекулами, для функциональной активности которых принципиально важны наличие углеводных цепей ГАГ и степень их модификации, особое внимание было уделено содержанию данных макромолекул в ткани мозга до и после воздействия Dex. Для оценки содержания общих и высокосульфатированных ГАГ в коре левого полушария головного мозга мышей срезы окрашивали альциановым синим с различным pH (2,5 и 1,0, соответственно) (рис. 5).

Однократное введение Dex приводило к быстрому повышению содержания ГАГ в корковых структурах головного мозга мышей уже через сутки (особенно при низких дозировках), которое продолжало дозозависимо усиливаться в течение последующих дней, достигая максимума к 10-м суткам при самой высокой дозировке препарата (10 мг/кг) (рис. 5а). В отличие от общих ГАГ однократное применение Dex в низких дозировках (0,1 и 1 мг/кг) слабо влияло на содержание высокосульфатированных ГАГ в коре головного мозга мышей, хотя наблюдалась тенденция к увеличению интенсивности сигнала (синее окрашивание) в молекулярном слое (рис. 5б). Использование более высоких дозировок этого препарата (2,5 и 10 мг/кг) приводило

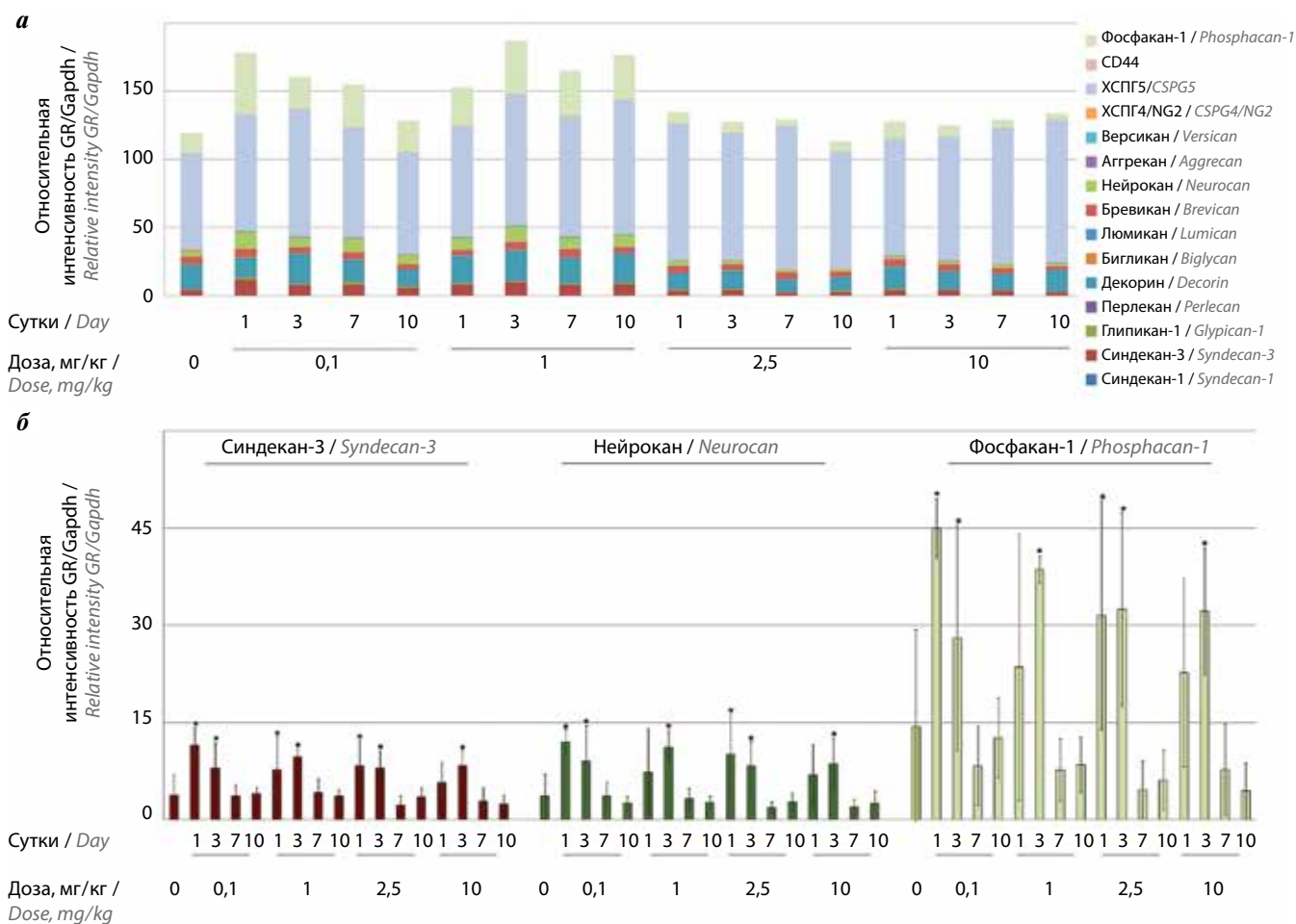


Рис. 3. Относительная экспрессия генов протеогликанов (ПГ) в коре головного мозга под воздействием однократного введения дексаметазона: а – общая транскрипционная активность изучаемых генов, представляющая собой суммарный показатель способности клеток экспрессировать коровые белки основных ПГ; б – уровень матричной РНК индивидуальных ПГ. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени, нормировка на *Gapdh*. Контроль – мыши, получавшие физиологический раствор. ANOVA + тест Фишера. ХСПГ – хондроитинсульфат протеогликан

Fig. 3. Relative expression of proteoglycans (PGs) genes in the cerebral cortex after a single dexamethasone injection: a – a total transcriptional activity of the studied genes is an indicator of the ability of cells to express the core proteins of the main PGs; б – level of matrix RNA of individual PGs. Polymerase chain reaction with reverse transcription normalized to *Gapdh*. Control – mice treated with saline solution. ANOVA + Fisher's test. CSPG5 – chondroitin sulfate proteoglycan

к повышению содержания высокосульфатированных ГАГ на 3–10-е сутки после инъекции, причем если в 1-е сутки сигнал концентрировался в основном в молекулярном слое коры, то в последующие сутки его интенсивность увеличивалась и он все равномернее распределялся в более глубоких ее слоях (к 10-м суткам) (рис. 5б).

Для более детального анализа и определения, какие именно ГАГ вносят основной вклад в значительное повышение содержания общих ГАГ под действием Дех, был использован метод дот-блот анализа с применением специфических антител к углеводным эпитопам ХС и ГС (рис. 6).

Дексаметазон не оказывал заметного влияния на содержание ГС в ткани мозга, хотя при высоких дозировках (2,5 и 10 мг/кг) происходило отсроченное (на 10-е сутки) статистически значимое повышение его уровня, что согласуется с увеличением содержания

общих и высокосульфатированных ГАГ в мозге животных, получавших Дех (см. рис. 6). При этом влияние Дех на ХС имело противоположный характер: приводило к снижению их содержания, которое достигало максимального значения на 7–10-е сутки после введения препарата (рис. 6б). Интересно, что такой эффект оказывали минимальная (0,1 мг/кг) и максимальная (10 мг/кг) дозировки препарата, в то время как промежуточные дозировки не приводили к достоверным изменениям уровня ХС в ткани мозга.

Влияние дексаметазона на корреляцию экспрессии глюкокортикоидного рецептора с экспрессией генов протеогликанов и ферментов биосинтеза гепарансульфатов. Полученные данные свидетельствуют о значительных изменениях в экспрессии различных генов (*GR/Nr3c1*, генов коровых белков ПГ и ферментов биосинтеза ГС) и содержании общих и высокосульфатированных ГАГ. Для выявления возможной взаимосвязи изучаемых

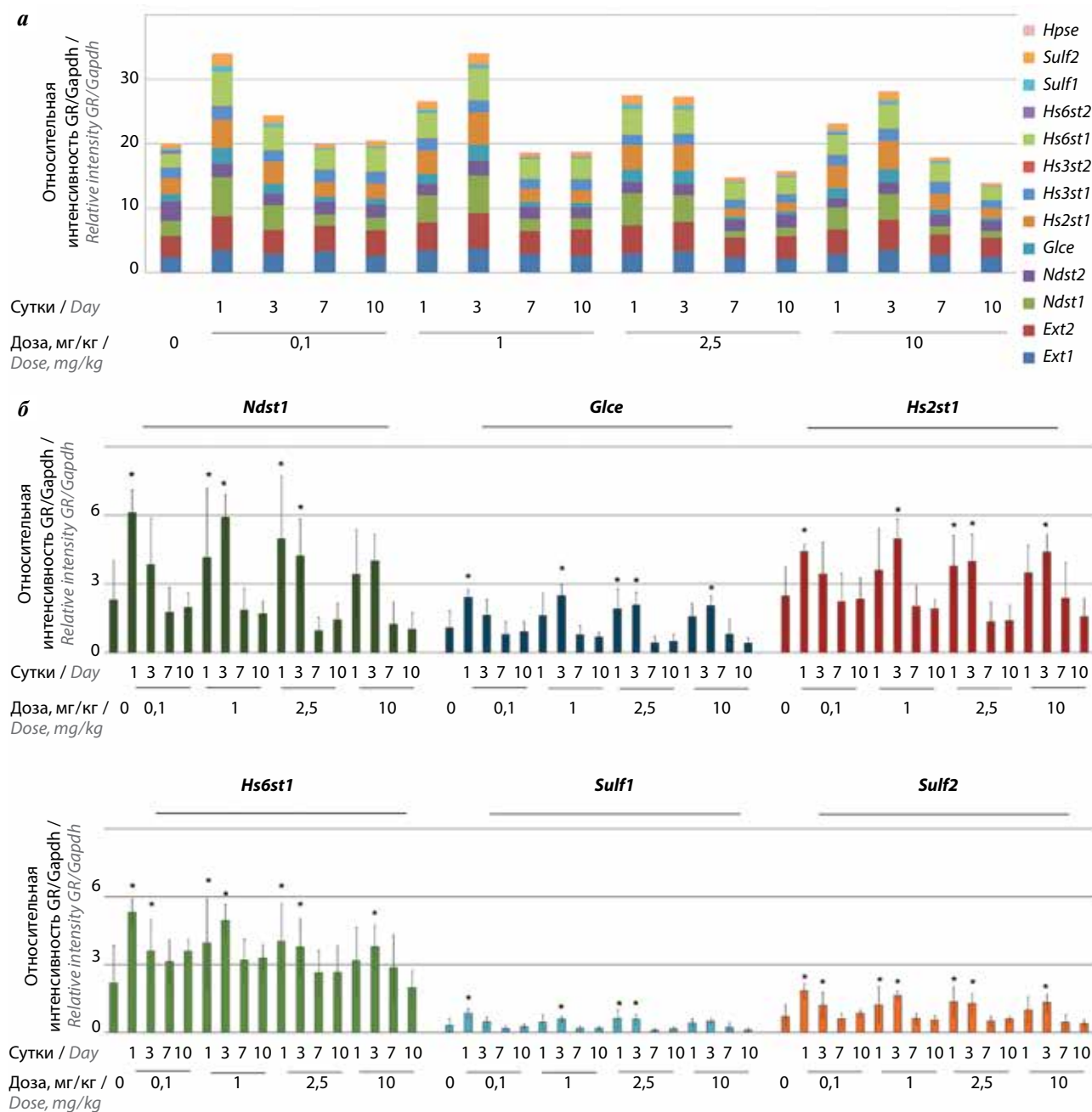


Рис. 4. Относительная экспрессия генов системы биосинтеза гепарансульфатов (ГС) в коре головного мозга после однократного введения дексаметазона: а – общая транскрипционная активность (суммарный показатель уровней экспрессии отдельных генов биосинтеза ГС); б – уровень матричной РНК индивидуальных генов биосинтеза. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени, нормировка на *Gapdh*. Контроль – мыши, получавшие физиологический раствор. ANOVA + тест Фишера

Fig. 4. Relative expression of the heparan sulfate (HS) biosynthesis-involved genes in the cerebral cortex after a single dexamethasone injection; а – total transcriptional activity (a summary measure of the expression levels of individual HS biosynthesis genes); б – level of matrix RNA of individual genes. Real-time polymerase chain reaction with reverse transcription normalized to *Gapdh*. Control – mice treated with saline solution. ANOVA + Fisher's test

параметров был проведен их корреляционный анализ с использованием программы MS Excel 7.0 (рис. 7).

Корреляционный анализ показал, что для нормальной ткани головного мозга характерен высокий уровень корреляции экспрессии GR с большинством генов, вовлеченных в биосинтез ПГ (20 из 28 генов имели коэффициент корреляции с уровнем GR $r = 0,81–0,97$; $p < 0,05$). Однако введение Dex приводило к исчезновению этой корреляционной связи. Данный эффект

зависел от дозировки препарата и усиливался со временем, практически полностью исчезая к 7–10-м суткам после введения Dex (0–2 из 28 генов для дозировок 1–10 мг/кг имели коэффициент корреляции с уровнем GR $r = 0,82–0,87$; $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенное исследование подтвердило, что GR активно экспрессируется в молекулярном, наружном

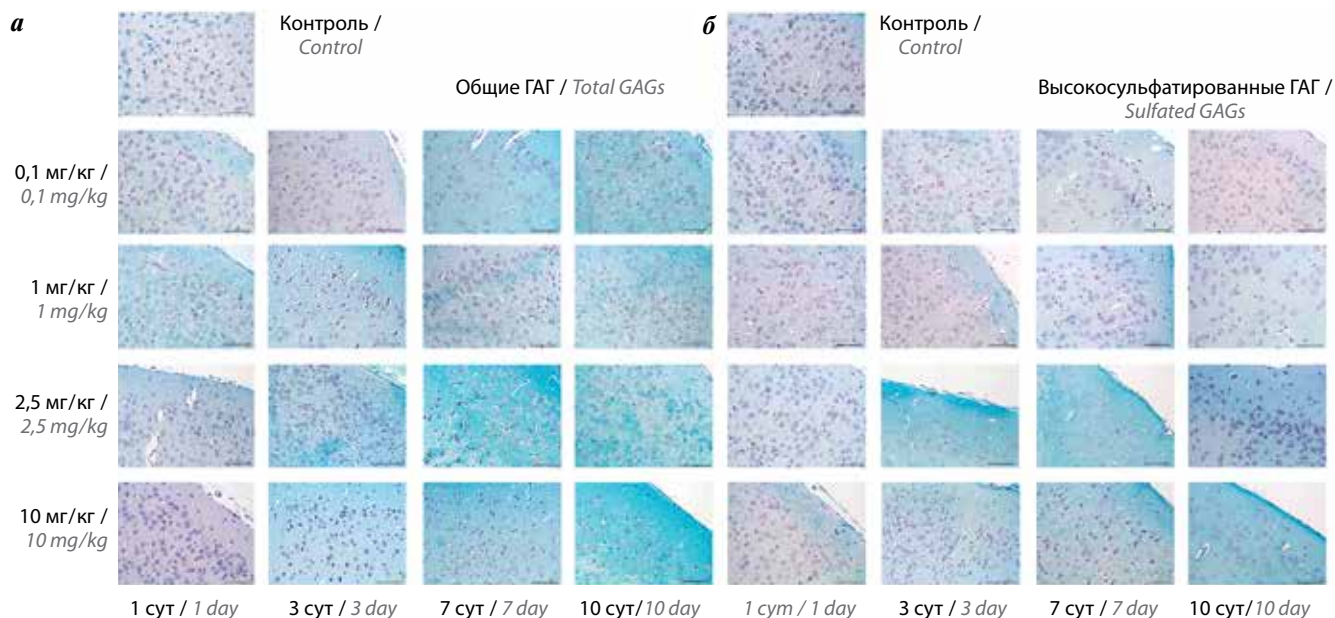


Рис. 5. Содержание общих и высокосульфатированных гликозаминогликанов (ГАГ) в коре головного мозга мышей после однократного введения дексаметазона в дозировке 0,1; 1; 2,5 и 10 мг/кг. Характеристические микрофотографии коры головного мозга мышей каждой группы. Окраска альциановым синим при pH 2,5 (а) и 1,0 (б) соответственно. Сроки выведения животных из эксперимента – 1, 3, 7 и 10-е сутки. $\times 400$
Fig. 5. The content of total glycosaminoglycans (GAGs) in mouse cerebral cortex after a single dexamethasone injection at a dosage of 0,1; 1; 2,5 and 10 mg/kg. Characteristic microphotographs. Alcian blue staining at pH 2.5 (a) and 2.5 (б), respectively. Animals were sacrificed in 7 and 10 days after injection. $\times 400$

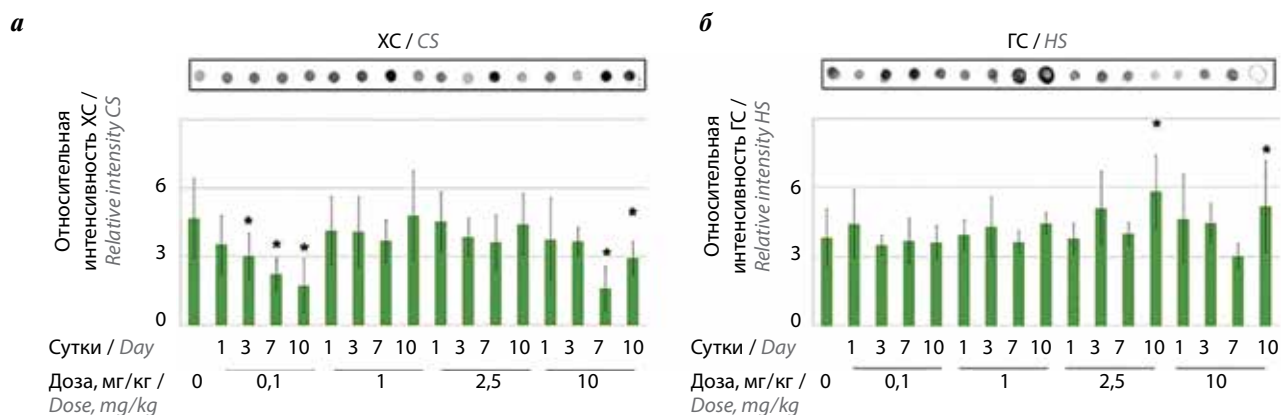


Рис. 6. Содержание углеводных молекул хондроитинсульфатов (ХС) и гепарансульфатов (ГС) в коре головного мозга мышей после однократного введения дексаметазона: а – оригинальные микрофотографии дот-блот анализа содержания ХС и ГС; б – полуколичественный анализ содержания гликозаминогликанов, полуколичественный обсчет – ImageLab 6.0.1, ANOVA + тест Фишера
Fig. 6. The content of chondroitin sulfate (CS) and heparin sulfate (HS) carbohydrate molecules in the cerebral cortex of mice after a single dexamethasone injection: а – original microphotographs of dot-blot analysis of CS and HS; б – semiquantitative analysis of glycosaminoglycans content, semiquantitative analysis – ImageLab 6.0.1, ANOVA + Fisher's test

зернистом и пирамидном слоях коры головного мозга мышей, что согласуется с данными литературы о повсеместной экспрессии GR в нервной ткани. Экспрессия GR в сенсорных нейронах может варьировать в зависимости от его подтипа [21]; самый высокий уровень экспрессии имеют нейроны гиппокампа CA1 [22]. Помимо нейронов, все типы глии экспрессируют GR [23], а именно олигодендроглия [24], астроглия [25] и микроглия [26].

Однако в отношении влияния Dex на экспрессию GR однозначное сравнение с данными литературы затруднено. В нашей работе изучены эффекты однократного введения Dex и продемонстрировано, что

экспрессия GR реагирует на этот препарат быстрым кратковременным повышением (на 1–3-и сутки) с возвратом к контрольному уровню на 7–10-е сутки. Многократное подкожное введение Dex (5 мг/кг) крысам в течение 7–28 сут приводит к снижению экспрессии GR α в нейронах гиппокампа как на уровне мРНК, так и на белковом уровне [27]. В модельной системе *ex vivo* обработка органотипических срезов головного мозга крысы Dex (5 мкМ) в течение 3 сут вызывает снижение экспрессии GR в нейронах гиппокампа, что может вносить свой вклад в дегенерацию нейронов и развитие болезни Альцгеймера [28]. В целом результаты нашего исследования дополняют данные литературы,

<i>Sdc1</i>	0,76	0,29	0,91	0,97	0,09	0,86	0,33	0,73	-0,35	0,86	0,80	0,57	0,65	0,50	-0,41	0,55	0,27
<i>Sdc3</i>	0,94	-0,21	0,97	0,92	0,87	0,96	0,00	0,88	-0,16	0,88	0,84	0,89	0,15	0,64	0,68	0,96	0,54
<i>Gpc1</i>	0,94	0,22	0,85	0,79	0,13	0,97	-0,19	0,82	0,58	0,68	0,65	0,81	0,38	0,79	0,73	0,90	0,83
<i>Hspg2</i>	0,94	-0,14	0,76	0,97	0,66	0,93	0,59	0,73	-0,51	0,76	0,72	0,58	0,59	0,77	0,52	0,14	-0,14
<i>Dcn</i>	0,74	-0,42	0,50	0,17	0,85	0,84	0,12	0,47	0,09	0,27	0,02	0,31	0,27	0,06	0,38	-0,10	0,67
<i>Bgn</i>	0,87	-0,02	0,92	0,39	0,59	0,92	0,29	0,41	0,71	0,93	0,81	0,14	0,04	0,79	0,28	0,99	0,56
<i>Lum</i>	0,90	0,57	0,68	0,09	0,27	0,78	-0,47	0,27	0,04	0,89	0,71	0,80	-0,21	0,58	0,73	0,25	0,41
<i>Bcan</i>	0,94	0,16	0,81	0,42	0,37	0,89	0,77	0,80	-0,32	0,83	0,67	0,79	0,09	0,84	-0,16	0,79	0,34
<i>Ncan</i>	0,95	-0,12	0,88	0,93	0,76	0,90	0,74	0,87	0,82	0,81	0,83	0,75	0,55	0,78	0,70	0,90	0,48
<i>Acan</i>	0,75	-0,19	0,80	0,58	0,41	0,89	-0,36	0,69	-0,46	0,50	0,74	-0,57	-0,56	0,54	0,45	0,80	0,09
<i>Vcan</i>	0,81	-0,44	0,89	0,86	0,63	0,98	0,24	0,89	0,80	0,78	0,72	0,66	-0,02	0,74	0,62	0,89	0,48
<i>Cspg4/Ng2</i>	0,70	0,46	0,67	0,46	0,61	0,91	0,18	0,56	0,29	0,87	0,87	0,54	0,49	0,83	0,83	0,48	0,11
<i>Cspg5</i>	0,88	-0,01	0,28	-0,12	0,34	0,92	0,74	0,02	0,47	0,85	0,76	-0,18	0,10	0,68	-0,12	-0,87	-0,67
<i>Cd44</i>	0,92	0,32	0,61	0,83	0,84	0,94	-0,22	0,72	-0,05	0,89	0,52	0,75	0,33	0,95	0,62	0,97	-0,72
<i>Ptprz1</i>	0,83	0,23	0,93	0,92	0,62	0,98	-0,70	0,89	0,48	0,89	0,81	0,49	-0,19	0,86	0,47	0,95	0,54
<i>Ext1</i>	0,94	-0,15	0,89	0,67	0,42	0,91	0,57	0,79	0,45	0,67	0,62	0,67	0,64	0,81	0,58	0,80	0,87
<i>Ext2</i>	0,94	0,54	0,99	0,91	0,88	0,94	0,88	0,69	-0,48	0,90	0,87	0,61	-0,11	0,82	0,48	0,90	0,62
<i>Ndst1</i>	0,97	-0,28	0,96	0,90	0,39	0,97	0,55	0,89	-0,16	0,79	0,89	0,82	0,00	0,81	0,70	0,98	0,57
<i>Ndst2</i>	0,89	0,05	0,95	0,72	0,88	0,91	0,88	0,40	0,10	0,79	0,93	-0,30	-0,18	0,71	0,49	0,86	-0,43
<i>Glce</i>	0,94	0,92	0,93	0,88	0,58	0,97	0,86	0,89	0,56	0,85	0,93	0,54	-0,01	0,89	0,62	0,97	0,53
<i>Hs2st1</i>	0,97	0,00	0,99	0,92	0,63	0,92	0,48	0,92	0,62	0,82	0,89	0,62	0,30	0,85	0,58	0,98	0,70
<i>Hs3st1</i>	0,63	0,24	0,42	0,31	0,78	0,44	0,61	-0,03	0,25	0,50	0,41	0,40	-0,76	0,05	-0,20	0,39	-0,77
<i>Hs3st2</i>	0,21	0,08	0,76	0,52	0,24	0,80	0,82	0,09	0,25	0,36	0,63	0,28	0,45	0,40	0,76	-0,67	-0,64
<i>Hs6st1</i>	0,94	0,54	0,92	0,88	0,84	0,97	0,71	0,78	0,00	0,97	0,91	0,53	-0,13	0,85	0,56	0,84	0,52
<i>Hs6st2</i>	-0,34	0,88	-0,53	0,38	0,68	0,78	0,58	-0,86	0,12	0,70	0,74	0,60	0,55	-0,25	0,06	0,43	0,20
<i>Sulf1</i>	0,91	0,82	0,91	0,79	0,64	0,95	0,62	0,88	0,22	0,69	0,71	0,59	-0,25	0,91	-0,11	0,94	0,65
<i>Sulf2</i>	0,94	-0,65	0,96	0,82	0,65	0,98	0,99	0,97	0,19	0,86	0,79	0,26	-0,09	0,72	0,61	0,91	0,19
<i>Hpse</i>	0,38	0,20	0,38	0,79	0,43	0,11	0,99	0,63	-0,17	0,90	0,68	0,21	0,20	-0,01	0,39	-0,23	0,19

Сутки / Day

Доза, мг/кг /
Dose, mg/kg

	1	3	7	10	1	3	7	10	1	3	7	10	1	3	7	10
	0,1				1				2,5				10			

Рис. 7. Корреляционный анализ экспрессии матричной РНК глюкокортикоидного рецептора (GR) с уровнем матричной РНК генов коровых белков протеогликанов и ферментов биосинтеза гепарансульфатов по всем животным внутри группы. Цифровой показатель – коэффициент корреляции Пирсона. Зеленым цветом выделены статистически значимые различия ($p < 0,05$)

Fig. 7. Correlation analysis of glucocorticoid receptor (GR) matrix RNA level with matrix RNA levels of all studied proteoglycans and heparin sulfate biosynthesis-related genes in all animals within the group. The numerical indicator is the Pearson correlation coefficient, statistically significant differences are highlighted in green color ($p < 0.05$)

которые в основном получены для многократного применения GC.

Важной частью этого исследования является изучение влияния GC (Dex) на транскрипционную активность генов, вовлеченных в биосинтез ПГ. Нами было показано, что однократное введение Dex приводит к быстрому (на 1–3-и сутки) повышению в 1,5–3 раза уровня экспрессии генов некоторых ПГ (синдекан-3/*Sdc3*, нейрокан/*Ncan* и фосфакан/*Ptprz1*) ферментов биосинтеза ГС (*Ndst1*, *Glce*, *Hs2st1*, *Hs6st1*, *Sulf1*, *Sulf2*), которое было непродолжительным: на 7–10-е сутки показатели возвращались к контрольному уровню. К сожалению, данных литературы, с которыми можно провести сравнение, очень немного, и они выполнены на различных экспериментальных моделях с использованием разных дозировок GC и в различные временные периоды после введения GC. Так, в работе W.L. Liu и соавт. было показано, что в модели острого повреждения спинного мозга *in vivo* однократное введение крысам метилпреднизолона в дозировке 30 мг/кг снижало экспрессию нейрокана

через 24 ч после инъекции, а обработка первичных культур астроцитов метилпреднизолоном в концентрации 10 и 50 мкМ *in vitro* уменьшала экспрессию нейрокана и фосфакана [6]. Подавление экспрессии нейрокана было опосредовано GR [6], в промоторной области которого имеются глюкокортикоид-респонсивные элементы [14]. Долговременное многократное введение Dex мышам снижало уровень экспрессии гепарансульфат протеогликанов агрина в коре головного мозга мышей [7]. Обработка Dex органотипических срезов головного мозга крысы в модельной системе *ex vivo* показала значительную дозозависимость его влияния: низкие дозировки препарата (0,01–0,50 мкМ) увеличивали экспрессию глипикана-1 и версикана (в 5–10 раз), в то время как высокие (50–200 мкМ) – подавляли экспрессию синдекана и бигликана (в 3–5 раз) [8]. Однократное введение Dex взрослым крысам (в дозировке 2,5 или 5 мг/кг) дозозависимо увеличивало транскрипционную активность ПГ-кодирующих генов в гиппокампе (но не в коре головного мозга) в основном за счет повышения уровней экспрессии

синдекана-1, глипикана-1, бревикана, хондроитин-сульфат протеогликана 4/NG2, декорина и люмикана (в 2–7 раз) через 24 ч после инъекции [8]. Многократное введение Dex мышам SCID в дозировке 1 мг/кг приводило к увеличению уровней экспрессии глипикана-1, синдекана-1 и версикана (3–4,3 раза) в подкорковых структурах головного мозга мышей [9]. В целом представленные в настоящей работе результаты согласуются с данными литературы и дополняют их, демонстрируя способность GC влиять на ПГ в ткани головного мозга. Также большое значение имеют результаты, свидетельствующие о возможности GC воздействовать на транскрипционную активность системы биосинтеза углеводов молекул GC, что ранее не исследовалось.

Особый интерес вызывает тот факт, что даже однократное применение Dex вызывает отсроченное дозозависимое увеличение содержания общих и высокосульфатированных ГАГ в ткани головного мозга, а также повышение уровня GC и снижение уровня XC, что свидетельствует об изменении соотношения различных классов ГАГ. Имеющиеся данные по этому вопросу очень немногочисленны: повышение содержания GC в глиобластоме ассоциировано с плохим прогнозом течения заболевания и низкими показателями выживаемости пациентов [29], а локальное введение Dex на нитроцеллюлозном тампоне в головной мозг крысы приводит к уменьшению в 2,5 раза содержания XC в ткани мозга через 1 нед после имплантации тампона [30]. При этом в модели органотипических срезов головного мозга крысы *ex vivo* обнаружена противоположная тенденция: обработка срезов Dex (10 нМ–200 мкМ) в течение 24 ч приводила к снижению содержания GC в головном мозге (в 2–2,5 раза), а также к повышению уровня XC в гиппокампе (в 2 раза) и его снижению в коре головного мозга (в 2–2,5 раза) [8].

Многократное введение Dex мышам SCID в дозировке 1 мг/кг также вызывало снижение содержания XC в подкорковых структурах головного мозга мышей [9].

В целом приведенные данные свидетельствуют о принципиальной способности GC влиять на гликозилированные компоненты ткани головного мозга на уровне как экспрессии их коровых белков, так и биосинтеза их углеводных цепей. Повышение содержания ГАГ и изменение соотношения их различных классов (одновременное увеличение уровня GC и снижение уровня XC) могут привести к формированию специфических внеклеточных ниш, способствующих развитию различных патологических процессов в головном мозге. Согласно пилотным данным корреляционного анализа, изменения экспрессии генов, кодирующих коровые белки ПГ и ферменты биосинтеза ГАГ, могут осуществляться через GR, что позволяет предложить новый молекулярный механизм регуляции экспрессии ПГ в клетках и тканях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что даже однократное применение Dex оказывает влияние на молекулярные характеристики ткани головного мозга мышей, в частности гликозилированные макромолекулы ВКМ. Если воздействие этого препарата на экспрессию коровых белков ПГ носит кратковременный характер и быстро возвращается к нормальным показателям, то изменения в содержании общих и высокосульфатированных ГАГ имеют более стабильный характер, усиливаясь к 7–10-м суткам после введения Dex экспериментальным животным. Такие изменения могут вносить значительный вклад в структурно-функциональные характеристики ВКМ головного мозга и способствовать его трансформации в патологическое или проопухоловое микроокружение.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Dubinski D., Hattingen E., Senft C. et al. Controversial roles for dexamethasone in glioblastoma - Opportunities for novel vascular targeting therapies. *J Cereb Blood Flow Metab* 2019;39(8):1460–8. DOI: 10.1177/0271678X19859847
- Liston C., Gan W.B. Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(38):16074–9. DOI: 10.1073/pnas.1110444108
- Gray J.D., Kogan J.F., Marrocco J. et al. Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13(11):661–73. DOI: 10.1038/nrendo.2017.97
- Nicholson C., Hrabětová S. Brain extracellular space: the final frontier of neuroscience. *Biophys J* 2017;113(10):2133–42. DOI: 10.1016/j.bpj.2017.06.052
- Strokotova A.V., Grigorieva E.V. Glucocorticoid effects on proteoglycans and glycosaminoglycans. *Int J Mol Sci* 2022;23(24):15678. DOI: 10.3390/ijms232415678
- Liu W.L., Lee Y.H., Tsai S.Y. et al. Methylprednisolone inhibits the expression of glial fibrillary acidic protein and chondroitin sulfate proteoglycans in reactivated astrocytes. *Glia* 2008;56(13):1390–400. DOI: 10.1002/glia.20706
- Wei F., Song J., Zhang C. et al. Chronic stress impairs the aquaporin-4-mediated glymphatic transport through glucocorticoid signaling. *Psychopharmacology (Berl)* 2019;236(4):1367–84. DOI: 10.1007/s00213-018-5147-6
- Tsidulko A.Y., Bezier C., de La Bourdonnaye G. et al. Conventional anti-glioblastoma chemotherapy affects proteoglycan composition of brain extracellular matrix in rat experimental model *in vivo*. *Front Pharmacol* 2018;2(9):1104. DOI: 10.3389/fphar.2018.01104
- Tsidulko A.Y., Shevelev O.B., Khotskina A.S. et al. Chemotherapy-induced degradation of glycosylated components of the brain extracellular matrix promotes glioblastoma relapse development in an animal model. *Front Oncol* 2021;19(11):713139. DOI: 10.3389/fonc.2021.713139

10. Timmermans S., Souffriau J., Libert C. A General introduction to glucocorticoid biology. *Front Immunol* 2019;4(10):1545. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01545
11. Weikum E.R., Knuesel M.T., Ortlund E.A. et al. Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allosterity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18(3):159–74. DOI: 10.1038/nrm.2016.152
12. Eklund K.K., Humphries D.E., Xia Z. et al. Glucocorticoids inhibit the cytokine-induced proliferation of mast cells, the high affinity IgE receptor-mediated expression of TNF-alpha, and the IL-10-induced expression of chymases. *J Immunol* 1997;158(9):4373–80.
13. Watanabe H., Gao L., Sugiyama S. et al. Mouse aggrecan, a large cartilage proteoglycan: protein sequence, gene structure and promoter sequence. *Biochem J* 1995;308(Pt 2):433–40. DOI: 10.1042/bj308043
14. Rauch U., Grimpe B., Kulbe G. et al. Structure and chromosomal localization of the mouse neurocan gene. *Genomics* 1995;28(3):405–10. DOI: 10.1006/geno.1995.1168
15. Benad-Mehner P., Thiele S., Rachner T.D. et al. Targeting syndecan-1 in breast cancer inhibits osteoclast functions through up-regulation of osteoprotegerin. *J Bone Oncol* 2013;3(1):18–24. DOI: 10.1016/j.jbo.2013.11.001
16. Derfoul A., Perkins G.L., Hall D.J. et al. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells* 2006;24(6):1487–95. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0415
17. Xu C., Sun M., Zhang X. et al. Activation of glucocorticoid receptor inhibits the stem-like properties of bladder cancer via inactivating the β -catenin pathway. *Front Oncol* 2020;10:1332. DOI: 10.3389/fonc.2020.01332
18. Yao Y.Y., Liu D.M., Xu D.F. et al. Memory and learning impairment induced by dexamethasone in senescent but not young mice. *Eur J Pharmacol* 2007;574(1):20–8. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.07.021
19. Drakulić D., Veličković N., Stanojlović M. et al. Low-dose dexamethasone treatment promotes the pro-survival signalling pathway in the adult rat prefrontal cortex. *J Neuroendocrinol* 2013;25(7):605–16. DOI: 10.1111/jne.12037
20. Franceschi S., Lessi F., Morelli M. et al. Sedoheptulose kinase SHPK expression in glioblastoma: emerging role of the nonoxidative pentose phosphate pathway in tumor proliferation. *Int J Mol Sci* 2022;23(11):5978. DOI: 10.3390/ijms23115978
21. Shaqura M., Li X., Al-Khrasani M. et al. Membrane-bound glucocorticoid receptors on distinct nociceptive neurons as potential targets for pain control through rapid non-genomic effects. *Neuropharmacology* 2016;111:1–13. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.019
22. Herman J.P., Patel P.D., Akil H. et al. Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Mol Endocrinol* 1989;3(11):1886–94. DOI: 10.1210/mend-3-11-1886
23. Vielkind U., Walencewicz A., Levine J.M. et al. Type-II glucocorticoid receptors are expressed in oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res* 1990;27(3):360–73. DOI: 10.1002/jnr.490270315
24. Van Gemert N.G., Meijer O.C., Morsink M.C. et al. Effect of brief corticosterone administration on SGK1 and RGS4 mRNA expression in rat hippocampus. *Stress* 2006;9(3):165–70. DOI: 10.1080/10253890600966169
25. Piechota M., Korostynski M., Golda S. et al. Transcriptional signatures of steroidhormones in the striatal neurons and astrocytes. *BMC Neurosci* 2017;18(1):37. DOI: 10.1186/s12868-017-0352-5
26. Tentillier N., Etzerodt A., Olesen M.N. et al. Anti-inflammatory modulation of microglia via CD163-targeted glucocorticoids protects dopaminergic neurons in the 6-OHDA Parkinson's disease model. *J Neurosci* 2016;36(36):9375–90. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1636-16.2016
27. Hu W., Zhang Y., Wu W. et al. Chronic glucocorticoids exposure enhances neurodegeneration in the frontal cortex and hippocampus via NLRP-1 inflammasome activation in male mice. *Brain Behav Immun* 2016;52:58–70. DOI: 10.1016/j.bbi.2015.09.019
28. Zhang B., Zhang Y., Xu T. et al. Chronic dexamethasone treatment results in hippocampal neurons injury due to activate NLRP1 inflammasome *in vitro*. *Int Immunopharmacol* 2017;49:222–30. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.05.039
29. Kazanskaya G.M., Tsidulko A.Y., Volkov A.M. et al. Heparan sulfate accumulation and perlecan/HSPG2 up-regulation in tumour tissue predict low relapse-free survival for patients with glioblastoma. *Histochem Cell Biol* 2018;149(3):235–44. DOI: 10.1007/s00418-018-1631-7
30. Zhong Y., Bellamkonda R.V. Dexamethasone-coated neural probes elicit attenuated inflammatory response and neuronal loss compared to uncoated neural probes. *Brain Res* 2007;1148:15–27. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.02.024

Благодарность

Авторы выражают благодарность Л.В. Аксеновой за помощь в проведении Вестерн-блоттинга и дот-блот анализа, Т.И. Котюшевой за помощь в иммуногистохимическом окрашивании. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ» (ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации), поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Acknowledgment

The authors express their gratitude to L.V. Aksenova for her help in carrying out Western blotting and dot-blot analysis, T.I. Kotyusheva for her help in immunohistochemical staining. The work was performed using the equipment of the CCP “Proteomic Analysis” (Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Ministry of Science and Higher Education of Russia), supported by funding from the Ministry of Education and Science of Russia (Agreement No. 075-15-2021-691).

Вклад авторов

С.Д. Аладьев, Д.К. Соколов, М.О. Политко, А.Ю. Цидулко, А.И. Шахмурадова, Г.М. Казанская: выполнение экспериментов, статистическая обработка данных, написание текста статьи, редактирование;

А.В. Стротова, Э.В. Григорьева: разработка концепции и дизайна исследования, написание текста статьи, анализ и интерпретация результатов;

С.В. Айдагулова, А.М. Волков, Е.Э. Кливер: анализ полученных данных, научное консультирование.

Authors' contribution

S.D. Aladev, D.K. Sokolov, M.O. Politko, A.Y. Tsidulko, A.I. Shakhmuradova, G.M. Kazanskaya: performing experiments, statistical data processing, article writing, editing;

A.V. Strokotova, E.V. Grigorieva: development of the concept and design of the study, article writing, analysis and interpretation of the results;

S.V. Aidagulova, A.M. Volkov, E.E. Kliver: analysis of the obtained data, scientific consulting.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.Д. Аладьев / S.D. Aladev: <https://orcid.org/0000-0001-5883-4831>;
К.Д. Соколов / D.K. Sokolov: <https://orcid.org/0000-0002-4145-5277>
А.В. Строкотова / A.V. Strokotova: <https://orcid.org/0000-0001-5336-8552>
Г.М. Казанская / G.M. Kazanskaya: <https://orcid.org/0000-0003-2598-1805>
А.М. Волков / A.M. Volkov: <https://orcid.org/0000-0001-9697-7091>
Е.Э. Кливер / E.E. Kliver: <https://orcid.org/0000-0002-3915-3616>
М.О. Политко / M.O. Politko: <https://orcid.org/0000-0002-9650-9877>
А.Ю. Цидулко / A.Y. Tsidulko: <https://orcid.org/0000-0002-1056-020X>
С.В. Айдагулова / S.V. Aidagulova: <https://orcid.org/0000-0001-7124-1969>
Э.В. Григорьева / E.V. Grigorieva: <https://orcid.org/0000-0003-2457-9179>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-15-00285).
Funding. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (grant No. 21-15-00285).

Соблюдение правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of Institute of Molecular Biology and Biophysics of Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Ministry of Science and Higher Education of Russia.

The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-40-48



Молекулярные маркеры ответа на периперационную химиотерапию при местно-распространенном раке желудка

К.А. Оганян¹, А.А. Мусаелян^{1,2}, С.В. Лапин¹, Т.В. Купенская¹, А.А. Свечкова¹, М.А. Беляев¹, А.А. Захаренко¹, С.В. Орлов^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6–8;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»; Россия, Краснодарский край, Адлерский р-н, 354376 Сочи, с. Веселое, ул. Мира, 177

Контакты: Карина Амбарцумовна Оганян oganyan_karina@bk.ru

Введение. Периперационная химиотерапия по схеме FLOT улучшает прогноз у пациентов с местно-распространенным раком желудка (РЖ). Однако более чем в 50 % случаев новообразование нечувствительно к данной терапии, что, в свою очередь, обуславливает токсичность и отсрочку оперативного вмешательства. Определение молекулярно-генетических предикторов ответа на химиотерапию в режиме FLOT является важной задачей, поскольку позволит оптимизировать подходы к лечению пациентов с местно-распространенным резектабельным РЖ.

Цель исследования – оценка клинико-морфологических особенностей микросателлитной нестабильности, амплификации гена *HER2*, изменения копийности генов, а также их взаимосвязи с ответом на периперационную химиотерапию в режиме FLOT у больных местно-распространенным РЖ.

Материалы и методы. В ретроспективное исследование включены 185 пациентов, у которых исследован статус *HER2* и микросателлитной нестабильности. Из них 45 пациентов с РЖ T2–4N1–2M0, которым проведены субтотальная резекция желудка или гастрэктомия с лимфаденэктомией D2 и химиотерапия в режиме FLOT. Определение микросателлитной нестабильности проводилось путем фрагментного анализа, амплификации гена *HER2* методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in-situ* hybridization, FISH). Также у 19 больных проанализированы изменения копийности генов *KRAS*, *FGFR1*, *FGFR2*, *EGFR*, *MET*, *MYC*, *CCND1* с использованием метода мультиплексной лигазозависимой амплификации зондов (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA).

Результаты. Микросателлитная нестабильность выявлена в 4,8 % (9/185) случаев РЖ. Показана ее взаимосвязь с пожилым возрастом ($p = 0,005$), низкой степенью дифференцировки ($p = 0,011$), наличием опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов ($p = 0,0004$) и высоким предоперационным уровнем СА 72–4 ($p = 0,025$). Распространенность амплификации *HER2* составила 7,5 % (14/185) и была ассоциирована с низкой степенью дифференцировки ($p = 0,048$) и метастазированием в регионарные лимфатические узлы ($p = 0,037$). У пациентов с *HER2*-положительным РЖ (*HER2* – human epidermal growth factor receptor 2), получавших периперационную химиотерапию в режиме FLOT (4/45), показатели выживаемости без прогрессирования были достоверно ниже, чем у больных с *HER2*-отрицательным РЖ: медиана составила 156 и 317 дней соответственно (отношение рисков 0,49; 95 % доверительный интервал 0,16–1,47; $p = 0,0006$). У больных с амплификацией *KRAS* (3/19) эти показатели были достоверно ниже по сравнению с больными с ее отсутствием: медиана составила 98 и 327 дней соответственно (отношение рисков 0,29; 95 % доверительный интервал 0,07–1,19; $p < 0,0001$).

Заключение. Амплификации *HER2* и *KRAS* могут служить перспективными маркерами ответа у пациентов с местно-распространенным РЖ при проведении периперационной химиотерапии по схеме FLOT.

Ключевые слова: предиктивные маркеры, химиотерапия по схеме FLOT, рак желудка

Для цитирования: Оганян К.А., Мусаелян А.А., Лапин С.В. и др. Молекулярные маркеры ответа на периперационную химиотерапию при местно-распространенном раке желудка. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(1):40–8. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-40-48

Molecular markers as predictors of response to perioperative chemotherapy in locally advanced gastric cancer

K.A. Oganyan¹, A.A. Musaelyan^{1,2}, S.V. Lapin¹, T.V. Kupenskaya¹, A.A. Svehkova¹, M.A. Belyaev¹, A.A. Zakharenko¹, S.V. Orlov^{1,2}

¹Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; 17 Lev Tolstoy St., Saint Petersburg 197101, Russia;

²Research Institute of Medical Primatology; 177 Mira St., village Veseloe, Sochi 354376, Adler District, Krasnodar Territory, Russia

Contacts: Karina Ambartsumovna Oganyan oganyan_karina@bk.ru

Introduction. Perioperative FLOT chemotherapy has improved prognosis in patients with locally advanced resectable gastric cancer (GC). However, in 80 % of cases, the tumor is resistant to the therapy, resulting in unnecessary toxicity and delayed surgical treatment.

Aim. Evaluation of clinico-morphological patterns of microsatellite instability, *HER2* gene amplification, changes in gene copy number and their relationship with the response to perioperative FLOT chemotherapy in patients with locally advanced resectable GC.

Materials and methods. The retrospective study included 185 patients. All tumor samples were assessed for *HER2* and microsatellite instability status. Among all cases there were 45 patients with locally advanced T2–4N1–2 M0 GC, who underwent a total or subtotal gastrectomy with D2 lymphadenectomy and perioperative chemotherapy with FLOT. Microsatellite instability detection was performed using fragment analysis, *HER2* gene amplification testing – fluorescent in situ hybridization. Also 19 patients were tested for copy number changes of the *FGFR1*, *FGFR2*, *KRAS*, *MET*, *EGFR*, *CCND1*, *MYC* genes using Multiplex ligation-dependent probe amplification. The endpoints were progression-free survival and objective response rate.

Results. Microsatellite instability was detected in 4.8 % (9/185) of GC cases. Microsatellite instability was associated with advanced age ($p = 0.005$), low grade of differentiation ($p = 0.011$), presence of tumor-infiltrating lymphocytes ($p = 0.0004$), and high preoperative CA 72–4 levels ($p = 0.025$). Prevalence of *HER2* amplification was 7.5 % (14/185). It was associated with low grade of differentiation ($p = 0.048$) and metastasis in regional lymph nodes ($p = 0.037$). PFS in patients with *HER2*-positive (*HER2* – human epidermal growth factor receptor 2) GC treated with perioperative FLOT chemotherapy (4/45) was significantly lower than in patients with *HER2*-negative GC: the median was 156 and 317 days, respectively (hazard ratio 0.49; 95 % confidence interval 0.16–1.47; $p = 0.0006$). There was no correlation between the presence of the alteration and ORR ($p = 1.0$). Progression-free survival in GC patients with *KRAS* amplification (3/19) was significantly lower comparing with patients without it: the median was 98 and 327 days, respectively (hazard ratio 0.29; 95 % confidence interval 0.07–1.19; $p < 0.0001$). There was no association between an increase in *KRAS* copy number and objective response rate ($p = 1.0$). For microsatellite instability and other studied markers no statistically significant correlation with progression-free survival and objective response rate was found ($p > 0.05$).

Conclusion. The presence of *HER2* and *KRAS* amplification have been shown as promising predictive markers of the treatment failure in patients treated with perioperative FLOT chemotherapy for locally advanced resectable GC.

Keywords: gastric cancer, FLOT chemotherapy, predictive markers

For citation: Oganyan K.A., Musaelyan A.A., Lapin S.V. et al. Molecular markers as predictors of response to perioperative chemotherapy in locally advanced gastric cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in Molecular Oncology 2023;10(1):40–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-40-48

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) характеризуется агрессивным течением и занимает одну из ведущих позиций в структуре онкологической смертности [1]. Несмотря на определенный прогресс в лекарственном лечении данной патологии, в частности, применение химиотерапии (ХТ) в режиме FLOT и традиционные подходы демонстрируют ограниченную эффективность в отношении общей выживаемости (ОВ) [2, 3].

Характерным признаком РЖ является его выраженная гетерогенность, поэтому важно применять прогностическую классификацию с целью персонализированного подхода к ведению пациентов [4]. Традиционные классификации на основе клинических и морфологических данных не обладают значительной прогностической ценностью вследствие того, что не отражают молекулярно-биологические особенности опухоли. Молекулярные классификации, которые учитывают биологию опухоли, способствуют разработке новых подходов к определению прогноза пациентов и выбору терапевтических опций [5]. Одна из таких классификаций была предложена экспертами

Атласа ракового генома (Cancer Genome Atlas, TCGA). Она является наиболее широко изученной и включает следующие подтипы РЖ: микросателлитная нестабильность (МСН), хромосомная нестабильность, вирус Эпштейна–Барр и геномная стабильность [6].

Микросателлитная нестабильность отражает нарушение системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair system, MMR) [7]. Дефектная система MMR способствует накоплению большого количества неоантигенов, что приводит к появлению особого воспалительного микроокружения опухоли и ее высокой иммуногенности [8]. Это служит причиной того, что РЖ с МСН обладает высокой чувствительностью к ингибиторам контрольных точек иммунного ответа [9]. В мае 2017 г. Управление по контролю над качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) одобрило пембролизумаб для лечения пациентов с нерезектабельными или метастатическими солидными опухолями с МСН, в том числе и для больных РЖ.

Амплификация гена *HER2* представляет собой отдельную немногочисленную подгруппу РЖ, которая

входит в состав опухолей с хромосомной нестабильностью [6]. Статус *HER2* наряду с МСН и экспрессией PD-L1 (programmed death-ligand 1) является маркером, который в настоящее время определяется в клинической практике для таргетной терапии РЖ [10–15]. Анти-*HER2*-терапия (*HER2* – human epidermal growth factor receptor 2) впервые позволила улучшить показатели ОВ у пациентов с распространенным РЖ [15]. Помимо изменения копийности гена *HER2* для подтипа с хромосомной нестабильностью, который является наиболее многочисленным подтипом РЖ, характерны также изменения копийности других генов, кодирующих тирозинкиназные рецепторы, в частности, *EGFR*, *FGFR2* и *MET*, в отношении которых в настоящее время активно разрабатывается таргетная терапия [6].

Несмотря на очевидную ценность предикторов ответа на иммунотерапию и разработки таргетной терапии, область их применения ограничена небольшим числом случаев заболевания с метастатическим поражением с соответствующими мутациями. В ряде исследований было показано, что эти альтерации могут иметь предиктивную значимость и в определении эффективности ХТ, которая остается стандартом системной терапии [16]. В частности, в настоящее время периоперационная ХТ в режиме FLOT является общепринятым подходом к лечению местно-распространенного РЖ [17]. Однако более 50 % пациентов нечувствительны к данной терапии [18]. При этом приходится подвергать таких больных ненужной токсичности и откладывать оперативное вмешательство. Поэтому актуальным является идентификация молекулярно-генетических предикторов ответа на ХТ по схеме FLOT, что позволит оптимизировать подходы к лечению пациентов с местно-распространенным РЖ.

Целью исследования является оценка клинимо-морфологических особенностей МСН, амплификации гена *HER2*, изменения копийности генов, а также их взаимосвязи с ответом на ХТ по схеме FLOT у пациентов с местно-распространенным РЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 185 пациентов с верифицированным РЖ. В каждом случае исследовали блоки тканей, которые были фиксированы 10 % забуференным формалином, дегидратированы в изопропиловом спирте и залиты в парафин. В табл. 1 представлены клинимо-морфологические данные всех пациентов.

У всех больных исследован статус МСН и *HER2* с последующим выявлением распространенности и клинимо-морфологических особенностей опухоли. Кроме того, у 45 пациентов определено изменение копийности генов *FGFR1*, *FGFR2*, *MYC*, *CDK6*, *MET*, *CCND1*, *EGFR*, *PIK3CA*, *KLF5* и *KRAS*.

Из 185 пациентов, включенных в исследование, у 64 заболевание было представлено местно-распро-

страненным резектабельным ($T_{\text{любая}} N+M0$) РЖ. Им проведена субтотальная резекция желудка или гастрэктомия с лимфаденэктомией D2. Из них 45 пациентам ($T3-4N+M0$) назначена периоперационная ХТ по схеме FLOT. При этом только у 19 больных, которым выполнялась ХТ в периоперационном режиме, было выявлено изменение копийности генов. Подробный дизайн исследования представлен на рис. 1.

Таблица 1. Клинико-морфологические данные пациентов, включенных в исследование

Table 1. Clinico-morphological data of patients included in the study

Показатель Parameter	Значение показателя Indicator value
Пол, n (%): Gender, n (%): женщины female мужчины male	85 (45,9) 100 (54,1)
Возраст, лет: Age, years: медиана (интерквартильный размах) median (interquartile range) <60, n (%) >60, n (%)	64 (57–69) 65 (35,1) 120 (64,9)
Локализация опухоли, n (%): Tumor localization, n (%): проксимальная proximal дистальная distal неуточненная unspecified	35 (18,9) 111 (60,0) 39 (21,1)
Стадия, n (%): Stage, n (%): I–II III–IV	41 (22,2) 144 (77,8)

Оценка ответа на терапию проводилась путем измерения размера опухоли с помощью компьютерной томографии согласно критериям оценки ответа солидных опухолей (Response evaluation criteria in solid tumours 1.1, RECIST 1.1). Контрольными точками исследования были частота объективных ответов (процент пациентов с полным и частичным ответами после терапии по критериям RECIST 1.1) и выживаемость без прогрессирования (ВБП). Медиана наблюдения составила 6,1 мес.

Экстракция ДНК. Макродиссекцию образцов проводили с целью увеличения опухолевой клеточности для последующего выделения ДНК. Экстракция ДНК из парафиновых блоков была выполнена колоночным методом, как было описано ранее в работе D.I. Gomez и соавт. [19].

Микросателлитная нестабильность. Наличие МСН определялось путем фрагментного анализа с помощью

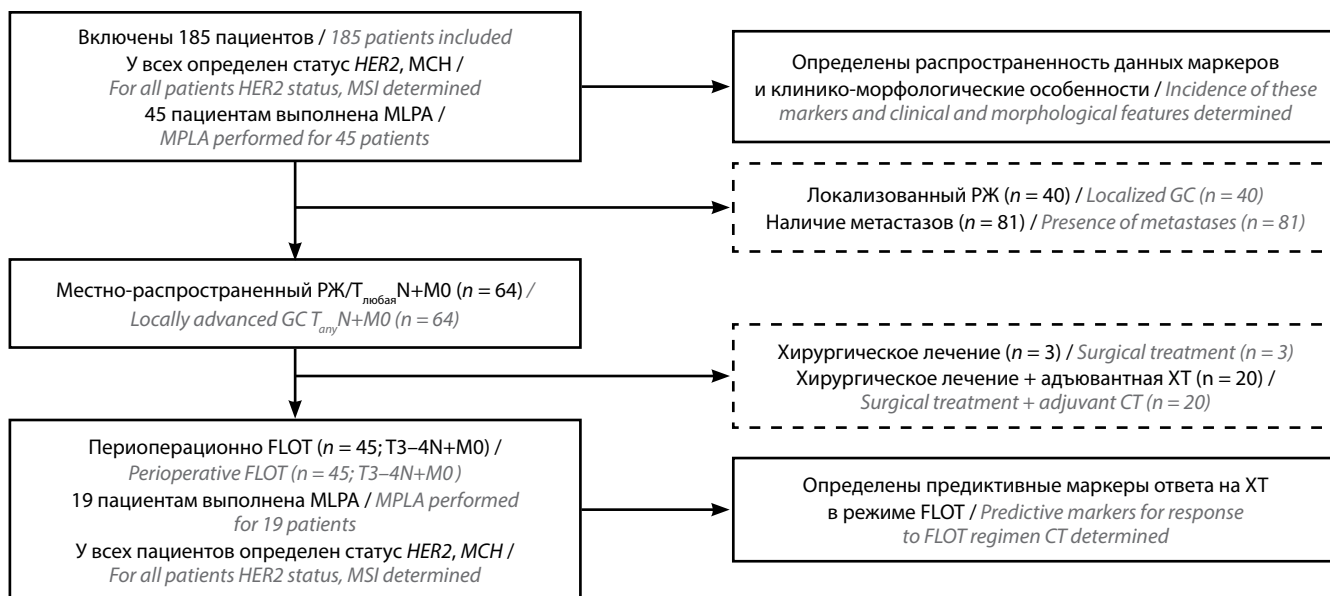


Рис. 1. Дизайн исследования. MCH – микросателлитная нестабильность; MLPA – метод мультиплексной лигазозависимой амплификации зондов; РЖ – рак желудка; ХТ – химиотерапия

Fig. 1. Study design. MSI – microsatellite instability; MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification; GC – gastric cancer; CT – chemotherapy

панели, содержащей 5 поли-А-моноклеотидных повторов: NR-24, NR-27, NR-21, BAT-25, BAT-26. Условия проведения мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и выбор последовательности праймеров для каждого моноклеотидного маркера осуществляли в соответствии с работой A. Goel и соавт. [20]. Для ПЦР применяли реактивы из набора Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия). Идентификация продукта, полученного в ходе ПЦР, осуществлялась с помощью капиллярного электрофореза (использовался генетический анализатор ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США)). Впоследствии полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения GeneMarker (SoftGenetics, США). Микросателлитный маркер считали нестабильным, если его размер отличался от контрольного образца (неопухолевой ткани) более чем на 2 нуклеотида. В случае присутствия ≥ 2 нестабильных маркеров из 5 исследуемых определялось наличие MCH в образце опухоли согласно рекомендациям Европейского общества медицинской онкологии (European Society for Medical Oncology, ESMO). В случае наличия < 2 нестабильных маркеров считалось, что геном опухоли не имеет MCH [21].

Изменение копияности генов. Для определения статуса *HER2* использовали метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in-situ* hybridization, FISH) в соответствии с рекомендациями Американского общества клинической онкологии/Колледжа американских патологов (American Society of Clinical Oncology, ASCO/College of American Pathologists, CAP) (2018). Изменение копияности генов *FGFR1*, *FGFR2*, *MYC*, *CDK6*, *MET*, *CCND*, *EGFR*, *PIK3CA*, *KLF5*, *KRAS* выявляли с помощью метода мультиплексной лигазо-

зависимой амплификации зондов (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) с использованием набора SALSA P458 Gastric Cancer (MRC, Нидерланды) согласно рекомендациям производителя с последующей детекцией продуктов фрагментного анализа с использованием генетического анализатора ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США) (капиллярный электрофорез).

Статистический анализ. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы GraphPad Prism (версия 9.3.1, GraphPad Software Inc., США). Для анализа количественных признаков, которые в исследовании представлены отклонением от нормального распределения, использовали U-критерий Манна–Уитни, качественных признаков – точный тест Фишера. Исследование показателей выживаемости проводилось с помощью логрангового теста и моделирования методом Каплана–Майера. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Особенности микросателлитной нестабильности. Распространенность MCH составила 4,8 % (9/185) всех случаев РЖ (рис. 2). Средний возраст больных РЖ с MCH оказался равным 71 году, больных с отсутствием MCH – 60 годам соответственно ($p = 0,005$). Также наличие MCH было ассоциировано с более низкой степенью дифференцировки опухоли: среди случаев с MCH опухоли со степенью дифференцировки G_{3-4} составляли 88,9 % (8/9), тогда как среди образцов с отсутствием MCH низкодифференцированные и недифференцированные опухоли наблюдались в 42,0 % (74/176) случаев ($p = 0,011$). Микросателлитная нестабильность была связана с наличием

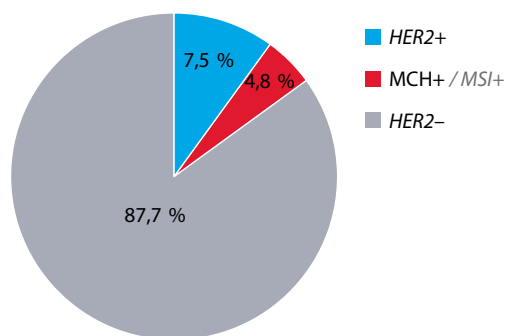


Рис. 2. Распространенность микросателлитной нестабильности (МСН) и амплификации гена *HER2* у пациентов с раком желудка
Fig. 2. Prevalence of microsatellite instability (MSI) and *HER2* gene amplification in patients with gastric cancer

опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ): данный феномен встречался в 66,7 % (6/9) опухолей с МСН и в 12,5 % (22/176) без нее ($p = 0,0004$). Образцы с наличием МСН также характеризовались более высоким предоперационным уровнем СА 72–4 ($p = 0,025$): его среднее значение в группе МСН составило 24,6 ед/мл, а в группе без МСН – 5,2 ед/мл.

Не было выявлено статистически значимых различий между статусом МСН и стадией заболевания, полом, категориями Т и N, наличием периневральной и лимфоваскулярной инвазий ($p > 0,05$). В табл. 2 отражены клинко-морфологические данные пациентов с РЖ в зависимости от статуса МСН.

Особенности амплификации гена *HER2*. Амплификация гена *HER2* была обнаружена в 7,5 % (14/185) случаев РЖ. Она была ассоциирована с более низкой степенью дифференцировки опухоли. Среди образцов с наличием амплификации опухоли G_{3-4} составляли 71,4 % (10/14), тогда как среди образцов с ее отсутствием – 42,0 % (72/171) ($p = 0,048$). Также амплификация *HER2* характеризовалась метастазированием в регионарные лимфатические узлы: их поражение наблюдалось в 92,9 % (13/14) случаев с наличием данной амплификации и в 70,0 % (120/171) случаев без альтерации ($p = 0,037$).

Не обнаружено статистически значимых различий между амплификацией *HER2* и такими характеристиками, как возраст, локализация первичной опухоли, стадия, локализация метастазов, категория Т, наличие муцинозного компонента, ОИЛ, перстневидных клеток, Крон-подобной реакции, лимфоваскулярной инвазии ($p > 0,05$). В опухолевых образцах не было обнаружено сосуществования МСН и *HER2*. В табл. 3 представлены клинко-морфологические данные пациентов с РЖ в зависимости от статуса *HER2*.

Особенности изменения копийности генов. У 45 пациентов с РЖ исследованы изменения копийности генов. Наличие амплификации *KRAS* обнаружено в 8,0 % (4/45) случаев, *FGFR2* – в 6,6 % (3/45), а увеличение копийности *CCND1* – в 4,0 % (2/45). Не было достоверной взаимосвязи между наличием данных альтераций и такими клинко-морфологическими

Таблица 2. Сравнение основных клинко-морфологических характеристик пациентов с раком желудка в зависимости от статуса микросателлитной нестабильности (МСН)

Table 2. Comparison of main clinical and morphological data of patients with gastric cancer depending on the status of microsatellite instability (MSI)

Показатель Parameter	МСН+, абс. (%) (n = 9) MSI+, abs. (%) (n = 9)	МСН–, абс. (%) (n = 176) MSI–, abs. (%) (n = 176)	<i>p</i>
Пол, <i>n</i> (%): Gender, <i>n</i> (%): женский female мужской male	6 (66,7) 3 (33,3)	78 (44,3) 98 (55,7)	0,304
Медиана возраста, лет Median age, years	71	60	0,005
Классификация по Laugen, <i>n</i> (%): Lauren classification, <i>n</i> (%): кишечный тип intestinal type диффузный тип diffuse type	0 (0,0) 9 (100,0)	56 (31,8) 120 (68,2)	0,059
Стадия, <i>n</i> (%): Stage, <i>n</i> (%): I–II III–IV	1 (11,1) 8 (88,9)	40 (22,7) 136 (77,3)	0,686
Степень дифференцировки, <i>n</i> (%): Grade, <i>n</i> (%): G_{1-2} G_{3-4}	1 (11,1) 8 (88,9)	102 (57,9) 74 (42,1)	0,011
Наличие опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, <i>n</i> (%): Tumor-infiltrating lymphocytes, <i>n</i> (%): да yes нет no	6 (66,7) 3 (33,3)	22 (12,5) 154 (87,5)	0,0004
Наличие перстневидных клеток, <i>n</i> (%): Presence of singlet ring cells, <i>n</i> (%): да yes нет no	4 (44,4) 5 (55,6)	40 (22,7) 136 (77,3)	0,219
Наличие отдаленных метастазов, <i>n</i> (%): Presence of distant metastases, <i>n</i> (%): да yes нет no	2 (22,2) 7 (77,8)	79 (44,9) 97 (55,1)	0,303

Примечание. Здесь и в табл. 3: жирным шрифтом выделены статистически значимые различия.
Note. Here and in Table. 3: statistically significant differences are highlighted in bold.

Таблица 3. Сравнение основных клинико-морфологических данных пациентов с раком желудка в зависимости от статуса HER2

Table 3. Comparison of main clinical and morphological data of patients with gastric cancer depending on the status of HER2

Показатель Parameter	HER2+, абс. (%) (n = 14)	HER2–, абс. (%) (n = 171)	p
	HER2+, abs. (%) (n = 14)	HER2–, abs. (%) (n = 171)	
Пол, n (%): Gender, n (%):			
женский female	4 (28,6)	80 (46,8)	0,266
мужской male	10 (71,4)	91 (53,2)	
Медиана возраста, лет Median age, years	62	65	0,786
Классификация по Laugen, n (%): Lauren classification, n (%):			
кишечный тип intestinal type	6 (42,8)	50 (29,2)	0,364
диффузный тип diffuse type	8 (57,2)	121 (70,8)	
Поражение регио- нарных лимфатиче- ских узлов: N0 N+	1 (7,1) 13 (92,9)	51 (29,8) 120 (70,2)	0,037
Стадия, n (%): Stage, n (%):			
I–II	3 (21,4)	38 (22,2)	1,0
III–IV	11 (78,6)	133 (77,8)	
Степень дифферен- цировки, n (%): Grade, n (%):			
G ₁₋₂	4 (28,6)	99 (57,9)	0,048
G ₃₋₄	10 (71,4)	72 (42,1)	
Наличие опухолю- инфильтрирующих лимфоцитов, n (%): Tumor-infiltrating lymphocytes, n (%):			
да yes	2 (14,3)	26 (15,2)	1,0
нет no	12 (85,7)	145 (84,8)	
Наличие перстневид- ных клеток, n (%): Presence of singlet ring cells, n (%):			
да yes	1 (7,1)	43 (25,2)	0,193
нет no	13 (92,9)	128 (74,8)	
Наличие отдаленных метастазов, n (%): Presence of distant metastases, n (%):			
да yes	6 (42,9)	75 (43,9)	1,0
нет no	8 (57,1)	96 (56,1)	

особенностями, как возраст, локализация опухоли, стадия заболевания, категория Т, поражение лимфатических узлов, степень дифференцировки, наличие лимфоваскулярной инвазии, муцинозного компонента, ОИЛ, перстневидных клеток, Крон-подобной реакции ($p > 0,05$).

Предиктивные маркеры ответа на химиотерапию в режиме FLOT. Не было показано взаимосвязи между ВБП, наличием объективного ответа и такими клинико-морфологическими особенностями, как возраст, локализация первичной опухоли, степень дифференцировки, наличие муцинозного компонента, ОИЛ, перстневидных клеток, Крон-подобной реакции, лимфоваскулярной инвазии ($p > 0,05$).

Распространенность амплификации *HER2* у пациентов, получавших ХТ в режиме FLOT, составила 8,9 % (4/45). Не наблюдалось взаимосвязи этой аберрации с объективным ответом ($p = 1,0$). При проведении ХТ по схеме FLOT у пациентов с РЖ с амплификацией гена *HER2* ВБП была достоверно ниже, чем у больных с отсутствием данной амплификации: медиана ВБП составила 156 и 317 дней соответственно (отношение рисков (ОР) 0,49; 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,16–1,47; $p = 0,0006$) (рис. 3).

Распространенность амплификации *KRAS* у больных РЖ, получавших периоперационную ХТ, составила 15,8 % (3/19). Не отмечалось ассоциации между увеличением копийности этого гена и наличием объективного ответа ($p = 1,0$). У пациентов с наличием амплификации *KRAS* (3/19) показатели ВБП были достоверно ниже по сравнению с аналогичными показателями у пациентов без данной амплификации: медиана ВБП составила 98 и 327 дней соответственно (ОР 0,29; 95 % ДИ 0,07–1,19; $p < 0,0001$) (рис. 4).

При проведении периоперационной ХТ в отношении МСН и других исследованных маркеров (изменения копийности генов *FGFR1*, *FGFR2*, *MYC*, *CDK6*, *MET*, *CCND1*, *EGFR*, *PIK3CA*, *KLF5*) не было выявлено связи с ВБП, а также с частотой объективного ответа на лечение ($p > 0,05$).

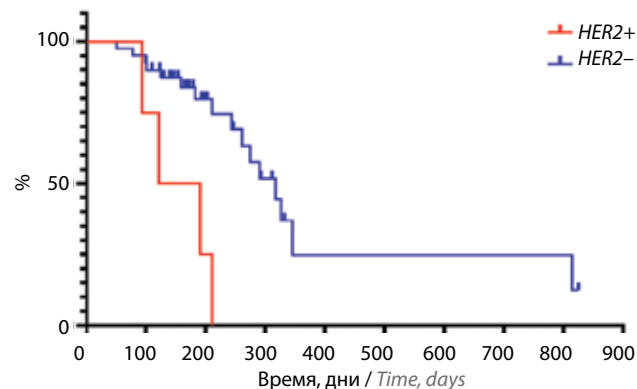


Рис. 3. Выживаемость без прогрессирования в зависимости от HER2-статуса у больных местно-распространенным раком желудка, получавших периоперационную химиотерапию в режиме FLOT

Fig. 3. Progression-free survival by HER2 status in patients with locally advanced resectable gastric cancer receiving perioperative FLOT chemotherapy

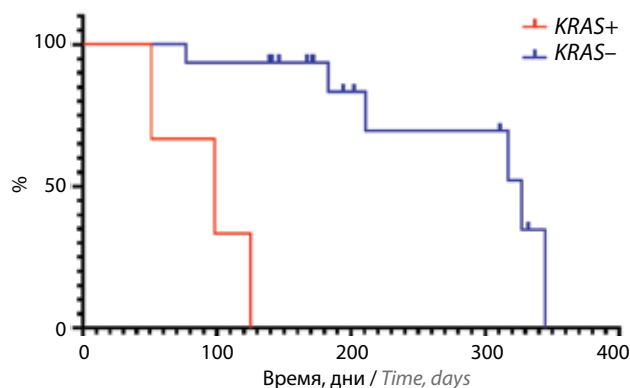


Рис. 4. Выживаемость без прогрессирования в зависимости от статуса *KRAS* у больных местно-распространенным раком желудка, получавших периоперационную химиотерапию в режиме FLOT
Fig. 4. Progression-free survival by *KRAS* status in patients with locally advanced gastric cancer receiving perioperative FLOT chemotherapy

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании на группе российских больных были проанализированы клинико-морфологические свойства МСН, амплификации гена *HER2*, изменения копийности генов, характерных для хромосомной нестабильности, а также их взаимосвязь с проводимой ХТ.

По данным нашего исследования распространенность МСН при РЖ составила 5,1 %. При этом, согласно данным исследований ряда зарубежных авторов, распространенность данного феномена при РЖ значительно варьирует и составляет 8–25 %, что может быть обусловлено популяционными особенностями [22–24]. Мы обнаружили, что опухоли с МСН чаще встречаются у более пожилых пациентов. Также наличие данной характеристики в нашем исследовании было ассоциировано с ОИЛ. Аналогичные результаты были показаны в работе A. Bermúdez и соавт. [25, 26]. Нами было продемонстрировано, что наличие МСН ассоциировано с более низкой степенью дифференцировки опухоли. Стоит отметить, что такая взаимосвязь ранее описана в литературе не была, что может быть обусловлено преобладанием в нашей выборке пациентов с диффузным подтипом опухоли по классификации Laugen, который характеризуется более низкой степенью дифференцировки [25, 26].

Амплификация гена *HER2* в нашем исследовании была обнаружена в 8,8 % случаев РЖ. В ряде зарубежных работ показана значительная вариация распространенности данного маркера, которая составляла 6–38 % [27, 28]. Амплификация гена *HER2* была ассоциирована с наличием более низкой степени диф-

ференцировки и поражением регионарных лимфатических узлов, что аналогично данным некоторых зарубежных исследований [27–30]. Также в ряде работ показана связь между наличием амплификации *HER2* и такими характеристиками, как мужской пол, проксимальная локализация опухоли, наличие отдаленных метастазов, обнаружение опухоли на поздних стадиях [29, 31]. Данные различия могут быть обусловлены небольшой группой пациентов, у которых обнаружена амплификация гена *HER2*.

В настоящее время более 50 % пациентов являются резистентными к стандартному подходу в лечении резектабельного местно-распространенного РЖ – периоперационной ХТ в режиме FLOT. Поэтому необходима разработка предиктивных маркеров ответа на данное лечение с целью повышения ее эффективности. В нашем исследовании впервые было показано, что наличие амплификации *HER2* и *KRAS* связано с неэффективностью периоперационной ХТ в режиме FLOT у пациентов с местно-распространенным РЖ. Возможным объяснением такой взаимосвязи является то, что оба маркера ассоциированы с агрессивным течением заболевания независимо от подхода к лечению [32–35]. В частности, в систематическом обзоре, в котором проводился анализ 42 публикаций с общим числом пациентов 12 749, было показано, что наличие амплификации гена *HER2* ассоциировано с низкими показателями ОВ [33].

Такой подход позволит увеличить вероятность эффективности данной терапии, обеспечит наилучшее соотношение между риском развития нежелательных явлений и пользой для пациента. Главным ограничением нашего исследования является малый объем выборки [36].

В настоящее время разрабатываются подходы к повышению эффективности терапии у больных с амплификацией *HER2* [37]. Однако добавление анти-*HER2*-антител, в частности трастузумаба, ассоциировано с высокой токсичностью [38]. Перспективным подходом для лечения данной группы больных является применение новой группы анти-*HER2*-препаратов (конъюгатов), которые при метастатическом РЖ продемонстрировали высокую эффективность с приемлемой токсичностью [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идентификация молекулярных биомаркеров ответа на периоперационную ХТ в режиме FLOT позволит точно прогнозировать химиочувствительность у пациентов с местно-распространенным РЖ.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Wong M.C.S., Huang J., Chan P.S.F. et al. Global Incidence and Mortality of Gastric Cancer, 1980–2018. *JAMA Network Open* 2021;4(7):e2118457. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.18457
2. Wang K., Ren Y., Ma Z. et al. Docetaxel, oxaliplatin, leucovorin, and 5-fluorouracil (FLOT) as preoperative and postoperative chemotherapy compared with surgery followed by chemotherapy for patients with locally advanced gastric cancer: a propensity score-based analysis. *Cancer Manag Res* 2019;11:3009–20. DOI: 10.2147/CMAR.S200883.
3. Lin J.-X., Tang Y.-H., Lin G.-J. et al. Association of adjuvant chemotherapy with overall survival among patients with locally advanced gastric cancer after neoadjuvant chemotherapy. *JAMA Network Open* 2022;5:e225557. DOI: jamanetworkopen.2022.5557
4. Gullo I., Carneiro F., Oliveira C., Almeida G.M. Heterogeneity in gastric cancer: from pure morphology to molecular classifications. *Pathobiology* 2018;85(1–2):50–63. DOI: 10.1159/000473881
5. Sanjeevaiah A., Cheedella N., Hester C., Porembka M.R. Gastric cancer: recent molecular classification advances, racial disparity, and management implications. *J Oncol Pract* 2018;14(4):217–24. DOI: 10.1200/JOP.17.00025
6. Zhang W. TCGA divides gastric cancer into four molecular subtypes: implications for individualized therapeutics. *Chin J Cancer* 2014;33(10):469–70. DOI: 10.5732/cjc.014.10117
7. Мусаелян А.А., Назаров В.Д., Будникова А.С. и др. Клинико-морфологический портрет опухолей с микросателлитной нестабильностью. Успехи молекулярной онкологии 2021;8(2): 52–9. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-2-52-59
Musaelyan A.A., Nazarov V.D., Budnikova A.S. et al. Clinical and morphological portrait of tumors with microsatellite instability. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021;8(2):52–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-2-52-59
8. Ballhausen A., Przybilla M.J., Jendrusch M. et al. The shared neoantigen landscape of MSI cancers reflects immunoediting during tumor evolution. *BioRxiv* 2019:691469. DOI: 10.1101/691469
9. Nebot-Bral L., Coutzac C., Kannouche P.L., Chaput N. Why is immunotherapy effective (or not) in patients with MSI/MMRD tumors? *Bulletin Du Cancer* 2019;106:105–13. DOI: 10.1016/j.bulcan.2018.08.007
10. Muro K., Chung H.C., Shankaran V. et al. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol* 2016;17(6):717–26. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)00175-3
11. Marabelle A., Le D.T., Ascierto P.A. et al. Efficacy of pembrolizumab in patients with noncolorectal high microsatellite instability/mismatch repair-deficient cancer: results from the phase II KEYNOTE-158 study. *J Clin Oncol* 2019;38(1):1–10. DOI: 10.1200/JCO.19.02105
12. Le D.T., Kim T.W., van Cutsem E. et al. Phase II open-label study of pembrolizumab in treatment-refractory, microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol* 2019;38(1):11–9. DOI: 10.1200/JCO.19.02107
13. Le D.T., Uram J.N., Wang H. et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372(26):2509–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1500596
14. Chao J., Fuchs C.S., Shitara K. et al. Assessment of pembrolizumab therapy for the treatment of microsatellite instability-high gastric or gastroesophageal junction cancer among patients in the KEYNOTE-059, KEYNOTE-061, and KEYNOTE-062 clinical trials. *JAMA Oncol* 2021;7(6):895–902. DOI: 10.1001/jamaoncol.2021.0275
15. Bang Y.-J., van Cutsem E., Feyereislova A. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy *versus* chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376(9742):687–97. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X
16. Cavaliere A., Merz V., Casalino S. et al. Novel biomarkers for prediction of response to preoperative systemic therapies in gastric cancer. *J Gastric Cancer* 2019;19(4):375–92. DOI: 10.5230/jgc.2019.19.e39
17. Лядов В.К., Пардабекова О.А., Лядова М.А. Периоперационная химиотерапия рака желудка: состояние проблемы. Современная онкология 2018;20:56–60. DOI: 10.26442/1815-1434_2018.2.56-60
Lyadov V.K., Pardabekova O.A., Lyadova M.A. Perioperative chemotherapy of stomach cancer: the state of the problem. *Sovremennaya onkologiya = Modern Oncology* 2018;20:56–60. (In Russ.). DOI: 10.26442/1815-1434_2018.2.56-60
18. Giommoni E., Lavacchi D., Tirino G. et al. Results of the observational prospective RealFLOT study. *BMC Cancer* 2021;21:1086. DOI: 10.1186/s12885-021-08768-7
19. Gomez D.I., Mullin C.S., Mora-Guzmán F. et al. Rapid DNA extraction for specific detection and quantitation of Mycobacterium tuberculosis DNA in sputum specimens using Taqman assays. *Tuberculosis* 2011;91(Suppl. 1):S43–8. DOI: 10.1016/j.tube.2011.10.009
20. Goel A., Nagasaka T., Hamelin R., Boland C.R. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS ONE* 2010;5(2):e9393. DOI: 10.1371/journal.pone.0009393
21. Luchini C., Bibeau F., Ligtenberg M.J.L. et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann Oncol* 2019;30(8):1232–43. DOI: 10.1093/annonc/mdz116
22. Lorenzi M., Amonkar M., Zhang J. et al. Epidemiology of microsatellite instability high (MSI-H) and deficient mismatch repair (dMMR) in solid tumors: a structured literature review. *J Oncol* 2020;2020:1807929. DOI: 10.1155/2020/1807929
23. Zhu L., Li Z., Wang Y. et al. Microsatellite instability and survival in gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol* 2015;3(3):699–705. DOI: 10.3892/mco.2015.506
24. Amonkar M., Lorenzi M., Zhang J. et al. Structured literature review (SLR) and meta-analyses of the prevalence of microsatellite instability high (MSI-H) and deficient mismatch repair (dMMR) in gastric, colorectal, and esophageal cancers. *J Clin Oncol* 2019;37:e15074. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.e15074
25. Bermúdez A., Arranz-Salas I., Mercado S. et al. Her2-positive and microsatellite instability status in gastric cancer-clinicopathological implications. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(6):944. DOI: 10.3390/diagnostics11060944
26. Puliga E., Corso S., Pietrantonio F., Giordano S. Microsatellite instability in gastric cancer: between lights and shadows. *Cancer Treat Rev* 2021;95. DOI: 10.1016/j.ctrv.2021.102175
27. Roy P.S., Nyodu T., Hazarika M. et al. Prevalence of HER2 expression and its correlation with clinicopathological parameters in gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma in North-East Indian population. *Asian Pac J Cancer Prev* 2019;20(4):1139–45. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.4.1139
28. Kelly C.M., Janjigian Y.Y. The genomics and therapeutics of HER2-positive gastric cancer—from trastuzumab and beyond. *J Gastrointest Oncol* 2016;7(5):750–62. DOI: 10.21037/jgo.2016.06.10
29. Laboissiere R.S., Buzelin M.A., Balabram D. et al. Association between HER2 status in gastric cancer and clinicopathological features: a retrospective study using whole-tissue sections. *BMC Gastroenterol* 2015;15:157. DOI: 10.1186/s12876-015-0384-1

30. Kasochi C., Julius P., Mweemba I., Kayamba V. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in gastric and gastro-esophageal junction adenocarcinoma in patients seen at the University Teaching Hospital, Lusaka, Zambia. *Afr Health Sci* 2020;20(4):1857–64. DOI: 10.4314/ahs.v20i4.41
31. Abrahao-Machado L.F., Scapulatempo-Neto C. HER2 testing in gastric cancer: An update. *World J Gastroenterol* 2016;22(19):4619–25. DOI: 10.3748/wjg.v22.i19.4619
32. Kurokawa Y., Matsuura N., Kimura Y. et al. Multicenter large-scale study of prognostic impact of HER2 expression in patients with resectable gastric cancer. *Gastric Cancer* 2015;18(4):691–7. DOI: 10.1007/s10120-014-0430-7
33. Jørgensen J.T., Hersom M. HER2 as a prognostic marker in gastric cancer – a systematic analysis of data from the literature. *J Cancer* 2012;3:137–44. DOI: 10.7150/jca.4090
34. Rehkaemper J., Korenkov M., Quaas A. et al. Amplification of *KRAS* and its heterogeneity in non-Asian gastric adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2020;20(1):587. DOI: 10.1186/s12885-020-06996-x
35. Essakly A., Loeser H., Kraemer M. et al. *PIK3CA* and *KRAS* amplification in esophageal adenocarcinoma and their impact on the inflammatory tumor microenvironment and prognosis. *Transl Oncol* 2012;13(2):157–64. DOI: 10.1016/j.tranon.2019.10.013
36. Оганян К., Мусаелян А., Лапин С. и др. Молекулярно-генетические предиктивные маркеры ответа на периоперационную химиотерапию в режиме FLOT при раке желудка. *Вопросы онкологии* 2022;3:341–2. DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-3
37. Hofheinz R.D., Hegewisch-Becker S., Kunzmann V. et al. Trastuzumab in combination with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and docetaxel as perioperative treatment for patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced esophagogastric adenocarcinoma: A phase II trial of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie Gastric Cancer Study Group. *Int J Cancer* 2021;149(6):1322–31. DOI: 10.1002/ijc.33696
38. Al-Batran S., Haag G., Ettrich T. et al. 1421MO final results and subgroup analysis of the PETRARCA randomized phase II AIO trial: perioperative trastuzumab and pertuzumab in combination with FLOT versus FLOT alone for HER2 positive resectable esophagogastric adenocarcinoma. *Ann Oncol* 2020;31:841–73. DOI: 10.1016/annonc/annonc284
39. Ishii T., Shitara K. Trastuzumab deruxtecan and other HER2-targeting agents for the treatment of HER2-positive gastric cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2021;21(11):1193–201. DOI: 10.1080/14737140.2021.1982698

Вклад авторов

К.А. Оганян: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, оформление иллюстративного материала, статистический анализ, написание текста статьи;

А.А. Мусаелян: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, статистический анализ, написание текста статьи;

А.А. Свечкова: обзор публикаций по теме статьи, сбор данных, анализ полученных данных, написание текста статьи;

Т.В. Купенская, С.В. Лапин: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, научное редактирование;

А.А. Захаренко, М.А. Беляев: анализ полученных данных, научное редактирование;

С.В. Орлов: идея и разработка дизайна, научное редактирование, руководство исследованием.

Authors' contributions

K.A. Oganyan: developing the research design, reviewed relevant literature, design of illustrative material, analysis of the obtained data, statistical analysis, article writing;

A.A. Musaelyan: developing the research design, reviewed relevant literature, design of illustrative material, analysis of the obtained data, statistical analysis, article writing;

T.V. Kupenskaya, S.V. Lapin: developing the research design, reviewed relevant literature, analysis of the obtained data, article writing;

A.A. Svechkova: reviewed relevant literature, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;

M.A. Belyaev, A.A. Zakharenko: analysis of the obtained data, scientific editing;

S.V. Orlov: idea and development the research design, scientific editing, research leadership.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.А. Оганян / K.A. Oganyan: <https://orcid.org/0000-0002-2743-0882>

А.А. Мусаелян / A.A. Musaelyan: <https://orcid.org/0000-0002-7570-2256>

С.В. Лапин / S.V. Lapin: <https://orcid.org/0000-0002-4998-3699>;

А.А. Захаренко / A.A. Zakharenko: <https://orcid.org/0000-0002-8514-5377>

С.В. Орлов / S.V. Orlov: <https://orcid.org/0000-0001-6080-8042>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Соглашения Минобрнауки России № 075-15-2021-1065 от 28.09.2021 о предоставлении гранта на реализацию отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг.

Funding. The study was performed according to the Agreement of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No. 075-15-2021-1065 dated September 28, 2021 on the provision of a grant for the implementation of certain activities of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies for 2019–2027.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Ministry of Health of Russia.

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 08.08.2022. **Принята к публикации:** 14.01.2023.

Article submitted: 08.08.2022. **Accepted for publication:** 14.01.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-49-56



Профиль экспрессии микроРНК в изолированных циркулирующих опухолевых клетках при колоректальном раке

О.И. Кит¹, И.А. Новикова¹, Н.Н. Тимошкина¹, Д.Ю. Гвалдин¹, А.А. Пушкин¹, О.Ю. Каймакчи²,
А.А. Маслов¹, А.В. Шапошников¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 344022 Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29

Контакты: Антон Андреевич Пушкин anton.a.pushkin@gmail.com

Введение. Колоректальный рак – часто диагностируемое заболевание, занимающее 3-е место среди онкологических заболеваний как по частоте встречаемости, так и по смертности. Сегодня внимание исследователей сосредоточено на разработке более доступных и надежных биомаркеров колоректального рака для преодоления ограничений в диагностике и прогнозе течения данной патологии.

Цель исследования – изучение особенностей экспрессии микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках (ЦОК) пациентов с колоректальным раком.

Материалы и методы. В исследование включены образцы крови от 299 больных раком ободочной кишки II (T3–4N0M0), III (T1–4N1–2M0) и IV (T1–4N0–2M1) стадий. Циркулирующие опухолевые клетки были отобраны с помощью системы детекции маркера EpCAM. Методом полимеразной цепной реакции исследована относительная экспрессия микроРНК hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-92a-3p в ЦОК.

Результаты. Положительный статус ЦОК выявлен у 188 (62,9 %) из 299 больных, отрицательный – у 111 (37,1 %). В группе больных с опухолями pT1–2 преобладали пациенты, у которых не были обнаружены ЦОК (53,3 %). У остальных пациентов с заболеванием pT1–2 ЦОК оказалось в 1,2 и 4,4 раза меньше, чем у пациентов с заболеванием pT3 и pT4 соответственно. При pT4 1–3 ЦОК встречались в 2,7 и 1,7 раза, а 3 ЦОК – в 1,4 раза чаще по сравнению с pT1–2 и pT3 соответственно ($p \leq 0,05$). Наличие метастатического поражения в 2,1 раза повышает вероятность выявления ЦОК: при метастазах >3 ЦОК обнаруживаются в 60,1 раза чаще, чем при M0 ($p \leq 0,05$). Экспрессия микроРНК hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p в ЦОК у пациентов с колоректальным раком III стадии была ниже, чем у пациентов с заболеванием II стадии, в 2,5 и 5 раз ($p < 0,05$) соответственно, а экспрессия hsa-miR-21-5p и hsa-miR-92a-3p – выше в 3,2 и 3 раза ($p < 0,05$) соответственно. В ЦОК больных колоректальным раком IV стадии уровень относительной экспрессии hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p оказался ниже в 4,6 и 5,3 раза соответственно ($p < 0,05$) по сравнению с уровнем экспрессии при заболевании II стадии, а уровень экспрессии hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-92a-3p – выше в 2,6; 4,6; 2,6 и 5,0 раз соответственно ($p < 0,05$) (результаты статистически значимы).

Заключение. Уровень экспрессии микроРНК в ЦОК может быть использован для дифференциальной диагностики наличия регионарных и отдаленных метастазов.

Ключевые слова: колоректальный рак, циркулирующие опухолевые клетки, микроРНК

Для цитирования: Кит О.И., Новикова И.А., Тимошкина Н.Н. и др. Профиль экспрессии микроРНК в изолированных циркулирующих опухолевых клетках при колоректальном раке. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(1):49–56. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-49-56

MicroRNA expression profile in isolated circulating tumor cells in colorectal cancer

O.I. Kit¹, I.A. Novikova¹, N.N. Timoshkina¹, D.Yu. Gvaldin¹, A.A. Pushkin¹, O.Yu. Kaimakchi², A.A. Maslov¹,
A.V. Shaposhnikov¹

¹National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Line, Rostov-on-Don 344037, Russia;

²Rostov State Medical University, Ministry of Health of Russia; 29 Nahichevanskij pereulok, Rostov-on-Don 344022, Russia

Contacts: Anton Andreevich Pushkin anton.a.pushkin@gmail.com

Introduction. Colorectal cancer is a frequently diagnosed disease being in the third place among oncological diseases both in incidence and mortality. Currently, researchers focus on development of more accessible and reliable biomarkers of colorectal cancer to overcome the problems in diagnosis and progression prognosis of this pathology.

Aim. To investigate characteristics of microRNA expression in circulating tumor cells (CTC) of patients with colorectal cancer.

Materials and methods. The study included blood samples from 299 patients with colon cancer, stages II (T3–4N0M0), III (T1–4N1–2M0) and IV (T1–4N0–2M1). Circulating tumor cells were identified using EpCAM marker detection system. Relative expression of hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-92a-3p micro RNA in CTC was measured using polymerase chain reaction.

Results. Positive CTC status was observed in 188 (62.9 %) of 299 patients, negative in 111 (37.1 %). In the patient group with pT1–2 tumors, the majority of patients did not have CTC (53.3 %). In other patients with pT1–2 disease, the number of CTC was 1.2 and 4.4 times lower than in patients with pT3 and pT4 disease, respectively. In pT4, 1–3 CTC were found 2.7 and 1.7 times more frequently, 3 CTC 1.4 times more frequently than in pT1–2 and pT3, respectively ($p \leq 0.05$). Presence of metastatic lesions increases the probability of CTC detection by the factor of 2.1: in metastases, >3 CTC were observed 60.1 times more frequently than in M0 ($p \leq 0.05$). Expression of hsa-miR-143-3p and hsa-miR-26a-5p microRNA in CTC of patients with stage III colorectal cancer was respectively 2.5 and 5 times lower than in patients with stage II disease ($p < 0.05$) and expression of hsa-miR-21-5p and hsa-miR-92a-3p microRNA was respectively 3.2 and 3 times higher ($p < 0.05$). In CTC of patients with stage IV colorectal cancer, the relative level of expression of hsa-miR-143-3p and hsa-miR-26a-5p was respectively 4.6 and 5.3 times lower ($p < 0.05$) compared to the level of expression in stage II disease, and hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p and hsa-miR-92a-3p expression levels were respectively 2.6, 4.6, 2.6 and 5.0 times higher ($p < 0.05$) (statistically significant results).

Conclusion. The level of microRNA expression in CTC can be used for differential diagnosis of regional and distant metastases.

Keywords: colorectal cancer, circulating tumor cells, miRNA

For citation: Kit O.I., Novikova I.A., Timoshkina N.N. et al. MicroRNA expression profile in isolated circulating tumor cells in colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):49–56. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-49-56

ВВЕДЕНИЕ

Колоректальный рак (КРР) – распространенное заболевание, занимающее 3-е место среди онкологических нозологий как по частоте встречаемости, так и по смертности [1]. В развитых странах, где данное заболевание диагностируется особенно часто, реализуется программа скрининга для пациентов, входящих в группу риска (возраст старше 50 лет, наличие наследственного синдрома) [2]. Методы скрининга включают: 1) анализ стула на наличие крови (анализ кала на скрытую кровь с гваяковой кислотой или иммунохимический тест кала) [3]; 2) эндоскопические исследования (ректоскопия или колоноскопия) [4]; 3) компьютерную томографическую колонографию, которая является менее инвазивным методом. Наиболее надежный подход основывается на исследовании биопсийного материала опухоли. Однако полученные результаты могут не содержать полную информацию об опухолевой ткани в связи с ее неоднородностью как в пространственном, так и во временном контексте. К тому же исследование занимает довольно много времени [5], а процедура биопсии ткани иногда ассоциирована с осложнениями – болевыми ощущениями, кровотечением, инфекциями или перфорациями. Сообщается, что в результате скрининга или диагностики с использованием колоноскопии общая частота нежелательных явлений составляет около 2,8 случая на 1000 наблюдений [6].

Стоит отметить, что методы визуализации или биопсийные исследования не обладают удовлетворительными показателями чувствительности и специфич-

ности для достоверного прогноза риска развития рецидивирования или терапевтического ответа [7]. Сегодня внимание исследователей сосредоточено на разработке более доступных и надежных биомаркеров КРР для преодоления ограничений в диагностике и прогнозе течения данной патологии.

Для поиска биомаркеров используют кровь, мочу, спинномозговую жидкость, кал и слюну [8]. В отношении скрининга, диагностики, лечения КРР, прогнозирования и оценки терапевтического ответа при данной патологии в качестве наиболее перспективных диагностических, прогностических и терапевтических мишеней рассматривают циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), циркулирующую опухолевую ДНК (цоДНК) и микроРНК.

Циркулирующие опухолевые клетки были впервые описаны австралийским врачом Т. Эшвортом в крови умершего пациента [9]. Они происходят как из первичных опухолей, так и из метастатических очагов. Существуют различные биологические фенотипы ЦОК: эпителиальные, мезенхимальные, стволоподобные или смешанные [10, 11]. Циркулирующие опухолевые клетки присутствуют в крови в очень малых количествах, значительно уступая по количеству другим клеткам, особенно лейкоцитам.

Присутствие ЦОК в крови коррелирует с процессом метастазирования. Опухолевые клетки попадают в кровеносное русло путем эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), где они демонстрируют свойства стволовых клеток [12], а затем проникают

в отдаленные органы с помощью мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП). Циркулирующие опухолевые клетки могут иметь маркеры либо ЭМП (например N-кадгерин), либо МЭП (например E-кадгерин) [13, 14]. Кроме того, чтобы циркулировать в кровотоке, эти клетки должны избегать обнаружения иммунной системой [15].

Циркулирующие опухолевые клетки способны нести некоторую информацию об опухоли и использоваться для исследования белков и нуклеиновых кислот (ДНК, РНК). Таким образом, можно применять цитологические и молекулярно-биологические методы исследований этих клеток для решения актуальных задач онкокопроктологии.

По сравнению с уже установленной императивной ролью микроРНК в опухолевой ткани, а также циркулирующих микроРНК в плазме или сыворотке, об экспрессии микроРНК в ЦОК известно намного меньше. Более того, исследования микроРНК ЦОК находятся на самых начальных этапах. Таким образом, **цель** данной работы – исследование особенностей экспрессии микроРНК в ЦОК пациентов с КРР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика исследуемых групп. В исследование включены данные о 299 больных раком ободочной кишки II стадии (T3–4N0M0; $n = 110$) с неблагоприятными факторами прогноза (низкая степень дифференцировки, лимфоваскулярная/перинеуральная инвазия), III стадии (T1–4N1–2M0; $n = 88$) и IV стадии (T1–4N0–2M1; $n = 101$), находившихся на лечении в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России с 2012 по 2016 г. Возраст пациентов варьировал от 42 до 86 лет (средний возраст $64,2 \pm 1,7$ года). Достоверных различий в среднем возрасте больных с заболеванием разных стадий выявлено не было. У больных КРР II стадии этот показатель составил $62,8 \pm 1,9$ года, III стадии – $66,2 \pm 1,8$ года, IV стадии – $64,6 \pm 2,0$ года. Стадирование пациентов проводилось в соответствии с 8-м изданием международной классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) [16].

Детекция и сепарация циркулирующих опухолевых клеток. Детекцию ЦОК проводили с использованием системы Veridex CellSearch™ (JanssenDiagnostics, США) с учетом рекомендаций производителя. Кровь в объеме 8–10 мл отбирали в пробирки CellSave Preservative Tube, содержащие антикоагулянт этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), а также реагент для сохранения жизнеспособности опухолевых клеток. Забор крови осуществляли до проведения оперативного вмешательства. Для выявления ЦОК клетки иммуномагнитно обогащали микрочастицами железа, покрытыми антителами к маркерам адгезии эпителиальных клеток EpCAM, CD45 и цитокератинам 8, 18, 19. Материал сканировали в анализаторе CellTracks® Analyzer II® (Cellsearch, США).

У ЦОК-положительных пациентов был взят дополнительный образец крови объемом 10 мл для сепарации ЦОК и последующего молекулярного профилирования с использованием набора CellSearch® Profile Kit (Menarini Silicon Biosystems, Италия) и системы CELLTRACKS® AUTOPREP® (Cellsearch, США) с учетом рекомендаций производителей. Полученные в результате иммуномагнитного обогащения опухолевые клетки, экспрессирующие молекулу адгезии эпителиальных клеток (EpCAM), без дополнительного окрашивания и подсчета клеток, а также после удаления лейкоцитов и других компонентов крови были использованы для дальнейших исследований. Оценку различия долей качественных признаков между группами определяли с помощью критерия χ^2 с непараметрической поправкой Мантеля–Ханзеля (метод кросстабуляции в программе Statistica 12).

Выделение микроРНК и оценка ее относительной экспрессии. Тотальную РНК выделяли с помощью набора miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) и автоматической станции выделения QIAcube Connect (Qiagen, Германия) с учетом рекомендаций производителя. Выделенную тотальную РНК подвергали обратной транскрипции, совмещенной с реакцией полиаденилирования. Уровень полученной комплементарной ДНК оценивали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Дизайн синтетических олигонуклеотидов осуществляли с использованием алгоритма Balcells I [17]. Реакционная смесь для обратной транскрипции содержала 1x поли(А)буфер, 10 U/мкл Reverse Transcriptase MMLV, 0,1 mM dNTPs, 0,1 mM АТФ, 1 μ M RT-праймера, 0,5 U/мкл Poly(A)-полимеразы и 1 мкг тотальной РНК. Смесь инкубировали 15 мин при 16 °C и 15 мин при 42 °C. Затем обратную транскриптазу инактивировали нагреванием 90 °C в течение 5 мин.

Уровень представленности транскриптов микроРНК определяли методом ПЦР в реальном времени. Амплификацию проводили в присутствии интеркалирующего красителя EvaGreen, 20 мкл PCR-смеси: 1x PCR-буфер, 0,25 mM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 1 ед. акт. Taq-DNA-полимеразы, по 500 нМ прямого и обратного праймеров. Для амплификации использовали следующую программу: 2 мин – 94 °C; 50 циклов: 95 °C – 10 с, 64 °C – 20 с. Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью амплификатора ДТпрайм («ДНК-технологии», Россия).

Уровень изменения экспрессии микроРНК (Rm) рассчитывали по формуле:

$$Rm = E^{-\Delta\Delta Ct}$$

Нормализацию результатов выполняли по референсным локусам (RNU6 и hsa-miR-16) и уровню экспрессии соответствующих микроРНК в образцах контрольной группы. Анализ данных по экспрессии микроРНК, полученных методом ПЦР в реальном

времени, проводился на языке программирования Python (библиотека SciPy) [18]: межгрупповые различия оценивали с использованием U-критерия Манна–Уитни и поправки Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Частота выявления циркулирующих опухолевых клеток у больных раком ободочной кишки и их связь со стадией заболевания. Результаты исследования показали, что у больных раком ободочной кишки различных стадий ЦОК выявлены в 62,9 % случаев (у 188 из 299 пациентов) (в количестве от 1 до 402 клеток), тогда как отсутствие опухолевых клеток в периферической крови больных отмечено в 37,1 % случаев (у 111 из 299 пациентов). В анализ были включены пациенты, у которых обнаружены 1–3 и >3 ЦОК. Число больных, у которых выявлены 1–3 и >3 ЦОК, оказалось равным (50 %; у 94 из 188 больных). Распределение больных КРР в зависимости от уровня ЦОК и стадии заболевания представлено в табл. 1.

В ходе нашего исследования выявлены различия в уровне ЦОК в зависимости от отдельных критериев по классификации TNM. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Согласно данным, представленным в табл. 2, в группе больных с опухолями pT1–2 преобладали пациенты, у которых не были выявлены ЦОК (53,3 % случаев). При pT4 характерной оказалась высокая частота обнаружения ЦОК, при этом на 7,4 % чаще определялись от 1 до 3 ЦОК. Вероятность выявления 1–3 и >3 ЦОК при pT3 была одинаковой. При pT1–2 >3 ЦОК обнаруживались несколько чаще (на 11,1 %) по сравнению с 1–3 ЦОК. При этом при pT4 1–3 ЦОК были выявлены в 2,7 и 1,7 раза чаще ($p < 0,05$), а >3 ЦОК – в 2,1 и 1,4 раза чаще ($p \leq 0,05$), чем при pT1–2 и pT3 соответственно.

В ходе исследования выявлена достоверно значимая взаимосвязь метастазирования в регионарные лимфатические узлы и уровня ЦОК. Так, наиболее часто отсутствие ЦОК отмечалось при N0 (70,7 % случаев), тогда как наличие опухолевых клеток в периферической крови – при наличии поражения лимфатических узлов N1 (84,7 % случаев) и N2 (83,3 % случаев).

При N2 >3 ЦОК обнаружены у 50 % пациентов, тогда как максимальная частота обнаружения 1–3 ЦОК оказалась характерна для N1 (46,0 % случаев). В целом различия в выявлении ЦОК при различной степени метастатического поражения лимфатических узлов отмечено не было. Доля больных, у которых обнаружены ЦОК при отсутствии метастатического поражения лимфатических узлов, была в 2,9 и 2,8 раза меньше доли больных с N1 и N2 ($p \leq 0,05$). Наличие метастатического поражения в 2,1 раза повышает вероятность выявления ЦОК: при метастазах >3 ЦОК обнаруживаются в 60,1 раза чаще, чем при M0 ($p \leq 0,05$). Таким образом, проведенный нами анализ уровня ЦОК и критериев классификации по системе TNM показал статистически значимую связь по всем исследованным параметрам ($p < 0,001$).

Профиль экспрессии микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках у больных раком ободочной кишки II–IV стадий. В изолированных ЦОК с помощью ПЦР в реальном времени была определена экспрессия 7 микроРНК – hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-26a-5p и hsa-miR-92a-3p. Панель микроРНК сформирована на основе исследования дифференциальной экспрессии микроРНК в образцах тканей КРР методом секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) [19].

Результаты исследования уровня относительной экспрессии микроРНК в ЦОК больных раком ободочной кишки разных стадий и сравнение этих показателей у пациентов с заболеванием III и IV стадий и II стадии представлены в табл. 3.

Экспрессия микроРНК hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p в ЦОК пациентов с заболеванием III стадии относительно экспрессии в ЦОК пациентов с заболеванием II стадии была ниже в 2,5 и 5 раз ($p < 0,05$) соответственно, а экспрессия hsa-miR-21-5p и hsa-miR-92a-3p – выше в 3,2 и 3 раза ($p < 0,05$) соответственно. В ЦОК больных КРР IV стадии аналогично относительная экспрессия hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p была статистически значимо ($p < 0,05$) ниже (в 4,6 и 5,3 раза соответственно) по сравнению с экспрессией в ЦОК больных КРР II стадии, а экспрессия hsa-miR-126-5p,

Таблица 1. Распределение пациентов с колоректальным раком в зависимости от уровня циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) и стадии заболевания

Table 1. Distribution of patients with colorectal cancer per the level of circulating tumor cells (CTC) and disease stage

Стадия Stage	0 ЦОК 0 CTC		1–3 ЦОК 1–3 CTC		>3 ЦОК >3 CTC		p (χ^2)
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	
II ($n = 110$)	67	60,9	23	20,9	20	18,2	$p < 0,001$ ($\chi^2 = 44,244$)
III ($n = 88$)	25	28,4	31	35,2	32	36,4	
IV ($n = 101$)	19	18,8	40	39,6	42	41,6	

Таблица 2. Анализ уровня циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в зависимости от критериев классификации Tumor, Nodus and Metastasis (TMN)

Table 2. Analysis of the level of circulating tumor cells (CTC) depending on the Tumor, Nodus and Metastasis (TMN) criteria

Характеристика опухоли Tumor characteristic	0 ЦОК 0 CTC		1–3 ЦОК 1–3 CTC		>3 ЦОК >3 CTC		p (χ^2)
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	
Степень распространенности опухоли Tumor advancement stage							
pT1–2 (n = 45)	24	53,3	8	17,8	13	28,9	p < 0,001 ($\chi^2 = 32,793$)
pT3 (n = 172)	77	44,8	47	27,3	48	27,9	
pT4 (n = 82)	10	12,2	39	47,6	33	40,2	
Метастазирование в регионарные лимфатические узлы Metastases in the regional lymph nodes							
N0 (n = 116)	82	70,7	19	16,4	15	12,9	p < 0,001 ($\chi^2 = 95,834$)
N1 (n = 111)	17	15,3	51	46,0	43	38,7	
N2 (n = 72)	12	16,7	24	33,3	36	50,0	
Отдаленное метастазирование Distant metastases							
M0 (n = 198)	108	54,6	87	43,9	3	1,5	p < 0,001 ($\chi^2 = 244,004$)

Таблица 3. Относительная экспрессия микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках у пациентов с раком ободочной кишки

Table 3. Relative microRNA expression in circulating tumor cells of patients with colon cancer

Стадия Stage	МикроРНК microRNA	Rm	p-value	p _{adj}
III (T1–4N1–2M0)	hsa-let-7i-5p	1,350	0,120	0,150
	hsa-miR-126-5p	1,920	0,060	0,110
	hsa-miR-143-3p	0,401	0,020	0,035
	hsa-miR-21-5p	3,178	0,000	0,040
	hsa-miR-25-3p	1,016	0,040	0,050
	hsa-miR-26a-5p	0,200	0,025	0,030
	hsa-miR-92a-3p	2,987	0,011	0,040
IV (T1–4N0–2M1)	hsa-let-7i-5p	2,004	0,040	0,055
	hsa-miR-126-5p	2,585	0,030	0,045
	hsa-miR-143-3p	0,217	0,020	0,030
	hsa-miR-21-5p	4,581	0,010	0,040
	hsa-miR-25-3p	2,600	0,040	0,045
	hsa-miR-26a-5p	0,190	0,040	0,050
	hsa-miR-92a-3p	5,003	0,010	0,035

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия показателей относительно пациентов с заболеванием II стадии ($p_1 < 0,05$). Rm – уровень изменения экспрессии; p-value – U-критерий Манна–Уитни; p_{adj} – критерий с поправкой на множественные сравнения.

Note. Statistically significant differences ($p_1 < 0.05$) relative to patients with stage II diseases are shown in bold. Rm – level of expression change; p-value – Mann–Whitney U-test; p_{adj} – test with correction for multiple testing.

hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p и hsa-miR-92a-3p – статистически значимо ($p < 0,05$) выше (в 2,6; 4,6; 2,6 и 5,0 раз соответственно) по сравнению с экспрессией в ЦОК больных КРР II стадии (см. табл. 3). При этом экспрессия hsa-miR-143-3p в ЦОК пациентов с заболеванием IV стадии оказалась в 1,8 раза ($p < 0,05$) ниже по сравнению с этим показателем у пациентов с заболеванием III стадии, а экспрессия hsa-miR-92a-3p – в 1,7 раза ($p < 0,05$) выше в ЦОК пациентов с заболеванием IV стадии по сравнению с этим показателем пациентов с заболеванием III стадии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Метастазирование является следствием распространения опухолевых клеток из первичной опухоли в органы-мишени. Метастатические процессы включают рост первичной опухоли, диссеминацию первичных опухолевых клеток в кровотоки, выживание опухолевых клеток в кровотоке, экстравазацию в органы-мишени и образование отдаленных метастазов [20]. Однако рутинные диагностические методы, включая гистологическое исследование, визуализацию с высоким разрешением и применение сывороточных опухолевых маркеров, не способны предоставить достаточно информации о развивающемся процессе метастазирования. Недавние исследования показали, что образование ЦОК является ключевым этапом метастазирования, и обнаружение ЦОК в крови больных раком с помощью иммуноцитохимических и молекулярных анализов может отражать метастатический процесс [21].

Несмотря на прогресс в ранней диагностике и улучшение эффективности адъювантной терапии, у многих пациентов с КРР наблюдаются прогрессирование заболевания и возникновение рецидива [22]. Это подчеркивает необходимость поиска прогностических факторов для определения индивидуального риска развития рецидива заболевания.

Согласно данным, представленным в табл. 1, максимальное число случаев с отсутствием ЦОК наблюдалось при заболевании II стадии (60,9 %). Этот показатель был выше, чем при заболевании III и IV стадий, в 2,1 и 3,2 раза соответственно. Доля пациентов с КРР II стадии с выявленными ЦОК составила 39,1 %, тогда как доля пациентов с КРР III и IV стадий – 71,6 и 81,2 % соответственно. Вероятность обнаружения ЦОК при заболевании IV стадии возростала в 2,1 раза по сравнению с заболеванием II стадии и в 1,1 раза по сравнению с заболеванием III стадии. В нашем исследовании среди пациентов с КРР IV стадии преобладали больные с уровнем ЦОК >3 ; они составили 41,6 %, что в 2,3 и 1,1 раза превышало данный показатель у больных с КРР II и III стадий. Чаще всего 1–3 ЦОК выявлялись при IV стадии заболевания. Число больных с данной стадией КРР с таким количеством ЦОК было в 1,9 раза выше по сравнению с больными с КРР II стадии. Незначительные различия

в частоте выявления 1–3 ЦОК обнаружены при заболевании III и IV стадий. Мы выявили достоверно значимую связь количества ЦОК в периферической крови и стадии заболевания ($p \leq 0,05$). Так, при увеличении стадии КРР отмечено повышение частоты обнаружения ЦОК от II к IV стадии и доли больных с >3 ЦОК.

МикроРНК, присутствующие в периферической крови, представляют собой либо внеклеточные циркулирующие, либо ЦОК-ассоциированные молекулы. Многочисленные исследования продемонстрировали клиническую значимость циркулирующих микроРНК в качестве прогностических факторов, мишеней для лекарств и предикторов ответа на терапию у онкологических больных [23].

В нашем исследовании проведено сравнение результатов экспрессии микроРНК в ЦОК. По уровню экспрессии hsa-miR-26a-5p можно дифференцировать рак ободочной кишки с отсутствием и наличием метастазов, поскольку данный показатель имеет статистически значимые различия в ЦОК. В литературе приводятся прямо противоположные данные о функции этой микроРНК при КРР и других опухолях: одни авторы считают ее индуктором аутофагии, химиорезистентности и рецидивирования КРР [24], другие – ингибитором агрессивности клеток КРР [25]. Проонкогенные свойства miR-26a-5p описаны при остеосаркоме [26], и, напротив, свойства, ингибирующие рост и инвазию, показаны при раке желудка [27].

Одной из ключевых особенностей ЭМП является потеря целостности эпителия, осуществляемая за счет протеолитического расщепления матричными металлопротеиназами (ММП), экспрессия которых регулируется hsa-miR-21-5p, hsa-miR-143-3p и hsa-miR-26a-5p. Известно, что hsa-miR-21-5p и hsa-miR-26a-5p положительно модулируют транскрипцию ММП-2 и ММП-14 соответственно, тогда как hsa-miR-143-3p ингибирует экспрессию ММП-14 [28]. Ранее сообщалось, что hsa-miR-21 способствовала миграции и инвазии опухолевых клеток за счет усиления экспрессии ММП-2 и ММП-9 при гепатоцеллюлярной карциноме [29]. При этом hsa-miR-143 оказывает положительный эффект: подавляя транскрипцию ММП-2 и ММП-9, она препятствует миграции и инвазии опухолевых клеток, снижает вероятность метастазирования.

Процесс ЭМП сопровождается ремоделированием цитоскелета, которое частично обусловлено изменением экспрессии белков эзрина, радикина и мозина (ERM) [30]. Белки ERM взаимодействуют с CD44 – известным маркером метастазирования, который способен связываться с внеклеточными протеогликанами, версиканом и гиалуронатом и регулировать клеточную подвижность.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что повышение уровней hsa-let-7i-5p, hsa-miR-126-5p, hsa-miR-21-5p и hsa-miR-25-3p в сочетании со снижением уровня hsa-miR-143-3p в группах больных с метастазированием и в случае

неблагоприятного исхода приводит к повышению экспрессии версикана и CD44 и интенсификации ЭМП. Так, в работе L. Yan и соавт. было показано, что повышение уровня hsa-miR-21-5p сопряжено со сверхэкспрессией CD44 в келоидных кератиноцитах, инвазией и миграцией клеток, опосредованной ЭМП [31]. Позднее S. Irani и G. Shokri обнаружили, что трансфекция hsa-miR-143 в клеточную культуру подавляет экспрессию CD44 и препятствует ангиогенезу и пролиферации опухолевых стволовых клеток плоскоклеточного рака полости рта [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

МикроРНК являются важными регуляторами возникновения и прогрессирования опухоли, а уровень их экспрессии может быть использован для прогнози-

рования течения заболевания или ответа на терапию. Согласно некоторым исследованиям, микроРНК участвуют в регуляции метастазирования и могут использоваться в качестве новых биомаркеров для обнаружения ЦОК. В нашем исследовании отдаленное метастазирование характеризуется снижением экспрессии в ЦОК микроРНК hsa-miR-143-3p, hsa-miR-26a-5p и повышением экспрессии hsa-miR-126-5p и hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-21-5p и hsa-miR-25-3p по сравнению с ЦОК больных без метастазов ($p < 0,05$). Выявлены статистически значимые различия в уровнях экспрессии hsa-miR-26a-5p в ЦОК между у больных заболеванием II и III–IV стадий ($p < 0,05$), что может быть использовано для дифференциальной диагностики наличия регионарных и отдаленных метастазов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424. DOI: g/10.3322/caac.21492
- Siegel R.L., Torre L.A., Soerjomataram I. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults. *Gut* 2019;68(12):2179–85. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-319511
- Lee J.K., Liles E.G., Bent S. et al. Accuracy of fecal immunochemical tests for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2014;160(3):171–81. DOI: 10.7326/M13-1484
- Bray C., Bell L.N., Liang H. et al. Colorectal cancer screening. *WJM* 2017;116(1):27–33.
- Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–92. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205
- Brown S.R., Hicks T.C., Whitlow C.B. Diagnostic and therapeutic colonoscopy. *Shackelford's Surg Alimentary Tract* 2019;2:1689–99. DOI: 10.1016/B978-0-323-40232-3.00145-X
- Nagata K., Takabayashi K., Yasuda T. et al. Adverse events during CT colonography for screening, diagnosis and preoperative staging of colorectal cancer: a Japanese national survey. *Eur Radiol* 2017;27(12):4970–8. DOI: 10.1007/s00330-017-4920-y
- Siravegna G., Marsoni S., Siena S. et al. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(9):531–48. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.14
- Ashworth T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869;14:146.
- Millner L.M., Linder M.W., Valdes R. Circulating tumor cells: a review of present methods and the need to identify heterogeneous phenotypes. *Ann Clin Lab Sci* 2013;43(3):295–304.
- Кит О.И., Колесников В.Е., Толмах Р.Е. и др. Циркулирующие опухолевые клетки и их связь с клинико-морфологическими характеристиками колоректального рака. *Казанский медицинский журнал* 2018;99(1):5–9. DOI: 10.17816/KMJ2018-005
- Kit O.I., Kolesnikov V.E., Tolmakh R.E. et al. Circulating tumor cells and their association with clinical and morphological characteristics of colorectal cancer. *Kazanskii meditsinskii zhurnal = Kazan Medical Journal* 2018;99(1):5–9. (In Russ.). DOI: 10.17816/KMJ2018-005
- Mélin C., Perraud A., Christou N. et al. New ex-ovo colorectal-cancer models from different SdFFF-sorted tumor-initiating cells. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(28):8433–43. DOI: 10.1007/s00216-015-9029-z
- Christou N., Perraud A., Blondy S. et al. The extracellular domain of E cadherin linked to invasiveness in colorectal cancer: a new resistance and relapses monitoring serum-bio marker? *J Cancer Res Clin Oncol* 2017;143(7):1177–90. DOI: 10.1007/s00432-017-2382-x
- Christou N., Perraud A., Blondy S. et al. E-cadherin: a potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncol Lett* 2017;13(6):4571–6. DOI: 10.3892/ol.2017.6063
- Jaiswal S., Jamieson C.H., Pang W.W. et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 2009;138(2):271–85. DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.046
- TNM classification of malignant tumours. Ed. by J.D. Brierley, M.K. Gospodarowicz, C. Wittekind. John Wiley & Sons, 2017.
- Balcells I., Cirera S., Busk P.K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol* 2011;11(1):1–11. DOI: 10.1186/1472-6750-11-70
- Jones E., Oliphant T., Peterson P. SciPy: open source scientific tools for Python. 2001. Available at: https://www.researchgate.net/publication/213877848_SciPy_Open_Source_Scientific_Tools_for_Python
- Новикова И.А., Тимошкина Н.Н., Кутилин Д.С. Дифференциальная экспрессия микроРНК в опухолевых и нормальных тканях толстой кишки. *Якутский медицинский журнал* 2020;4:74–82. DOI: 10.25789/YMJ.2020.72.19
- Novikova I.A., Timoshkina N.N., Kutulin D.S. Differential miRNA expression in tumor and normal tissues of the colon. *Yakutskii meditsinskii zhurnal = Yakut Medical Journal* 2020;4:74–82. (In Russ.). DOI: 10.25789/YMJ.2020.72.19
- Coumans F.A., Siesling S., Terstappen L.W. Detection of cancer before distant metastasis. *BMC Cancer* 2013;13(1):1–12. DOI: 10.1186/1471-2407-13-283
- Dong Y., Skelley A.M., Merdek K.D. et al. Microfluidics and circulating tumor cells. *J Mol Diagn* 2013;15(2):149–57. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2012.09.004
- Кит О.И., Дженкова Е.А., Мирзоян Э.А. и др. Молекулярно-генетическая классификация подтипов колоректального рака: современное состояние проблемы. *Южно-российский онкологический журнал* 2021;2(2):50–6. DOI: 0.37748/2686-9039-2021-2-2-6
- Kit O.I., Dzhenkova E.A., Mirzoyan E.A. et al. Molecular genetic classification of colorectal cancer subtypes: the current state

- of the problem. *Yuzhno-rossiiskii onkologicheskii zhurnal = South Russian Journal of Oncology* 2021;2(2):50–6. (In Russ.). DOI: 0.37748/2686-9039-2021-2-2-6
23. Mostert B., Sieuwerts A.M., Martens J.W. et al. Diagnostic applications of cell-free and circulating tumor cell-associated miRNAs in cancer patients. *Exp Rev Mol Diagn* 2011;11(3):259–75. DOI: 10.1586/erm.11.11
 24. Chen B., Deng Y.N., Wang X. miR-26a enhances colorectal cancer cell growth by targeting RREB1 deacetylation to activate AKT-mediated glycolysis. *Cancer Lett* 2021;521:1–13. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.08.017
 25. Li Y., Sun Z., Liu B. et al. Tumor-suppressive miR-26a and miR-26b inhibit cell aggressiveness by regulating FUT4 in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2017;8(6):e2892. DOI: 10.1038/ctdis.2017.281
 26. Wang Z., Wang Z., Liu J. et al. Long non-coding RNA SNHG5 sponges miR-26a to promote the tumorigenesis of osteosarcoma by targeting ROCK1. *Biomed Pharmacother* 2018;107:598–605. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.08.025
 27. Li H.H., Wang J.D., Wang W. et al. Effect of miR-26a-5p on gastric cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting COL10A1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;24(3):1186–94. DOI: 10.26355/eurrev_202002_20170
 28. Zhong Y., Li L., Chen Z. et al. MiR143 inhibits steroidogenesis and induces apoptosis repressed by H3K27me3 in granulosa cells. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:565261. DOI: 10.3389/fcell.2020.565261
 29. Zhu Q., Wang Z., Hu Y. et al. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2012;27(5):1660–8. DOI: 10.3892/or.2012.1682
 30. Tsukita S., Oishi K., Sato N. et al. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 1994;126(2):391–401. DOI: 10.1083/jcb.126.2.391
 31. Yan L., Cao R., Liu Y. et al. MiR-21-5p links epithelial-mesenchymal transition phenotype with stem-like cell signatures via AKT signaling in keloid keratinocytes. *Sci Rep* 2016;6(1):1–11. DOI: 10.1038/srep28281
 32. Irani S., Shokri G. The role of miR-143, miR-145, and miR-590 in expression levels of CD44 and vascular endothelial cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Middle East J Cancer* 2019;10(3):194–204.

Вклад авторов

О.И. Кит: координирование исследования;
 И.А. Новикова: сбор и анализ данных, статистический анализ данных, написание текста статьи;
 Н.Н. Тимошкина, А.В. Шапошников: редактирование;
 Д.Ю. Гвалдин: анализ циркулирующих опухолевых клеток;
 А.А. Пушкин: анализ относительной экспрессии микроРНК;
 О.Ю. Каймакчи, А.А. Маслов: хирургическое лечение больных, сбор биологических образцов, материала для анализа.

Authors' contribution

O.I Kit: research coordination;
 I.A. Novikova: data collection and analysis, statistical data analysis, article writing;
 N.N. Timoshkina, A.V. Shaposhnikov: editing;
 D.Yu. Gvaldin: analysis of circulating tumor cells;
 A.A. Pushkin: analysis of relative miRNA expression;
 O.Yu. Kaymakchi, A.A. Maslov: surgical treatment of patients, collection of biological samples, material for analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.И. Кит / O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>
 И.А. Новикова / I.A. Novikova: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>
 Н.Н. Тимошкина / N.N. Timoshkina: <https://orcid.org/0000-0001-6358-7361>
 Д.Ю. Гвалдин / D.Yu. Gvaldin: <https://orcid.org/0000-0001-8633-2660>
 А.А. Пушкин / A.A. Pushkin: <https://orcid.org/0000-0003-2385-6285>
 А.А. Маслов / A.A. Maslov: <https://orcid.org/0000-0001-7328-8074>
 А.В. Шапошников / A.V. Shaposhnikov: <https://orcid.org/0000-0001-6881-2281>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено в рамках экспериментального государственного задания Минздрава России.

Funding. The study was conducted as part of an experimental state task of the Ministry of Health of Russia.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The protocol of the study was approved by the local ethics committee of the National Medical Research Centre for Oncology, Ministry of Health of Russia. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 15.09.2022. **Принята к публикации:** 07.02.2023.

Article submitted: 15.09.2022. **Accepted for publication:** 07.02.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-57-78



Особенности транскрипционной активности генов в различных гистологических подтипах плоскоклеточного рака языка

Д.С. Кутилин, А.Э. Данилова, А.Ю. Максимов, А.В. Снежко, М.А. Енгибарян

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037
Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

Контакты: Денис Сергеевич Кутилин k.denees@yandex.ru

Введение. На протяжении последнего десятилетия рак языка сохраняет лидирующие позиции в общей структуре заболеваемости злокачественными опухолями головы и шеи. Плоскоклеточный тип рака языка является агрессивной формой и имеет клинически непредсказуемый прогноз. В настоящее время выделяют несколько гистологических подтипов этой патологии. Поиск новых прогностических факторов, которые могли бы отражать фактическое состояние опухолевой прогрессии и давать объективный прогноз развития болезни, является актуальным направлением исследований в молекулярной онкологии. Такими факторами могут выступать определенные транскрипционные характеристики опухолей, определяющие особенности патогенеза в каждом конкретном случае.

Цель исследования – изучение особенностей транскрипционной активности генов в различных гистологических подтипах плоскоклеточного рака языка с применением биоинформационных и молекулярных подходов.

Материалы и методы. Этап скринингового биоинформационного анализа выполнен с использованием интерактивного веб-сервера анализа данных по экспрессии матричной РНК 9736 образцов опухолей и 8587 образцов нормальной ткани из проектов Атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA) и Genotype-Tissue Expression (GTEx) с применением стандартного конвейера обработки Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA). В ходе основного (валидационного) этапа исследования анализировались данные 300 больных с местно-распространенными злокачественными опухолями языка. Уровень относительной экспрессии генов, выявленных на этапе биоинформационного анализа, определяли методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. В ходе биоинформационного анализа выделены 1488 генов, увеличивающих экспрессию, и 589 генов, уменьшающих экспрессию, при плоскоклеточном раке языка. Из этих 2077 генов были выбраны 23 генетических локуса, наиболее сильно изменяющих экспрессию в опухолевой ткани относительно нормальной ткани языка. Из них при валидации методом полимеразной цепной реакции только 14 изменяли свой транскрипционный профиль в опухолевой ткани относительно нормальной: *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*. При анализе данных с помощью полимеразной цепной реакции выявлена значительная гетерогенность в ряде исследованных биологических образцов. Кластерный анализ позволил разделить общую выборку из 300 пациентов на 3 группы, различающиеся по экспрессии генов: кластер 1 ($n = 90$), кластер 2 ($n = 101$) и кластер 3 ($n = 109$), соответствующие базалоидному, акантолитическому и обычному гистологическим подтипам.

Заключение. Таким образом, в ходе исследования выявлен ряд молекулярных маркеров плоскоклеточного рака языка (*MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*), а также транскрипционные особенности различных гистологических подтипов этого заболевания.

Ключевые слова: экспрессия генов, плоскоклеточный рак языка, сигнальные пути, гистологические подтипы, металлотеопроминазы, остеопонтин, NADH-убихиноноксидоредуктаза, дифференцировка кератиноцитов

Для цитирования: Кутилин Д.С., Данилова А.Э., Максимов А.Ю. и др. Особенности транскрипционной активности генов в различных гистологических подтипах плоскоклеточного рака языка. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(1):57–78. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-57-78

Genes transcriptional activity features in different histological subtypes of tongue squamous cell carcinoma

D.S. Kutilin, A.E. Danilova, A.Yu. Maksimov, A.V. Snezhko, M.A. Engibaryan

National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Line, Rostov-on-Don 344037, Russia

Contacts: Denis Sergeevich Kutilin *k.denees@yandex.ru*

Introduction. Over the past decade, tongue cancer has maintained a leading position in the overall structure of the incidence of head and neck malignant tumors. Squamous cell carcinoma of the tongue is an aggressive form and has a clinically unpredictable prognosis. Currently, there are several histological subtypes of this disease. And the search for new prognostic factors that could reflect the actual state of tumor progression and give an objective prognosis of disease development is an important research area in molecular oncology. Such factors may be certain transcriptomic characteristics of tumors, which determine the features of pathogenesis in each specific case.

Aim. To research genes transcriptional activity features in various histological subtypes of tongue squamous cell carcinoma using bioinformatic and molecular approaches.

Materials and methods. The stage of screening bioinformatics analysis was performed using an interactive web server for analyzing data on messenger RNA expression of 9736 tumors and 8587 normal samples from the The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) projects using a standard processing pipeline (GEPIA). The main (validation) stage of the study was performed on 300 patients with locally advanced malignant tumors of the tongue. The quantitative real-time polymerase chain reaction method was used to determine the values of the relative expression of genes identified at the stage of bioinformatic analysis.

Results. Bioinformatic analysis identified 1488 genes that increase expression and 589 genes that decrease expression in tongue squamous cell carcinoma. Of these 2077 genes, 23 genetic loci were selected that most strongly alter expression in tumor tissue relative to normal tissue of the tongue. Of these, when validated by polymerase chain reaction, only 14 changed their transcriptional profile in tumor tissue relative to normal: *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* and *CLU*. The analysis of polymerase chain reaction data revealed significant heterogeneity in a number of biological samples studied. Cluster analysis made it possible to divide the total sample of 300 patients into 3 groups differing in gene expression: cluster 1 ($n = 90$), cluster 2 ($n = 101$) and cluster 3 ($n = 109$), corresponding to the basaloid, acantholytic and usual histological subtypes. Thus, the study made it possible to identify a number of molecular markers of tongue squamous cell carcinoma (*MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* and *CLU*), as well as to reveal the transcriptional features of various histological subtypes of this disease.

Keywords: gene expression, tongue squamous cell carcinoma, signaling pathways, histological subtypes, metalloproteinases, osteopontin, NADH-ubiquinone oxidoreductase, keratinocyte differentiation

For citation: Kutilin D.S., Danilova A.E., Maksimov A.Yu. et al. Genes transcriptional activity features in different histological subtypes of tongue squamous cell carcinoma. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):57–78. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-57-78

ВВЕДЕНИЕ

Плоскоклеточный рак слизистой оболочки полости рта составляет 90–95 % всех злокачественных новообразований этой локализации. Основную долю данной патологии занимают опухоли языка и дна ротовой полости (11 %) [1]. На протяжении последнего десятилетия рак языка сохраняет лидирующие позиции в общей структуре заболеваемости злокачественными опухолями головы и шеи. В 2021 г. в мире от него умерли более 135 тыс. человек [2].

С точки зрения биологического поведения рак языка считается агрессивной формой плоскоклеточного рака. Язык обладает богатой сосудистой лимфатической сетью и хорошо представленной мускулатурой, что объясняет повышенную склонность плоскоклеточного рака этой локализации к инвазии и метастазированию [3]. В то же время данная патология характеризуется клинически непредсказуемым прогнозом с учетом высокой частоты развития скрытых метастазов у пациентов с небольшими первичными опухолями и отсутствием клинических признаков метастатического заболевания [4]. Так, в ряде исследований показано, что у больных раком языка, возникшим в основании языка, 5-летняя выживаемость составляет менее 40 %, а при остальных локализациях этот показатель не превышает 50 % [5].

Наиболее частым гистологическим вариантом является обычный тип плоскоклеточного рака языка (54 %) без казуистики. Эта разновидность данной патологии образована неопластическими клетками с различной степенью дифференцировки [3]. Вторым по частоте встречаемости гистопатологическим подтипом является акантолитический, который диагностируется у 26 % больных. Он характеризуется лобулярным/инсулярным паттерном роста с присутствием псевдожелезистых/псевдолюминальных пространств, возникающих в результате акантолиза [3]. Базалоидный подтип диагностируется в 13 % случаев. Характер роста в данном случае переменный: с дольчатыми/островковыми, трабекулярными, решетчатыми областями и гнездами опухолевых клеток. Основной чертой этого подтипа является наличие опухолевых клеток на периферии неопластических разрастаний. При саркоматоидном подтипе наблюдаются смешанные участки обычной плоскоклеточной карциномы со злокачественной пролиферацией веретенообразных клеток. Паттерн саркоматоидной пролиферации преимущественно фасцикулярный, редко сториформный; опухолевые клетки смешиваются с воспалительными клетками и редко имеют эпителиоидную морфологию. Верукозный подтип рака языка характеризуется широким фронтом инвазии в подлежащий слой в виде

пухлых папиллярных инвагинаций утолщенного эпителия с минимальной атипией. В поверхностном эпителии обнаруживается гиперпаракератоз, особенно сильно выраженный на уровне участков инвагинаций [3].

Канцерогенез вообще и в рассматриваемом случае в частности представляет собой многоэтапный процесс, модулируемый эндогенными и экзогенными факторами. Среди них большую роль играют регулярное употребление табака и алкоголя, а также персистирующая инфекция вируса папилломы человека (ВПЧ) [6]. Эти факторы могут привести к широкому спектру генетических и эпигенетических событий, которые способствуют нестабильности генома, развитию и прогрессированию опухоли. Развитие и прогрессирование предраковых заболеваний языка обусловлены не только необратимыми изменениями в последовательности ДНК, включая делеции, амплификации и мутации генов, приводящими как к активации онкогенов, так и к инактивации генов-супрессоров опухолей, но и изменениями в экспрессии генов [7–10].

Выбор метода лечения обычно зависит от клинико-морфологических параметров опухоли: локализации и объема опухолевого очага, наличия метастазов в лимфатических узлах и степени гистологической дифференцировки ткани. Однако на ранних стадиях опухолевого процесса эти прогностические факторы часто неэффективны. Для выбора оптимальных методов лечения возникает потребность в дополнительных прогностических факторах, которые могли бы отражать фактическое состояние опухолевой прогрессии и давать объективный прогноз развития заболевания. Ими могут выступать определенные транскриптомные характеристики опухолей, определяющие особенности патогенеза в каждом конкретном случае [11].

Из-за высокой смертности и низкой частоты излечения плоскоклеточный рак языка представляет собой серьезную проблему общественного здравоохранения и имеет большое индивидуальное и социально-экономическое значение [12]. Генетические полиморфизмы и экологические факторы риска, связанные с его развитием, достаточно изучены. А вот исследование транскрипционных нарушений при канцерогенезе все еще остается важной задачей, решение которой даст профилактическое, диагностическое и терапевтическое преимущество [12].

Поэтому **целью исследования** стало изучение особенностей транскрипционной активности генов в различных гистологических подтипах плоскоклеточного рака языка с применением биоинформационных и молекулярных подходов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии (Ростов-на-Дону) в период с 2019 по 2022 г. Проанализированы данные комплексного клинического и молекулярного

обследований 300 пациентов с местно-распространенными злокачественными опухолями языка.

Скрининговый биоинформационный анализ. На этом этапе исследования использовали интерактивный веб-сервер анализа данных по экспрессии матричной РНК (мРНК) 9736 образцов опухолей и 8587 образцов нормальной ткани из проектов Атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas, TCGA) и Genotype-Tissue Expression (GTEx) с применением стандартного конвейера обработки Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA), включающего ряд функций, таких как дифференциальный анализ экспрессии генов (опухоль/норма), профилирование в соответствии с типами опухолей или патологическими стадиями, анализ выживаемости пациентов, обнаружение сходных генов и корреляционный анализ. Этот инструмент разработан сотрудниками Zhang Lab Пекинского университета Z. Tang, C. Li и B. Kang. Используемые GEPIA наборы данных RNA-Seq основаны на проекте UCSC Xena (<http://xena.ucsc.edu>) [13].

Экстракция РНК из биоптатов. Образец ткани извлекали из криопробирки и немедленно помещали в охлажденную до -20°C ступку, гомогенизировали, добавляя 900 мкл реагента QIAzol (Qiagen, Германия). Дальнейшее выделение и очистку тотальной РНК производили с помощью набора RNeasy Plus Universal Kits (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Препараты тотальной РНК обрабатывали DNКазой I для устранения следов геномной ДНК согласно протоколу производителя фермента. В полученный препарат тотальной РНК добавляли РНКазин до конечной концентрации в растворе 1 ед. акт./мкл. Качество полученной РНК проверяли электрофоретическим методом в агарозном геле по соотношению интенсивности полос 28S и 18S рРНК [14].

Оценка уровня экспрессии генов. Для наработки комплементарной ДНК готовили реакцию смесь, содержащую 5 мкМ рандомных праймеров, 1x RT буфер, 0,5 мМ dNTP микс, 0,5 ед. акт./мкл RNase Inhibitor, 5 U/мкл Reverse Transcriptase MMLV. Полученную смесь инкубировали при 44°C в течение 1 ч, далее обратную транскриптазу инактивировали нагреванием при 92°C в течение 10 мин. Полученные препараты использовали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [14].

Методом количественной ПЦР в режиме реального времени определяли величины относительной экспрессии генов, выявленных на этапе биоинформационного анализа. При выборе референсного гена использовали алгоритм, описанный в работе J. Vandesompele [15], по нему рассчитывали величину M-value и Stability (Stability = $\ln(1/M\text{-value})$). Гены с M-value $<0,5$ считали идеальными. В качестве референсных были выбраны 2 гена: *GAPDH* (M-value = 0,071, Stability = 2,102) и *ACTB* (M-value = 0,157, Stability = 1,761). В исследовании использовали синтетические олигонуклеотидные праймеры, представленные в табл. 1.

Таблица 1. Панель праймеров для определения относительной экспрессии генов

Table 1. Primer panel for determination of relative gene expression

Ген Gene	Последовательность праймера 5'→3' Primer sequence 5'→3'	
	Прямой Forward	Обратный Reverse
<i>GAPDH</i>	GTCAAGGCTGAGAACGGGAA	TCGCCCCACTTGATTTTGGGA
<i>ACTB</i>	AACCGCGAGAAGATGACCC	AGCACAGCCTGG TAGCAAC
<i>MMP1</i>	TCTCACAGCTTCCCAGCGA	TGGCGTGTAATTTTCAATCCTGT
<i>MMP11</i>	ACATTTGGTTCTTCCAAGGTGC	CATGGACCGGGAACCTCAC
<i>CA9</i>	AGGGGTCTCTGACTACACCG	AGAGGGTGTGGAGCTGCTTAG
<i>PTHLH</i>	ACATTAGGGCTCCTGCATCTT	TCCGAGGCAAACSTTTGAAC
<i>MMP9</i>	TCTTCCAGTACCGAGAGAAAGC	CAACTCACTCCGGGAACTCA
<i>COL1A1</i>	TGAAGGGACACAGAGGTTTCAG	AGTAGCACCATCATTTCCACGA
<i>LAMC2</i>	ATGGATGCAGTACAGATGGTGATTA	AGTAAGACCAGCCCCTCTTCA
<i>ISG15</i>	ACAGCCATGGGCTGGGA	CCTTCAGCTCTGACACCGAC
<i>MMP3</i>	GACAAAGGATACAACAGGGACCAA	AGCTTCAGTGTGGCTGAGT
<i>SPP1</i>	ACCTGACATCCAGTACCCTGA	ACGGCTGTCCCAATCAGAAG
<i>KRT13</i>	TTCTCAGCAGGAAGCGT	GCGACCAGAGGCATTAGAGG
<i>SPRR3</i>	TTCTCTGCACAGCAGATGATCC	CTGGCTGGGTTGTTTCACCT
<i>KRT4</i>	GAGGGCGAGGAGTACAGAATG	AGAGACACTGCCACCAAACC
<i>ANXA1</i>	CCAGGGCCTTGATGAAGCA	TTGTGGCGCACTTCACGATA
<i>MT-ND6</i>	TTCACCCACAGCACCAATCC	CAGCGATGGCTATTGAGGAGT
<i>CNFN</i>	ATCGCGATCCTGCAGCTATG	CACAGAGGAGCAAAAGTGCC
<i>SLPI</i>	GTTTCCCCTGTGAAAGCTTGA	GTGGTGGAGCCAAGTCTCAG
<i>CRNN</i>	TTGCCGATGTGATTGTGAAACC	TCTTCATCCAGCAGACGCAG
<i>MAL</i>	TCCTGTACATAATTGGAGCCC	ATGTAGGAGAACACCACGGC
<i>TGM3</i>	CCCCTGGCTGAATGTGGATAG	ACGGCGGAAATTCAGACTCC
<i>CD24</i>	CGCTCCCCACCTTGCC	TCACTGGAATAAATCTGCGTGG
<i>IL1RN</i>	TCCGCAGTCACCTAATCACTC	AACATCCCAGATTCTGAAGGC
<i>CLU</i>	TCTTTCCCAAGTCCCGCATC	GTCATCGTCGCCTTCTCGTAT

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени (в 3 технических повторах для каждого образца) проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25 мМ каждого из dNTPs, 2,5 мМ MgCl₂, ПЦР-буфер и 1 ед. ДНК-полимеразы *SynTaq* (с ингибирующими активностью фермента антителами) (ООО «Синтол», Россия), краситель *EVA-Green* и по 400 нМ прямого и обратного праймеров для референсных генов или гена-мишени, по следующей программе: первичная денатурация при 95 °С в течение 3 мин; 40 циклов – 10 с

при 95 °С, 30 с при 58 °С (отжиг праймеров – температура подобрана экспериментальным путем с использованием температурного градиента), 30 с при 72 °С. Специфичность ПЦР контролировали с помощью анализа кривых плавления (melting curve analysis). Относительную экспрессию (RE) рассчитывали по формуле:

$$RE = E^{-\Delta\Delta Ct},$$

где E – эффективность амплификации, равная $10^{-1/k}$, k – коэффициент из уравнения прямой $C(T) = k \cdot \lg P_0 + b$,

полученного путем линейной аппроксимации экспериментальных данных ($E_{cp} = 1.949$).

Нормализацию результатов проводили по 2 референсным генам – *GAPDH* и *B2M* – и уровню экспрессии соответствующих генов-мишеней в образцах нормальной ткани последовательно, по приведенной ниже схеме [16].

1. Нормализация по среднему референсных генов: $\Delta C(t) = C(t)_{target} - C(t)_{reference}$, где $C(t)_{reference}$ – среднее геометрическое $C(t)$ референсных генов, $C(t)_{target}$ – среднее геометрическое $C(t)$ генов-мишеней.
2. Расчет $E^{-\Delta C(t)}$ по каждому гену для условно нормальной и опухолевой тканей каждого пациента.
3. Расчет медианы $E^{-\Delta C(t)}$ по каждому гену для условно нормальной и опухолевой тканей пациентов.
4. Нормализация по условно нормальной ткани и окончательный результат как кратность изменения (fold change, FC) [16]: $FC = E^{-\Delta C(t)}_{\text{медиана опухолевой ткани}} / E^{-\Delta C(t)}_{\text{медиана нормальной ткани}}$ (что тождественно $RE = E^{-\Delta C(t)}$, или $RE = E^{-(\Delta C(t)_{\text{медиана опухолевой ткани}} - \Delta C(t)_{\text{медиана нормальной ткани}})$).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для проведения кластерного анализа (Hierarchical Clustering, Euclidean distance) и построения тепловых карт использовали скрипты на языке R. Нормальность распределения показателей оценивали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Оценку различий проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$, для учета множественного сравнения использовали поправку Бонферрони. Для оценки различий между 3 и более независимыми группами для порогового уровня статистической значимости $p < 0,05$ применяли критерий Краскела–Уоллиса [17].

Также проводили анализ обогащения по функциональной принадлежности (gene set enrichment analysis, GSEA). Для выявления общих сигнальных путей исследуемых генов использовали алгоритм сетевой интеграции нескольких ассоциаций, который предсказывает функцию и положение гена в составе сложной сети из множества других генов, а также рассчитывает оценку для каждой точки построенной сети, отражающую силу связи между соседними точками [18]. Алгоритм использует данные Gene Expression Omnibus (GEO) для расчета сети генов и выполняется в 2 этапа: 1) на основе линейной регрессии вычисляется единая сеть функциональных ассоциаций из нескольких источников данных (вычисляется корреляция Пирсона как мера силы взаимодействия между каждой парой генов; каждой паре генов присваивается вес ассоциации (W-value), который либо равен 0, что указывает на отсутствие взаимодействия, либо имеет положительное значение, которое отражает силу взаимодействия генов); 2) предсказывается функция гена с учетом сложной сети функциональных ассоциаций

с использованием метода распределения меток поля Гаусса (предсказание функции рассматривается как проблема бинарной классификации, т.е. каждой сети функциональных ассоциаций, полученной из источников данных, присваивается положительный вес, отражающий полезность источников данных для прогнозирования функции). На выходе алгоритма получается список категорий GO (Gene Ontology) и значения Q из FDR (false discovery rate, ожидаемая доля ложно отвергнутых нулевых гипотез) – скорректированного гипергеометрического теста на обогащение. Значения Q были скорректированы с помощью метода Бенджамини–Хохберга (один из методов контроля ожидаемой доли ложных отклонений гипотез (FDR)) и представлены до порогового значения $Q = 0,076$ [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе биоинформационного анализа с использованием GEPIA [13] выделено 1488 генов, увеличивающих экспрессию, и 589 генов, уменьшающих экспрессию, при плоскоклеточном раке языка (рис. 1). Из этих 2077 генов были выбраны 10 генетических локусов, наиболее сильно повышающих экспрессию в опухолевой ткани относительно нормальной ткани языка, и 13 генетических локусов, наиболее сильно снижающих ее (табл. 2).

Выявленные в ходе биоинформационного анализа аномальные показатели транскрипционной активности генетических локусов были валидированы в тканях 300 больных плоскоклеточным раком языка методом ПЦР в режиме реального времени.

Из 23 генетических локусов, выявленных в ходе биоинформационного анализа, только 14 изменяли свой транскрипционный профиль в опухолевой ткани относительно нормальной (рис. 2). Так, были обнаружены статистически значимое ($p < 0,0005$) увеличение экспрессии генов *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2* и *MMP3* в 4,8; 2,4; 2,1; 4,0; 2,1; 2,0 и 3,5 раза соответственно и статистически значимое ($p < 0,0005$) снижение экспрессии генов *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU* в 2,2; 1,3; 5,2; 7,5; 2,2; 2,3 и 2,6 раза соответственно в опухолевой ткани относительно нормальной ткани языка (рис. 2).

При анализе результатов ПЦР выявлена значительная гетерогенность данных в ряде исследованных биологических образцов. Был проведен кластерный анализ и построена тепловая карта (рис. 3). Кластерный анализ позволил разделить общую выборку из 300 пациентов на 3 группы, отличающиеся по экспрессии генов: кластер 1 ($n = 90$), кластер 2 ($n = 101$) и кластер 3 ($n = 109$).

Так, у пациентов кластера 1 в опухолевой ткани языка экспрессия генов *MMP1*, *CA9*, *PTHLH* и *ISG15* была выше в 2,2 ($p < 0,0005$); 2,1 ($p < 0,0001$); 8,8 ($p < 0,0001$) и 6,9 ($p < 0,005$) раза соответственно, а экспрессия генов *ANXA1*, *MT-ND6* и *MAL* – ниже в 6,5 ($p < 0,0005$); 5,9 ($p < 0,0001$) и 9,8 ($p < 0,0005$) раза соответственно относительно нормальной ткани (рис. 4).



Рис. 1. Дифференциально экспрессирующиеся гены (относительно нормальной ткани) у больных плоскоклеточным раком языка. Данные получены с использованием Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA). Позиция генетических локусов на хромосомах установлена на основании данных GRCh38.p2 (NCBI)

Fig. 1. Differentially expressed genes (relative to normal tissue) in patients with squamous-cell carcinoma of the tongue. Data obtained using Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA). Position of genetic loci on the chromosomes determined based on GRCh38.p2 data (NCBI)

У больных кластера 2 в опухолевой ткани языка экспрессия генов *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *COL1A1*, *LAMC2*, *MMP3* и *SPP1* оказалась выше в 4,8 ($p < 0,0005$); 2,4 ($p < 0,0001$); 2,4 ($p < 0,0001$); 4,0 ($p < 0,005$);

2,1 ($p < 0,005$); 3,2 ($p < 0,005$); 3,0 ($p < 0,001$), 3,5 ($p < 0,001$) и 2,7 ($p < 0,005$) раза соответственно, а экспрессия генов *KRT13*, *SPRR3*, *KRT4*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU* – ниже в 6,4

Таблица 2. Генетические локусы с наиболее значимыми отклонениями транскрипционной активности в опухолевой ткани языка относительно нормальной ткани

Table 2. Genetic loci with the most significant deviations of transcriptional activity in the tumor tissue of the tongue relative to normal tissue

Ген Gene	Идентификатор гена в базе данных https://www.ensembl.org/ Gene identification number in https://www.ensembl.org/database	Медиана экспрессии (опухоль) Median expression (tumor)	Медиана экспрессии (норма) Median expression (normal tissue)	Log2 (кратность отличий) Log2 (fold change)	P _{adj}
Гиперэкспрессированные гены <i>Hyperexpressed genes</i>					
<i>MMP1</i>	ENSG00000196611.4	183,291	1,394	6,266	1,19e-30
<i>MMP11</i>	ENSG00000099953.9	40,740	0,880	4,473	2,56e-31
<i>CA9</i>	ENSG00000107159.12	24,920	0,255	4,368	1,18e-29
<i>PTHLH</i>	ENSG00000087494.15	137,053	6,891	4,129	7,12e-25
<i>MMP9</i>	ENSG00000100985.7	56,261	2,529	4,020	7,10e-36
<i>COL1A1</i>	ENSG00000108821.13	508,357	30,516	4,015	1,50e-27
<i>LAMC2</i>	ENSG00000058085.14	244,179	15,448	3,898	9,94e-34
<i>ISG15</i>	ENSG00000187608.8	333,975	21,942	3,868	9,55e-31
<i>MMP3</i>	ENSG00000149968.11	28,779	1,064	3,851	2,18e-15
<i>SPP1</i>	ENSG00000118785.13	65,489	3,974	3,741	5,41e-15
Гипоэкспрессированные гены <i>Hypoexpressed genes</i>					
<i>KRT13</i>	ENSG00000171401.14	294,290	25584,811	-6,437	1,79e-12
<i>SPRR3</i>	ENSG00000163209.14	203,487	9956,686	-5,606	9,40e-9
<i>KRT4</i>	ENSG00000170477.12	12,650	7806,446	-9,160	5,63e-23
<i>ANXA1</i>	ENSG00000135046.13	1102,604	5099,181	-2,208	1,75e-9
<i>MT-ND6</i>	ENSG00000198695.2	1436,855	3535,993	-1,299	1,91e-10
<i>CNFN</i>	ENSG00000105427.9	290,964	2108,206	-2,853	6,06e-4
<i>SLPI</i>	ENSG00000124107.5	865,565	1914,697	-1,144	6,22e-7
<i>CRNN</i>	ENSG00000143536.7	2,380	1574,578	-8,865	5,34e-24
<i>MAL</i>	ENSG00000172005.10	4,410	1032,634	-7,578	2,05e-27
<i>TGM3</i>	ENSG00000125780.11	6,370	820,555	-6,801	4,50e-16
<i>CD24</i>	ENSG00000272398.5	281,208	801,300	-1,507	5,47e-9
<i>IL1RN</i>	ENSG00000136689.18	141,680	697,355	-2,291	3,29e-3
<i>CLU</i>	ENSG00000120885.19	113,118	688,541	-2,595	2,00e-13

($p < 0,0005$); 5,6 ($p < 0,0001$); 9,2 ($p < 0,0005$); 2,2 ($p < 0,05$); 1,3 ($p < 0,05$); 2,9 ($p < 0,005$); 8,9 ($p < 0,0005$); 7,6 ($p < 0,0005$); 6,8 ($p < 0,0005$); 2,3 ($p < 0,05$) и 2,6 ($p < 0,001$) раза соответственно по сравнению с нормальной тканью (см. рис. 4).

У пациентов кластера 3 в опухолевой ткани языка обнаружены повышение экспрессии генов *MMP1*, *MMP11*, *MMP9*, *MMP3* и *SLPI* в 14,4 ($p < 0,0005$); 10,4 ($p < 0,0001$); 15,0 ($p < 0,0001$); 9,5 ($p < 0,005$) и 3,9 ($p < 0,005$) раза соответственно и снижение экспрессии

генов *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU* в 5,2 ($p < 0,05$); 2,3 ($p < 0,01$); 2,2 ($p < 0,05$); 2,5 ($p < 0,05$) и 3,5 ($p < 0,001$) раза соответственно относительно нормальной ткани (см. рис. 4).

Между кластерами выявлено наличие дифференциальной экспрессии рассматриваемых генетических локусов. Так, в кластерах 1 и 2 статистически значимо ($p < 0,001$) различалась экспрессия *MMP1*, *MMP11*, *PTHLH*, *MMP9* и *COL1A1*: в 2,2; 1,7; 2,2; 1,9 и 2,7 раза

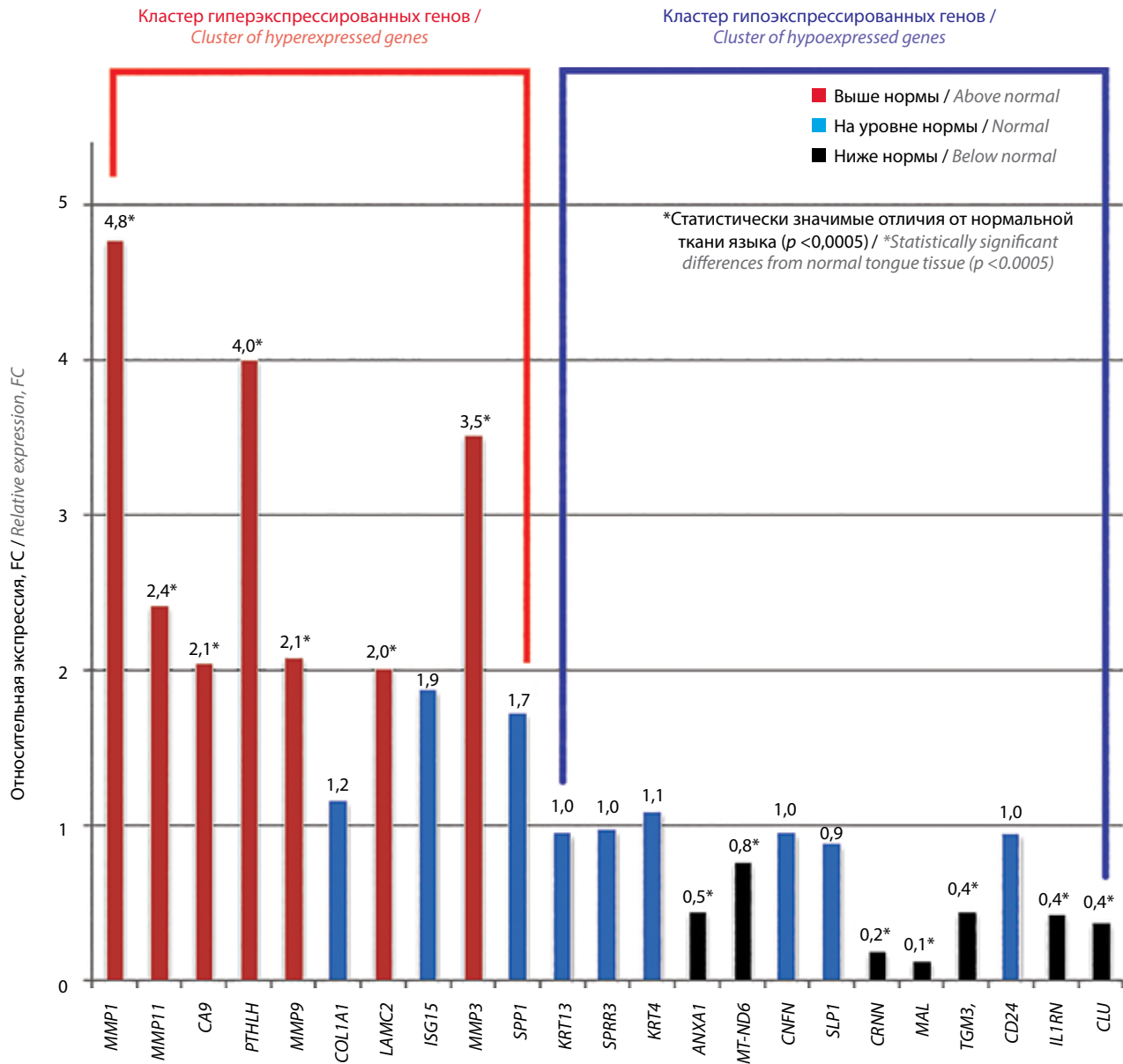


Рис. 2. Уровни относительной экспрессии 23 генов в опухолевой ткани 300 больных плоскоклеточным раком языка
Fig. 2. Relative expression levels of 23 genes in tumor tissue of 300 patients with squamous cell carcinoma of the tongue

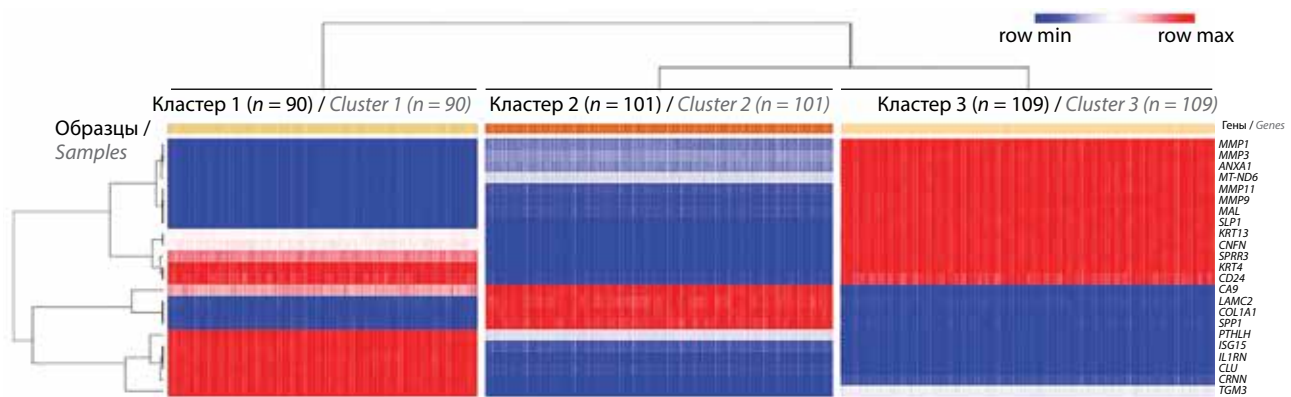


Рис. 3. Кластерный анализ и тепловая карта распределения уровня транскрипционной активности 23 генов в опухолевой ткани 300 больных плоскоклеточным раком языка
Fig. 3. Cluster analysis and heat map of transcriptional activity distribution of 23 genes in tumor tissue of 300 patients with squamous cell carcinoma of the tongue

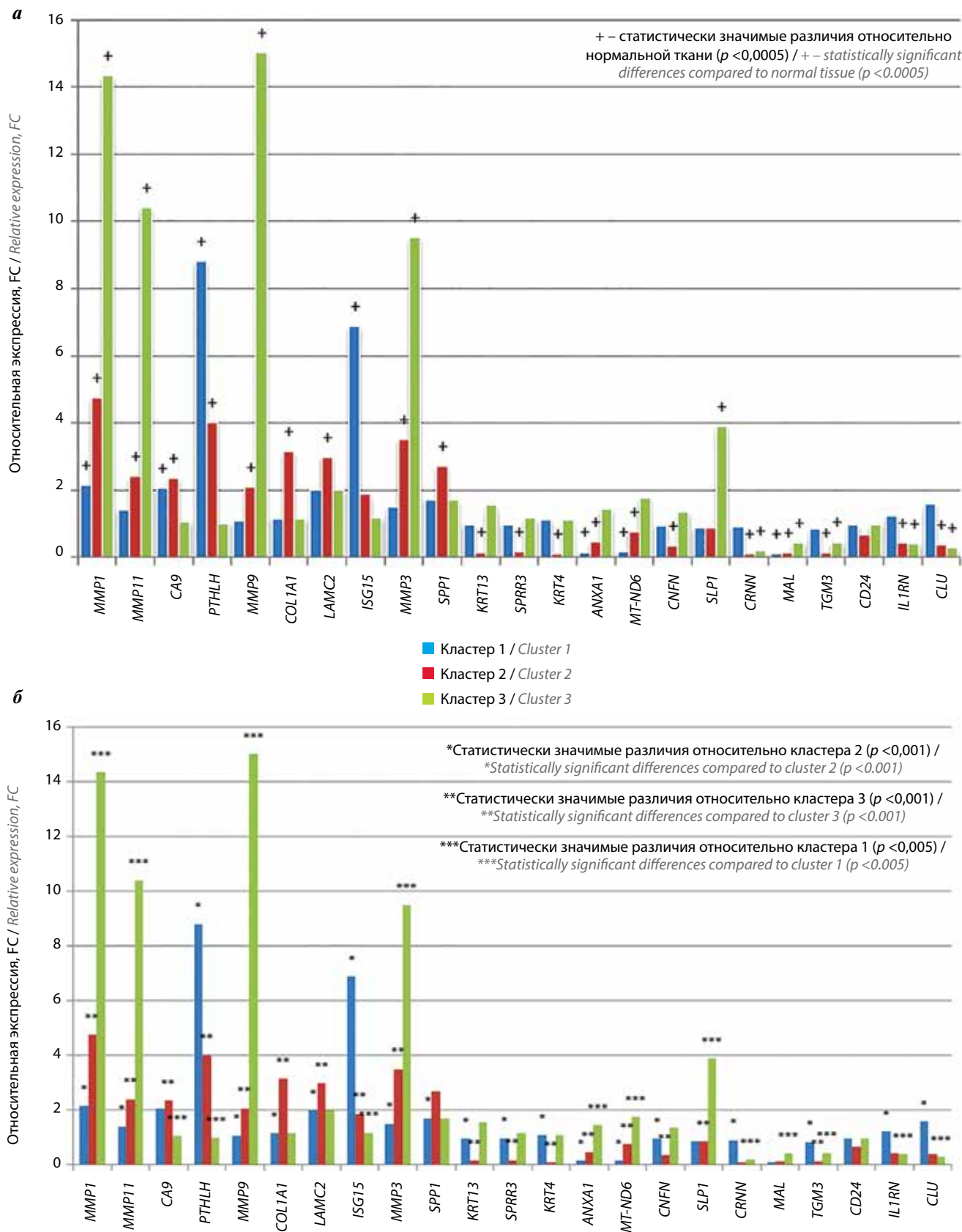


Рис. 4. Особенности экспрессии 23 генетических локусов в операционном материале в разных группах (кластерах) больных плоскоклеточным раком языка: а – статистически значимые различия относительно нормальной ткани; б – статистически значимые различия между кластерами
Fig. 4. Characteristics of expression of 23 genetic loci in operative material in different groups (clusters) of patients with squamous cell carcinoma of the tongue: а – statistically significant differences compared to normal tissue; б – statistically significant differences between the clusters

соответственно (рис. 4, 5), а также экспрессия *LAMC2*, *ISG15*, *MMP3*, *SPPI*, *KRT13* и *SPRR3*: в 1,5; 3,7; 2,3; 1,6; 6,1 и 5,5 раза соответственно (рис. 4, 6), и генов *KRT4*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *CRNN*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*: в 10,2; 3,0; 4,5; 2,7; 8,1; 5,8; 2,8 и 4,1 раза соответственно (рис. 4, 7, 8).

Между кластерами 2 и 3 выявлено статистически значимое различие ($p < 0,001$) экспрессии генов *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *COL1A1*, *LAMC2*, *ISG15*, *MMP3*, *KRT13*, *SPRR3*, *KRT4*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *SLPI* и *TGM3*: в 3,0; 4,3; 2,2; 4,0; 7,2; 2,7; 1,5; 1,6; 2,7; 10,0; 6,6; 10,2; 3,2; 2,3; 3,9; 4,4 и 3,0 раза соответственно (рис. 4, 5–8).

Между кластерами 1 и 3 статистически значимо ($p < 0,001$) различалась экспрессия генов *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *ISG15*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *SLPI*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*: в 6,7; 7,4; 1,9; 8,7; 13,9; 5,8; 6,3; 9,5; 10,4; 4,4; 4,7; 4,2; 1,9; 3,0 и 5,6 раза соответственно (см. рис. 4, 5–8).

Также проводили анализ обогащения по функциональной принадлежности (GSEA). Целью GSEA является получение списка наиболее важных сигнальных путей. Применение алгоритма сетевой интеграции с несколькими ассоциациями позволило установить взаимодействия между генами *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *COL1A1*, *LAMC2*, *ISG15*, *MMP3*, *SPPI*,

KRT13, *SPRR3*, *KRT4*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *SLPI*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *CD24*, *IL1RN* и *CLU* (рис. 9) и вовлеченность этих генов в те или иные сигнальные пути (табл. 3, 4). Данный алгоритм предсказывает функцию гена в составе сложной сети из множества генов, используя один из методов машинного обучения, основанный на распределении меток гауссовых полей, и присваивает оценку каждому узлу-точке построенной сети, отражающую вычисленную силу связи [19].

Согласно данным, полученным с использованием алгоритма сетевой интеграции с несколькими ассоциациями, исследуемые гены связаны друг с другом на уровне со-экспрессии в 74 % случаев, на уровне со-локализации – в 14 % случаев, остальные случаи приходятся на физические взаимодействия и наличие общих белковых доменов.

Исследуемые гены с разным уровнем значимости вовлечены в различные сигнальные пути. Так, 18 генов включены в процессы развития кожи ($Q_{FDR} = 6.0 \cdot 10^{-18}$), 17 генов – в процессы дифференцировки клеток эпидермиса ($Q_{FDR} = 9.0 \cdot 10^{-17}$), 12 – в процессы ороговения ($Q_{FDR} = 5.0 \cdot 10^{-15}$), 13 – в процессы дифференцировки кератиноцитов ($Q_{FDR} = 9.0 \cdot 10^{-14}$), 6 – в метаболизм коллагена ($Q_{FDR} = 0,00003$), 3 – связаны с чувствительностью к ультрафиолетовому излучению в спектральном диапазоне А (УФ-А) ($Q_{FDR} = 0,004$), а 6 – участвуют

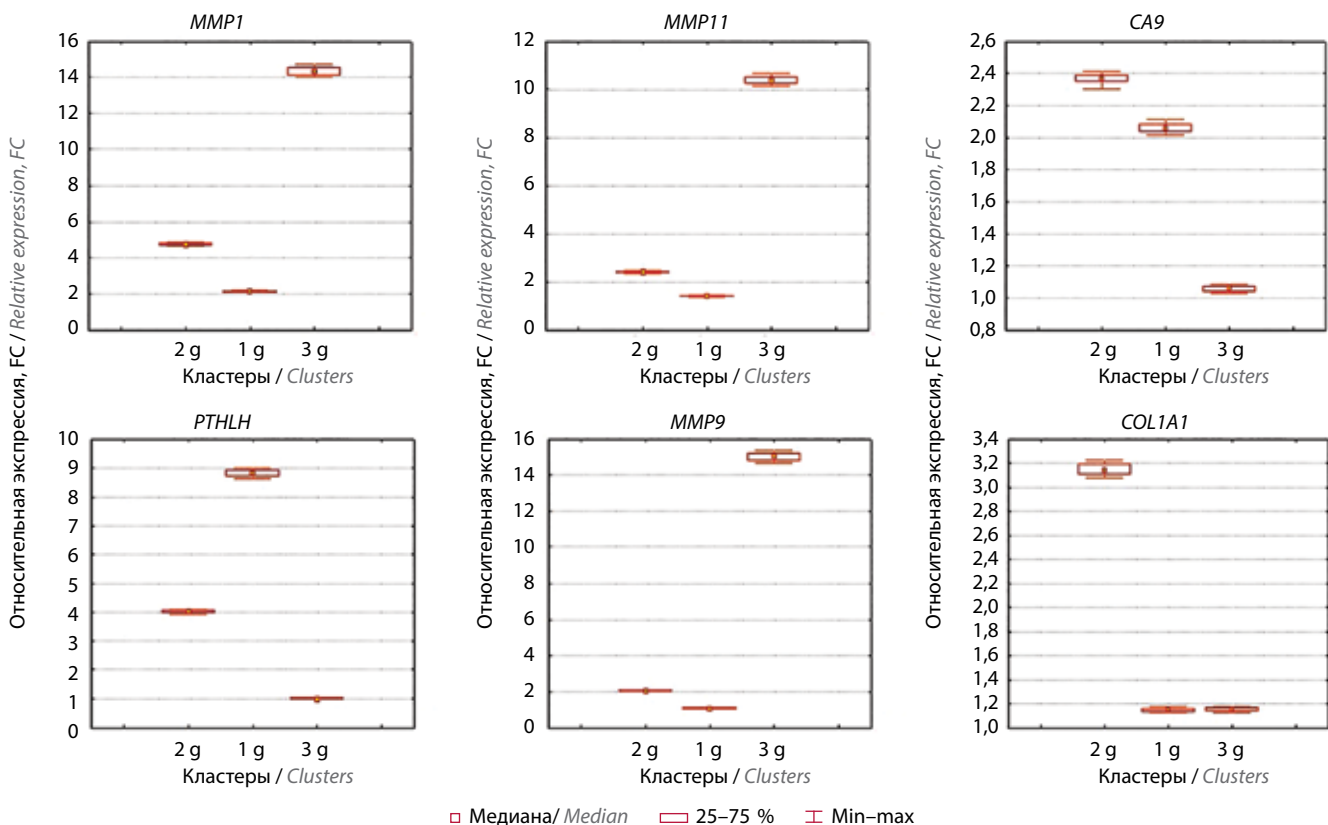


Рис. 5. Дифференциальная экспрессия генетических локусов *MMP1*, *MMP11*, *PTHLH*, *CA9*, *MMP9* и *COL1A1* в разных группах (кластерах) больных плоскоклеточным раком языка

Fig. 5. Differential expression of *MMP1*, *MMP11*, *PTHLH*, *CA9*, *MMP9* and *COL1A1* genetic loci in different groups (clusters) of patients with squamous cell carcinoma of the tongue

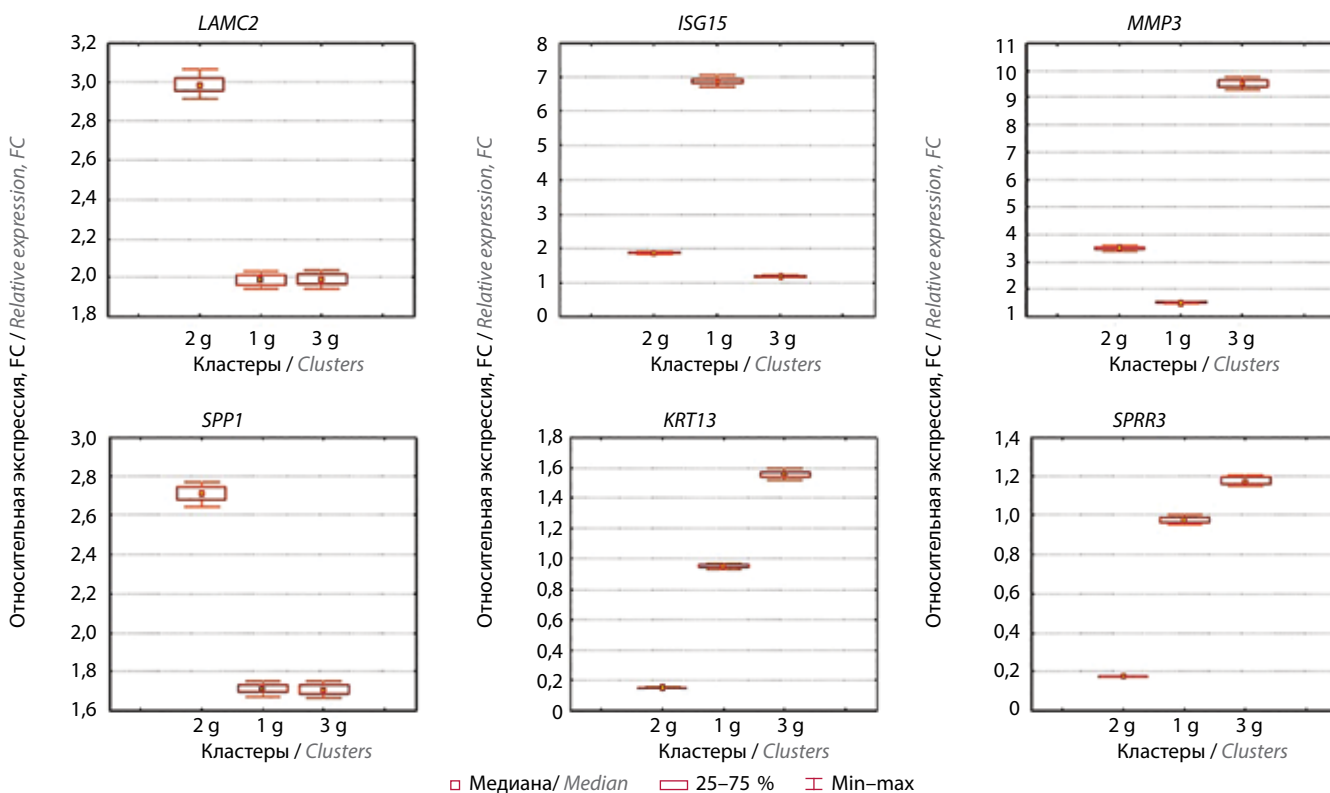


Рис. 6. Дифференциальная экспрессия генетических локусов LAMC2, ISG15, MMP3, SPP1, KRT13 и SPRR3 в разных группах (кластерах) больных плоскоклеточным раком языка

Fig. 6. Differential expression of LAMC2, ISG15, MMP3, SPP1, KRT13 and SPRR3 genetic loci in different groups (clusters) of patients with squamous cell carcinoma of the tongue

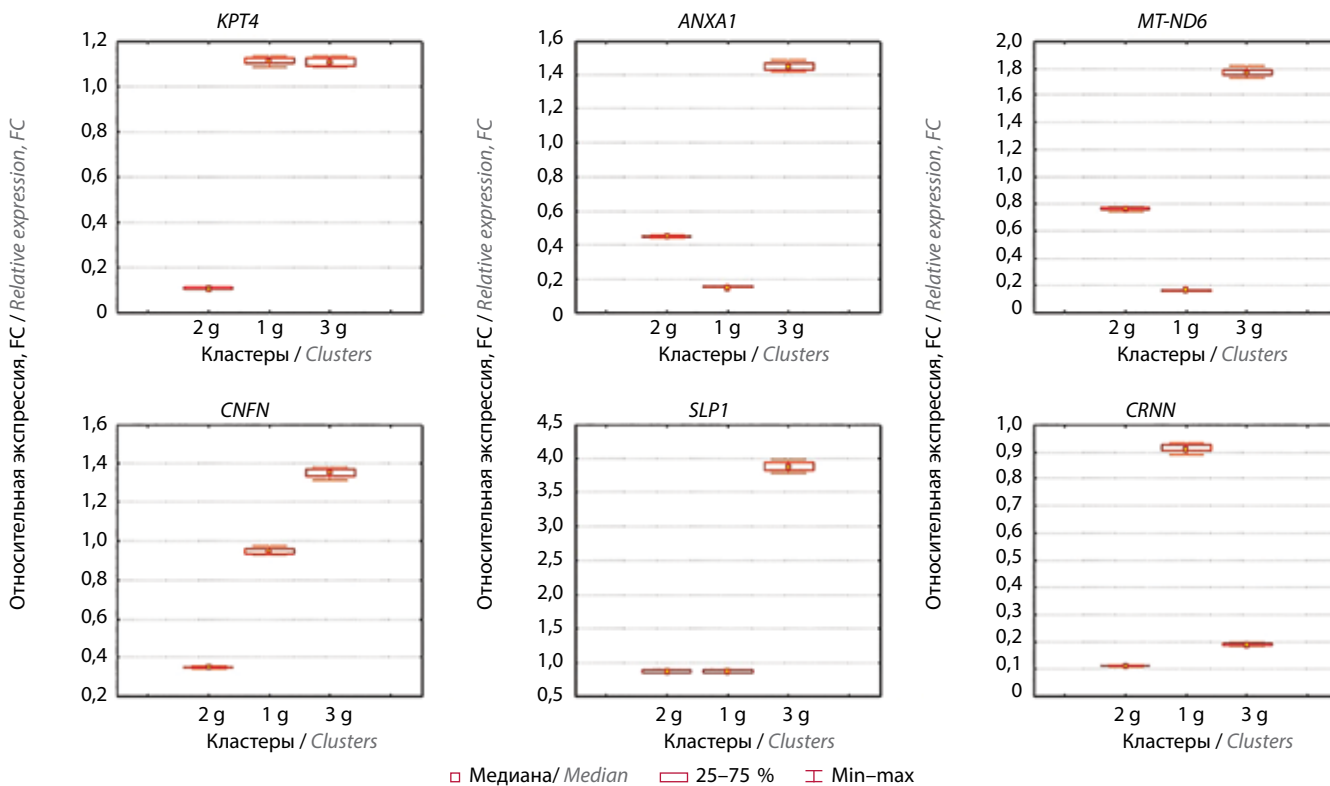


Рис. 7. Дифференциальная экспрессия генетических локусов KPT4, ANXA1, MT-ND6, CNFN, SLP1 и CRNN в разных группах (кластерах) больных плоскоклеточным раком языка

Fig. 7. Differential expression of KPT4, ANXA1, MT-ND6, CNFN, SLP1 and CRNN genetic loci in different groups (clusters) of patients with squamous cell carcinoma of the tongue

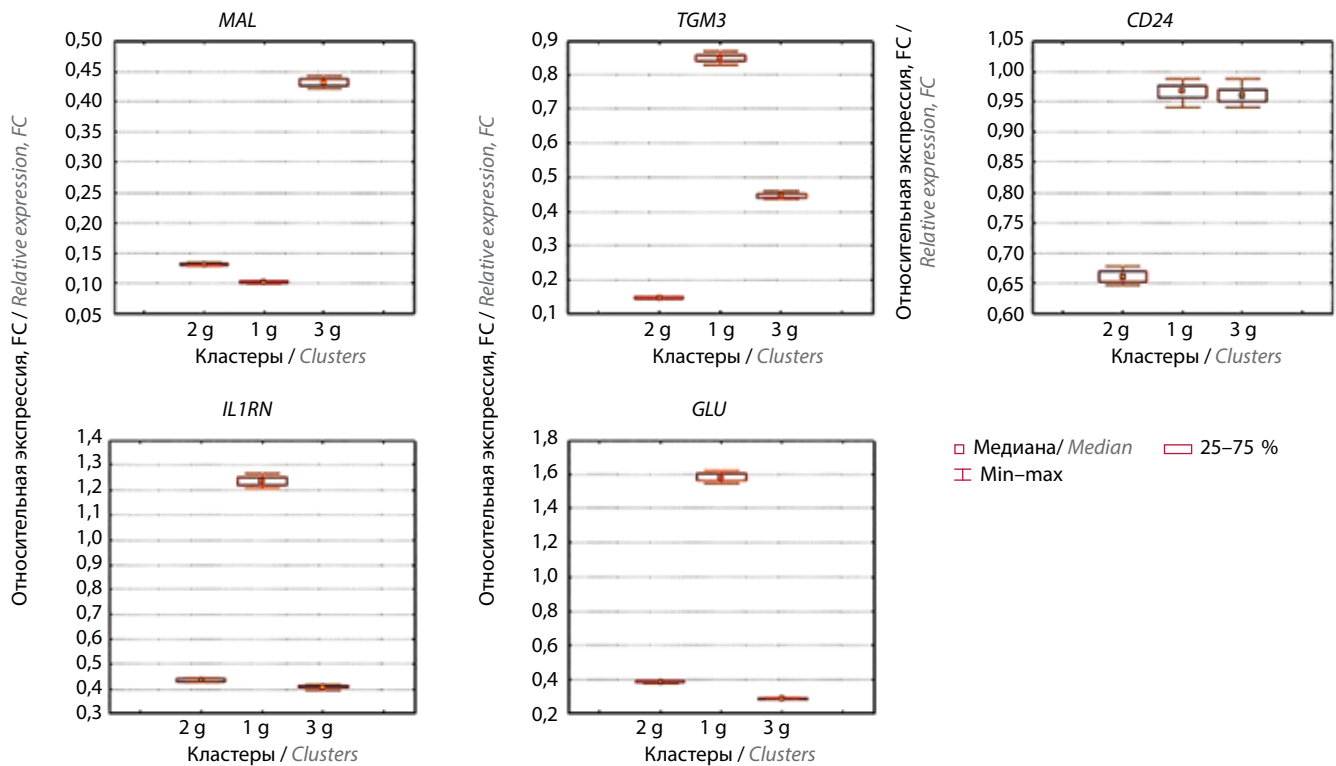


Рис. 8. Дифференциальная экспрессия генетических локусов *MAL*, *TGM3*, *CD24*, *IL1RN* и *GLU* в разных группах (кластерах) больных плоскоклеточным раком языка

Fig. 8. Differential expression of *MAL*, *TGM3*, *CD24*, *IL1RN* and *GLU* genetic loci in different groups (clusters) of patients with squamous cell carcinoma of the tongue

в формировании внеклеточного матрикса ($Q_{FDR} = 0,004$). Подробная информация о взаимодействии генов и их вовлеченности в те или иные сигнальные пути представлена в табл. 3 и 4.

ОБСУЖДЕНИЕ

Выявленная при валидации данных биоинформационного анализа дифференциальная экспрессия 14 генов в опухолевой и нормальной тканях языка (*MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*) приводит к изменению ключевых сигнальных каскадов, ответственных за нормальное развитие кожи, дифференцировку клеток эпидермиса, метаболизм коллагена, чувствительность к ультрафиолетовому излучению и активность металлопептидаз.

Развитие рака языка представляет собой сложный многоэтапный процесс, в ходе которого генетические события в путях передачи сигналов, управляющих нормальной клеточной физиологией, изменяются количественно или качественно.

В нормальных условиях клеточная биология эпителия языка жестко контролируется различными сигнальными путями, регулируемыми деление, дифференцировку и старение клеток. Сигнальные пути кератиноцитов могут быть разнообразными и одновременно содержать одни и те же ключевые функциональные элементы [20].

Измененные метаболические пути являются движущей силой для раковых клеток, чтобы получить

полезную энергию или уклониться от иммунного надзора. Это позволяет предположить, что такие изменения можно использовать для разработки биомаркеров и терапевтических мишеней [21]. Действительно, нарушение регуляции отдельных или множественных метаболических путей изучалось в качестве диагностических или прогностических биомаркеров при нескольких видах рака человека. Сообщалось, что несколько метаболических сигнатур на уровне транскрипции предсказывают выживаемость пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой и раком яичников [22]. Тем не менее большинство исследований обычно фокусировались на прогностических признаках, основанных на генах, участвующих в одном метаболическом пути, в то время как другие метаболические аномалии при раке могли игнорироваться. Таким образом, интегративная сигнатура, основанная на множественных наборах генов, связанных с метаболизмом, может лучше отражать полные метаболические нарушения регуляции при раке и быть очень результативной в прогнозировании. Всесторонний анализ метаболических путей при плоскоклеточном раке головы и шеи уже позволил создать ряд прогностических моделей и установить прогностические предикторы с высокой эффективностью [23]. Однако поскольку плоскоклеточный рак головы и шеи представляет собой гетерогенную группу эпителиальных злокачественных новообразований с различными этиологическими факторами, онкогенными процессами и методами

Таблица 3. Информация о 42 генах, взаимодействие между которыми выявлено с помощью алгоритма сетевой интеграции с несколькими ассоциациями

Table 3. Information on interactions between 42 genes which were identified using network integration algorithm with several associations

Ген Gene	Значение оценки гена в сети Value of gene significance in the network	Функция/сигнальный путь Function/signaling pathway
<i>MT-ND6</i>	0,840	—
<i>KRT4</i>	0,640	Эпидермальная дифференцировка клеток, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinocyte differentiation, skin development
<i>MMP11</i>	0,639	Метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, металлопептидазная активность Collagen metabolism, extracellular matrix organization, metallopeptidase activity
<i>CD24</i>	0,627	—
<i>CNFN</i>	0,615	—
<i>IL1RN</i>	0,608	—
<i>CLU</i>	0,599	—
<i>SPRR3</i>	0,597	Эпидермальная дифференцировка клеток, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development
<i>PTHLH</i>	0,589	—
<i>MMP1</i>	0,587	Ответ клеток на ультрафиолетовое излучение (УФ), метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, активность металлопептидаз и серингидролазы Cell response to ultraviolet (UV) radiation, collagen metabolism, extracellular matrix organization, metallopeptidase and serin hydrolase activity
<i>CRNN</i>	0,580	—
<i>SPP1</i>	0,579	—
<i>MMP3</i>	0,573	Ответ клеток на УФ, метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, активность металлопептидаз и серингидролазы Cell response to UV radiation, collagen metabolism, extracellular matrix organization, metallopeptidase and serin hydrolase activity
<i>MAL</i>	0,565	Регуляция активности пептидазы Peptidase activity regulation
<i>LAMC2</i>	0,556	—
<i>COL1A1</i>	0,555	Метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, развитие кожи Collagen metabolism, extracellular matrix organization, skin development
<i>TGM3</i>	0,540	Эпидермальная дифференцировка клеток, развитие кожи Epidermal cell differentiation, skin development
<i>MMP9</i>	0,537	Ответ клеток на УФ, метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, активность металлопептидаз, подавление гидролазной активности, регуляция протеолиза Cell response to UV radiation, collagen metabolism, extracellular matrix organization, metallopeptidase activity, suppression of hydrolase activity, proteolysis regulation
<i>ANXA1</i>	0,535	Активность ингибиторов ферментов, дифференцировка клеток эпидермиса, негативная регуляция активности гидролаз, развитие кожи Activity of enzyme inhibitors, differentiation of epidermal cells, negative regulation of hydrolase activity, skin development

Продолжение табл. 3

Continuation of table 3

Ген Gene	Значение оценки гена в сети Value of gene significance in the network	Функция/сигнальный путь Function/signaling pathway
<i>ISG15</i>	0,534	—
<i>CA9</i>	0,529	—
<i>KRT13</i>	0,527	Дифференцировка клеток эпидермиса, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development
<i>SLPI</i>	0,519	Активность ингибитора/регулятора эндопептидазы Activity of endopeptidase inhibitor/regulator
<i>TGM1</i>	0,020	Дифференцировка клеток эпидермиса, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development
<i>RHCG</i>	0,017	—
<i>SERPINB13</i>	0,017	Активность ингибитора/регулятора эндопептидазы, дифференцировка клеток эпидермиса, дифференцировка кератиноцитов, подавление гидролазной активности, регуляция протеолиза, развитие кожи Activity of endopeptidase inhibitor/regulator, differentiation of epidermal cells, keratinocyte differentiation, suppression of hydrolase activity, proteolysis regulation, skin development
<i>SPINK5</i>	0,017	Активность ингибитора/регулятора эндопептидазы, дифференцировка клеток эпидермиса, дифференцировка кератиноцитов, подавление гидролазной активности, регуляция протеолиза, развитие кожи Activity of endopeptidase inhibitor/regulator, differentiation of epidermal cells, keratinocyte differentiation, suppression of hydrolase activity, proteolysis regulation, skin development
<i>CRCT1</i>	0,016	—
<i>LY6D</i>	0,016	—
<i>KRT6A</i>	0,016	Эпидермальная дифференцировка клеток, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development
<i>DSG3</i>	0,015	Эпидермальная дифференцировка клеток, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development
<i>SPRR1B</i>	0,015	Эпидермальная дифференцировка клеток, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Epidermal cell differentiation, keratinization, keratinocyte differentiation, skin development
<i>MMP10</i>	0,015	Метаболизм коллагена, организация внеклеточного матрикса, активность металлопептидаз Collagen metabolism, extracellular matrix organization, metallopeptidase activity
<i>SCEL</i>	0,014	Дифференцировка клеток эпидермиса, развитие кожи Differentiation of epidermal cells, skin development
<i>KRT6B</i>	0,014	Дифференцировка клеток эпидермиса, дифференцировка кератиноцитов, развитие кожи Differentiation of epidermal cells, keratinocyte differentiation, skin development

Окончание табл. 3

The end of table 3

Ген Gene	Значение оценки гена в сети Value of gene significance in the network	Функция/сигнальный путь Function/signaling pathway
<i>CSTA</i>	0,014	Активность ингибитора/регулятора эндопептидазы, дифференцировка клеток эпидермиса, дифференцировка кератиноцитов, подавление гидролазной активности, регуляция протеолиза, развитие кожи Activity of endopeptidase inhibitor/regulator, differentiation of epidermal cells, keratinocyte differentiation, suppression of hydrolase activity, proteolysis regulation, skin development
<i>IVL</i>	0,014	Дифференцировка клеток эпидермиса, дифференцировка кератиноцитов, ответ на УФ, развитие кожи Differentiation of epidermal cells, keratinocyte differentiation, UV response, skin development
<i>LYPD3</i>	0,014	—
<i>TMPRSS11E</i>	0,014	Активность серингидролазы Serin hydrolase activity
<i>CSTB</i>	0,014	Активность ингибитора/регулятора эндопептидазы, подавление гидролазной активности, регуляция протеолиза Activity of endopeptidase inhibitor/regulator, suppression of hydrolase activity, proteolysis regulation
<i>S100A7</i>	0,014	Дифференцировка клеток эпидермиса, развитие кожи Differentiation of epidermal cells, skin development
<i>SLURP1</i>	0,014	—
<i>KLK13</i>	0,013	Дифференцировка клеток эпидермиса, ороговение, дифференцировка кератиноцитов, активность серингидролазы, развитие кожи Differentiation of epidermal cells, keratinization, keratinocyte differentiation, sein hydrolase activity, skin development

лечения, то дальнейшие исследования в этом направлении являются актуальными.

Стремительное развитие технологии полногеномного секвенирования и баз данных TCGA и GEO позволило создать богатые ресурсы для разработки биомаркеров для улучшения ранней диагностики, стратификации пациентов, персонализированного лечения и прогнозирования [24]. Так, в работе X. Wu и соавт. [25] была показана большая роль 5 метаболических путей в развитии плоскоклеточного рака полости рта. Вызванная онкогенами активация роста клеток может быть связана с повышенным поглощением и биосинтезом аминокислот. Фолаты способствуют одноуглеродному метаболизму, необходимому для биосинтеза пуринов и тимидилатов, а также усиливают репликацию ДНК в опухолевых клетках. Авторы выделили 5 репрезентативных генов в этих сигнальных путях: *DGKG* (диацилглицеролкиназа гамма), *CA9* (карбоангидраза 9), *EXTL2* (экзостозин-подобная гликозилтрансфераза 2), *PGAM1* (фосфоглицератмутаза 1), *TYMS* (тимидилатсинтаза). Показана их дифференциальная экспрессия в опухолевых и нормальных тканях, а также связь с выживаемостью пациентов.

В работе С. L. Estilo и соавт. [26] проанализированы профили экспрессии генов у 20 пациентов с плоскоклеточным раком полости рта. Среди 12 625 генов (ДНК-микрочипы Affymetrix) 77 имели статистически значимую разницу ($p < 0,05$) между опухолями и их соответствующими нормальными тканями: 60 генов были гиперэкспрессированы, 17 – гипоекспрессированы. Эти гены связаны с регуляцией пролиферации клеток, апоптоза, ангиогенеза, инвазии и метастазирования. Также показано участие этих генов в развитии рака языка. Среди сверхэкспрессированных генов можно выделить *MMP1* (самый высокий уровень повышения экспрессии), *MMP7* и *MMP12*. Матриксные металлопротеиназы (ММП) – семейство из 23 цинкзависимых внеклеточных эндопептидаз человека, участвующих в деградации внеклеточного матрикса и базальной мембраны во время инвазии опухолевых клеток, – вовлечены в развитие ряда опухолей человека, включая плоскоклеточный рак головы и шеи. Неудивительно, что повышенная экспрессия *MMP1*, *MMP7* и *MMP12* связана со злокачественным прогрессированием, а также с плохим исходом при плоскоклеточном раке языка [27, 28]. В нашем исследовании

Таблица 4. Ключевые сигнальные пути и вовлеченность в них исследованных генов и других генов в геноме человека (использован алгоритм сетевой интеграции с несколькими ассоциациями)

Table 4. Key signaling pathways and involvement of the studied and other genes of the human genome in them (network integration algorithm with several associations)

Сигнальный путь Signaling pathway	Q_{FDR}	Гены в сети Genes in the network	Гены в геноме Genes in the genome
Развитие кожи Skin development	0,000000000000000006	18	292
Дифференцировка клеток эпидермиса Epidermis cell differentiation	0,000000000000000009	17	283
Ороговение Keratinization	0,0000000000000005	12	111
Дифференцировка кератиноцитов Keratinocyte differentiation	0,000000000000009	13	234
Метаболизм коллагена Collagen metabolism	0,00003	6	67
Чувствительность к ультрафиолетовому излучению Sensitivity to ultraviolet radiation	0,004	3	11
Формирование внеклеточного матрикса Extracellular matrix formation	0,004	6	164
Регуляция активности пептидаз Peptidase activity regulation	0,004	6	170
Активность ингибитора эндопептидазы Endopeptidase inhibitor activity	0,011	5	115
Активность ингибитора пептидазы Peptidase inhibitor activity	0,019	5	135
Активность металлопептидаз Metallopeptidase activity	0,019	5	131
Активность серингидролазы Serin hydrolase activity	0,019	5	136
Активность регулятора эндопептидазы Endopeptidase regulator activity	0,020	5	141
Подавление гидролазной активности Suppression of hydrolase activity	0,037	6	272
Ингибирование активности ферментов Enzyme activity inhibition	0,041	6	281
Чувствительность к ультрафиолетовому излучению Sensitivity to ultraviolet radiation	0,074	7	96
Подавление протеолиза Proteolysis suppression	0,076	5	196

также была обнаружена гиперэкспрессия генов, кодирующих белки из семейства металлопротеиназ (*MMPI*, *MMP3*, *MMP9*, *MMP11*).

В работе С.Л. Estilo и соавт. [26] было показано, что гены, участвующие в развитии и дифференцировке эпителия, такие как цитokerатины *KRT16* и *KRT17*, сверхэкспрессированы. Кроме того, гены, которые играют большую роль в ангиогенезе, такие как *HIF-1 α* , кодирующий индуцируемый гипоксией фактор, и *ECGF1*, кодирующий фактор роста эндотелиальных клеток

тромбоцитов, также были гиперэкспрессированы. При этом было обнаружено, что несколько транскриптов генов значительно снижены или отсутствуют в опухоли по сравнению с соответствующими нормальными тканями (*CO-029*, *ZAK1-4*, *hSBP*).

В работе Н. Zhang и соавт. [29] был проведен биоинформационный анализ базы данных GEO и в 31 образце плоскоклеточного рака языка и 26 соответствующих образцах нормальной слизистой оболочки выявлены 1752 дифференциально экспрессирующихся гена,

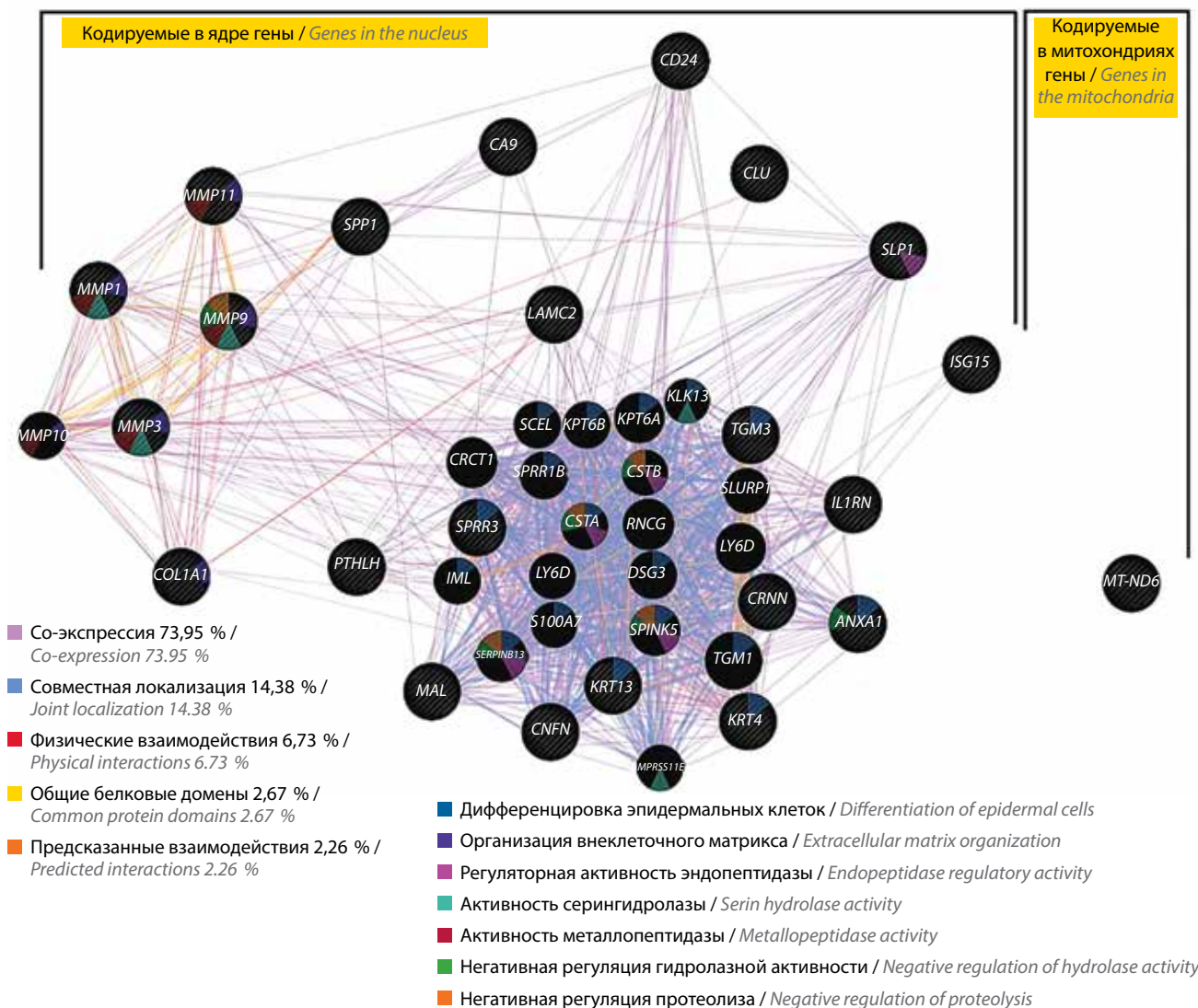


Рис. 9. Взаимодействия между генами и общие сигнальные каскады, выявленные с использованием алгоритма сетевой интеграции с несколькими ассоциациями

Fig. 9. Interactions between the genes and common signaling cascades identified using network integration algorithm with several associations

из которых 1050 гиперэкспрессированных и 702 гипоекспрессированных. Эти гены в основном были задействованы в регуляции клеточной пролиферации, адгезии и апоптоза. Также авторы идентифицировали ключевые гены-концентраторы *RAC1*, *APP*, *EGFR*, *KNG1*, *AGT* и *HRAS*.

Результаты выполненного нами биоинформационного анализа с использованием GEPIA несколько отличаются от данных Н. Zhang и соавт. [29]. Мы выявили 2077 дифференциально экспрессирующихся генов, из которых 1488 генов увеличивали экспрессию и 589 — снижали ее при плоскоклеточном раке языка относительно нормальной ткани.

К тому же в нашем исследовании выявлены 3 молекулярных кластера в образцах рака языка. Проведенный гистологический анализ позволил сопоставить эти кластеры и гистологические подтипы плоскоклеточного рака языка. Так, кластер 1 соответствовал ба-

залоидному подтипу рака языка и характеризовался повышенной экспрессией генов *MMP1*, *CA9*, *PTHLH* и *ISG15* и сниженной экспрессией генов *ANXA1*, *MT-ND6* и *MAL* относительно нормальной ткани.

Ген *MMP1* (*CLGN*, *CLG*, matrix metalloproteinase 1) кодирует интерстициальную коллагеназу, также известную как коллагеназа фибробластов, или матриксная металлопротеиназа 1. Этот фермент при нормальных физиологических процессах (эмбриональное развитие, размножение и ремоделирование тканей) участвует в разрушении внеклеточного матрикса, а также играет большую роль в процессах развития артрита и метастазирования [30].

Ген *CA9* кодирует фермент карбоангидразу IX, которая катализируют обратимую гидратацию углекислого газа, участвуя во множестве биологических процессов, включая дыхание, кальцификацию, кислотно-щелочное равновесие, резорбцию костей и образование спинномозговой

Таблица 5. Схожесть паттернов дифференциально экспрессирующихся генетических локусов в различных подтипах рака языка

Table 5. Similarity between the patterns of differentially expressed genetic loci in different subtypes of tongue cancer

Ген Gene	Количество групп Number of groups	Группа, в которой обнаружена дифференциальная экспрессия Group in which differential expression is found
<i>MAL</i>	3	Обычный, акантолитический, базалоидный подтипы Common, acantholytic, basaloid subtypes
<i>MMP1</i>	3	Обычный, акантолитический, базалоидный подтипы Common, acantholytic, basaloid subtypes
<i>ANXA1</i>	2	Акантолитический, базалоидный подтипы Acantholytic, basaloid subtypes
<i>CA9</i>	2	Акантолитический, базалоидный подтипы Acantholytic, basaloid subtypes
<i>CLU</i>	2	Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes
<i>CRNN</i>	2	Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes
<i>IL1RN</i>	2	Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes
<i>MMP11</i>	2	Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes
<i>MMP3</i>	2	Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes
<i>MMP9</i>	2	Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes
<i>MT-ND6</i>	2	Акантолитический, базалоидный подтипы Acantholytic, basaloid subtypes
<i>PTHLH</i>	2	Акантолитический, базалоидный подтипы Acantholytic, basaloid subtypes
<i>TGM3</i>	2	Обычный, акантолитический подтипы Common, acantholytic subtypes

жидкости, слюны и желудочного сока. *CA9* сверхэкспрессируется при многих типах рака, включая светлоклеточную почечно-клеточную карциному, карциному шейки матки, молочной железы и легких, где она способствует росту опухоли, усиливая опухолевый ацидоз [31, 32].

Экспрессия белка карбоангидразы IX (CA IX) в первую очередь регулируется на уровне транскрипции [33]. Промоторная область гена *CA9* содержит HRE (элемент, реагирующий на гипоксию), где может связываться HIF-1, что позволяет при гипоксических условиях увеличивать количество белка CA IX. Экспрессия этого белка также может посттрансляционно регулироваться металлопротеиназами, которые вызывают потерю эктодомена фермента [34]. Кроме того, исследования, изучающие связь между уровнями карбоангидразы IX и различными клинико-патологическими исходами, предполагают, что экспрессия белка CA IX также может быть ценным прогностическим показателем общей выживаемости [35]. Карбоан-

гидраза IX играет важную роль в подкислении внеклеточного пространства в опухолевой ткани, поскольку обладает очень высокой каталитической активностью с самой высокой скоростью переноса протонов среди известных карбоангидраз [36]. Фермент превращает углекислый газ вне опухоли в бикарбонат и протоны, способствуя внеклеточному ацидозу, стимулируя рост опухоли и регулируя pH цитозоля [37]. Из-за низкой экспрессии в нормальных тканях и сверхэкспрессии во многих опухолевых тканях белок CA IX стал желаемой мишенью для лекарственных средств. Для его ингибирования используется антитело гирентуксимаб, а также ряд небольших молекул (неорганические анионы, сульфаниламиды, фенолы и кумарины) [38].

Ген *PTHLH* кодирует белок, родственные паратиреоидному гормону и секретируемый мезенхимальными стволовыми клетками. Этот белок также секретируется раковыми клетками (рак молочной железы, плоскоклеточный рак легких). *PTHLH* является причиной

большинства случаев гуморальной гиперкальциемии при злокачественных новообразованиях [39].

Ген *ISG15* (интерферон-стимулируемый ген 15) кодирует секретлируемый белок размером 17 кДа. *ISG15* индуцируется интерфероном 1-го типа (IFN-I) и выполняет множество функций, действуя как внеклеточный цитокин и модификатор внутриклеточного белка. Функции *ISG15* разнообразны и различны у разных видов, но обязательно включают активацию продукции γ -интерферона (интерферона 2-го типа, IFN-II) в лимфоцитах, убиквитин-подобную конъюгацию с вновь синтезированными белками и негативную регуляцию ответа IFN-I. Также показано, что *ISG15* является критическим фактором микроокружения для стволовых клеток рака поджелудочной железы [40].

Ген *ANXA1* кодирует белок аннексин A1, также известный как липокортин-1. Аннексин A1 принадлежит к аннексиновому семейству Ca^{2+} -зависимых фосфолипидсвязывающих белков, которые преимущественно расположены на цитозольной поверхности плазматической мембраны. Этот белок обладает ингибирующей активностью в отношении фосфолипазы A2. Поскольку она необходима для биосинтеза мощных медиаторов воспаления, простагландинов и лейкотриенов, аннексин A1 может обладать потенциальной противовоспалительной активностью. Данный белок представляет интерес в качестве потенциального противоракового препарата. При индукции модифицированными нестероидными противовоспалительными препаратами и другими сильнодействующими противовоспалительными препаратами аннексин A1 ингибирует путь передачи сигнала NF- κ B (нуклеарного фактора κ B), который используется опухолевыми клетками для пролиферации и предотвращения апоптоза [41].

Ген *MAL* кодирует высокогидрофобный интегральный мембранный белок, принадлежащий к семейству протеолипидов. Этот белок локализован в эндоплазматическом ретикулуме T-клеток, является кандидатом на роль линкерного белка в передаче сигнала T-клетками и играет большую роль в формировании, стабилизации и поддержании обогащенных гликофинголипидами мембранных микродоменов [42].

Ген *MT-ND6* является частью митохондриального генома и кодирует белок цепи переноса электронов НАДН-убихиноноксидоредуктазу 6 (ND6). Белок ND6 является субъединицей НАДН-дегидрогеназы (убихинона), расположенной во внутренней мембране митохондрий и являющейся самым большим из 5 комплексов электрон-транспортной цепи [43].

Анализ, проведенный N. Li и соавт. (2018), показал, что митохондриальные респираторные гены обычно экспрессируются на более низких уровнях в опухолевых тканях по сравнению с соответствующими нормальными тканями. А экспрессия митохондриально кодируемой НАДН-дегидрогеназы 5 или 6 связана с прогрессированием опухоли при плоскоклеточном раке. Пациенты были разделены на 3 подгруппы

(кластера) на основе профиля экспрессии 13 генов, кодирующих митохондриальные белки, при этом у больных кластера 3 наблюдались более низкие показатели выживаемости по сравнению с больными кластера 1. В ходе дальнейшего анализа экспрессии ядерных генов, проведенного N. Li и соавт. (2018), в 3 кластерах было выявлено обогащение нескольких связанных с раком сигнальных путей в кластере 3, особенно апоптотического сигнального пути, что указывает на потенциальную связь между сниженной экспрессией генов митохондриальной ДНК и повышенной агрессивностью опухоли [44].

Кластер 2 (в нашем исследовании) соответствовал акантолитическому подтипу рака языка и характеризовался повышенной экспрессией генов *MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *COL1A1*, *LAMC2*, *MMP3* и *SPP1* и сниженной экспрессией генов *KRT13*, *SPRR3*, *KRT4*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CNFN*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU* относительно нормальной ткани. Часть выявленных дифференциально экспрессирующихся генов в кластере 2 совпала с таковыми в кластере 1: *MMP1*, *CA9*, *PTHLH* (гиперэкспрессия) и *ANXA1*, *MT-ND6*, *MAL* (гипоэкспрессия). Различия в перечне дифференциально экспрессирующихся генов (*MMP11*, *MMP9*, *COL1A1*, *LAMC2*, *ISG15*, *MMP3*, *SPP1*, *KRT13*, *SPRR3* и др.) в 2 группах пациентов, очевидно, обеспечивают различия в гистологии и течении акантолитического и базалоидного подтипов рака языка.

В частности, в работе Y. Moon и соавт. (2015) с использованием полногеномного транскрипционного анализа была обнаружена значительная активация в метастатических клетках гена *LAMC2* (ламнина γ -2), кодирующего белок базальной мембраны эпителия. Повышенный уровень экспрессии *LAMC2* увеличивал миграцию и инвазию опухолевых клеток, что сопровождалось индукцией эпителиально-мезенхимального перехода [45].

Еще одним интересным геном, гиперэкспрессируемым при акантолитическом подтипе рака языка, является *SPP1*. Данный генетический локус кодирует белок остеопонтин (OPN). Было показано, что OPN стимулирует образование интерлейкина 17 [46]. Остеопонтин сверхэкспрессируется при различных видах рака, включая рак легкого, молочной железы, колоректальный рак, рак желудка, яичников, меланому и мезотелиому плевры [47]. Этот белок участвует в развитии аденокарциномы поджелудочной железы, связывается с CD44 и интегринами, запуская ингибирование системы комплемента. Остеопонтин также стимулирует метастазирование, вызывая высвобождение фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и MMP. Этот процесс стимулируется никотином, который является одним из предполагаемых факторов повышения риска развития рака [48]. В настоящее время разрабатываются антитела против OPN (в том числе hu1A12), которые ингибируют метастазирование в исследованиях *in vivo*, а также при гибридизации

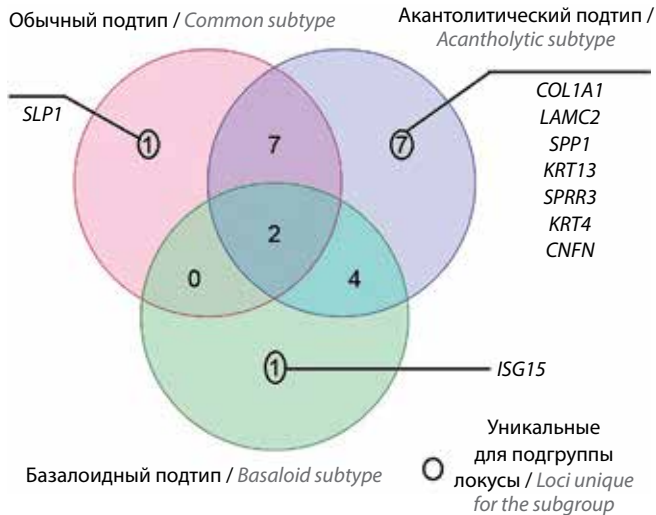


Рис. 10. Сравнение дифференциально экспрессирующихся генетических локусов в различных подтипах рака языка. Диаграмма Венна
Fig. 10. Comparison of differentially expressed genetic loci in different subtypes of tongue cancer. Venn diagram

с антителом против VEGF бевацизумабом [49]. Препарат моноклонального антитела против OPN AOM1 (Anti-Osteopontin Monoclonal antibody), разработанный Pfizer, Inc., демонстрирует перспективность в предотвращении прогрессирования крупных метастатических опухолей [50].

Кластер 3 (в нашем исследовании) соответствовал обычному типу плоскоклеточного рака языка и характеризовался повышенной экспрессией генов *MMP1*, *MMP11*, *MMP9*, *MMP3*, *SLPI* и сниженной экспрессией генов *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*. По количеству дифференциально экспрессирующихся генов этот подтип (10 генов) занимает промежуточное место между базалоидным (7 генов) и акантолитическим (20 генов) подтипами. При этом направления изменения экспрессии 2 генетических локусов (*MMP1* и *MAL*) совпадают во всех 3 группах (рис. 10; табл. 5).

Интересной особенностью обычного гистологического подтипа плоскоклеточного рака языка является повышенная экспрессия гена *SLPI*, кодирующего антилейкопротеиназу (ингибитор секреторной лейкоцитарной протеазы). Этот белок содержится в больших количествах в слизистой оболочке бронхов, шейки матки, носа и слюне [51]. В обычных физиологических условиях *SLPI* ингибирует эластазу лейкоци-

тов человека, которая секретируется во время воспаления и разрушает бактерии и ткани хозяина [52].

Повышенная экспрессия *SLPI* была обнаружена в различных типах опухолей, и было высказано предположение, что она увеличивает их метастатический потенциал. Было продемонстрировано, что экспрессия белка *SLPI* в метастазах колоректального рака в печени и в соответствующих первичных опухолях связана с худшим исходом. Однако роль *SLPI* до образования отдаленных метастазов, возможно, иная. Так, при колоректальном раке III стадии экспрессия *SLPI* может быть неблагоприятной для опухолей [53].

Таким образом, проведенное исследование позволило установить как общие для всех подтипов плоскоклеточного рака языка паттерны экспрессии генов, так и уникальные транскрипционные особенности каждого гистологического подтипа. Эти особенности могут обеспечивать различные клиническое течение и ответ на терапию этих заболеваний.

Канцерогенез представляет собой сложный биологический процесс, в котором некоторые генетические или эпигенетические события изменяют регуляцию сигнальных путей пролиферации, апоптоза, обеспечивая репликативное бессмертие, способствуя нестабильности генома, перепрограммируя энергетический метаболизм, индуцируя ангиогенез, активируя способность к инвазии и избеганию иммунного надзора [54]. Злокачественная трансформация тканей языка также является кумулятивным результатом дисфункции этих критических биологических реакций на стимулы эндогенных или экзогенных канцерогенов. Всестороннее понимание этих молекулярных особенностей плоскоклеточного рака языка не только дает информацию о поведении опухоли, но и позволяет предположить потенциальные мишени для терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить ряд молекулярных маркеров плоскоклеточного рака языка (*MMP1*, *MMP11*, *CA9*, *PTHLH*, *MMP9*, *LAMC2*, *MMP3*, *ANXA1*, *MT-ND6*, *CRNN*, *MAL*, *TGM3*, *IL1RN* и *CLU*), а также транскрипционные особенности различных гистологических подтипов данной патологии (обычного, базалоидного и акантолитического).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Льянова А.А., Владимирова Л.Ю., Франциянц Е.М. и др. Молекулярные основы современной таргетной терапии плоскоклеточного рака языка и слизистой дна полости рта моноклональными антителами. Злокачественные опухоли 2017;7(4):77–87. DOI: 10.18027/2224-5057-2017-7-4-77-87

Lyanova A.A., Vladimirova L.Yu., Frantsiyants E.M. et al. Molecular basis of modern targeted therapy for squamous cell carcinoma of the tongue and oral mucosa with monoclonal antibodies. Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumours 2017;7(4):77–87. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2017-7-4-77-87

2. The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010–19: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 2022;400(10352):563–91. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01438-6
3. Ion Ciucă Mărășescu F.I., Marasescu P.C., Matei M. et al. Epidemiological and histopathological aspects of tongue squamous cell carcinomas-retrospective study. *Curr Health Sci J* 2018;44(3): 211–24. DOI: 10.12865/CHSJ.44.03.03
4. Byers R.M., El-Naggar A.K., Lee Y.Y. et al. Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue. *Head Neck* 1998;20(2): 138–44. DOI: 10.1002/(sici)1097-0347(199803)20:2<138::aid-hed7>3.0.co;2-3
5. Neville B., Damm D., Allen C., Chi A. *Oral and maxillofacial pathology*. United States: Elsevier, 2015.
6. Ferris R.L., Blumenschein G. Jr., Fayette J. et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2016;375:1856–67. DOI: 10.1056/NEJMoa1602252
7. Lingen M.W., Pinto A., Mendes R.A. et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: Current status and future research. *Oral Dis* 2011;17(1):7–22. DOI: 10.1111/j.1601-0825.2011.01789.x
8. Jones P.A., Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415–28. DOI: 10.1038/nrg816
9. Kyrgidis A., Tzellos T.G., Triaridis S. Melanoma: stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. *J Carcinog* 2010;9:3. DOI: 10.4103/1477-3163.62141
10. Khan S.S., Kamboj M., Verma R., Kumar M. Epigenetics in oral cancer-neoteric biomarker. *J Oral Med Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol* 2016;2:62–5.
11. Владимирова Л.Ю., Лянова А.А., Франциянц Е.М. и др. Молекулярные механизмы резистентности к терапии моноклональными антителами у больных плоскоклеточным раком языка и слизистой дна полости рта. *Злокачественные опухоли* 2018;4:13–25. DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-4-13-25
Vladimirova L.Yu., Lyanova A.A., Frantsiyants E.M. et al. Molecular mechanisms of resistance to monoclonal antibodies therapy patients with squamous cell carcinoma of the tongue and mucosa of the oral cavity. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant tumours* 2018;8(4): 13–25. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-4-13-25
12. Hema K.N., Smitha T., Sheethal H.S., Mirnalini S.A. Epigenetics in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol* 2017;21(2):252–9. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_150_17
13. Tang Z., Li Ch., Kang B. et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res* 2017;45(W1):W98–102. DOI: 10.1093/nar/gkx247
14. Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г. и др. Аберрантная транскрипционная активность генов как фактор радиорезистентности клеток линии HT-29. *Современные проблемы науки и образования* 2020;3. Доступно по: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29831>.
Kutilin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G. et al. Aberrant transcriptional activity of genes as a factor of Ht-29 cells radioresistance. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education* 2020;3. (In Russ.). Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29831>.
15. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3(7):1–12.
16. Kutilin D.S. Regulation of gene expression of cancer/testis antigens in colorectal cancer patients. *Mol Biol* 2020;54:520–34. (In Russ.). DOI: 10.1134/S0026893320040093
17. Krishnan A., Zhang R., Yao V. et al. Genome-wide prediction and functional characterization of the genetic basis of autism spectrum disorder. *Nat Neurosci* 2016;19(11):1454–62. DOI: 10.1038/nn.4353
18. Димитрияди Т.А., Бурцев Д.В., Дженкова Е.А., Кутилин Д.С. Дифференциальная экспрессия микроРНК и их генов-мишеней при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях разной степени тяжести. *Успехи молекулярной онкологии* 2020;7(2):30–44. DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-47-61
Dimitriadi T.A., Burtsev D.V., Dzhenkova E.A., Kutilin D.S. Differential expression of microRNAs and their target genes in cervical intraepithelial neoplasias of varying severity. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2020; 7(2):47–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-2-47-61
19. Warde-Farley D., Donaldson S.L., Comes O. et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res* 2010;38(2):214–20. DOI: 10.1093/nar/gkq537
20. Shah S., Pathak P., Gulati N. Cell signaling pathways in oral cancer: a review. *J Applied Dental Med Sci* 2015;1(1):69–75.
21. Chiaradonna F., Moresco R.M., Airoidi C. et al. From cancer metabolism to new biomarkers and drug targets. *Biotechnol Adv* 2012;30(1):30–51. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.006
22. Wang L., Li X. Identification of an energy metabolism-related gene signature in ovarian cancer prognosis. *Oncol Rep* 2020;43(6):1755–70. DOI: 10.3892/or.2020.7548
23. Xing L., Guo M., Zhang X. et al. A transcriptional metabolic gene-set based prognostic signature is associated with clinical and mutational features in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2020;146(3):621–30. DOI: 10.1007/s00432-020-03155-4
24. Liu J., Lichtenberg T., Hoadley K.A. et al. An Integrated TCGA Pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics. *Cell* 2018;173(2):400–16. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.052
25. Wu X., Yao Y., Li Z. et al. Identification of a transcriptional prognostic signature from five metabolic pathways in oral squamous cell carcinoma. *Front Oncol* 2020;10:572919. DOI: 10.3389/fonc.2020.572919
26. Estilo C.L., O-charoenrat P., Talbot S. et al. Oral tongue cancer gene expression profiling: identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. *BMC Cancer* 2009;9:11. DOI: 10.1186/1471-2407-9-11
27. Nagata M., Fujita H., Ida H. et al. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 2003;106:683–9. DOI: 10.1002/ijc.11283
28. Impola U., Uitto V.J., Hietanen J. et al. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol* 2004;202(1):14–22. DOI: 10.1002/path.1479
29. Zhang H., Liu J., Fu X., Yang A. Identification of key genes and pathways in tongue squamous cell carcinoma using bioinformatics analysis. *Med Sci Monit* 2017;23:5924–32. DOI: 10.12659/msm.905035
30. Tallant C., Marrero A., Gomis-Rüth F.X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim. Biophys Acta* 2010;1803(1):20–8. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.04.003
31. Frost S.C., McKenna R. Carbonic anhydrase: mechanism, regulation, links to disease, and industrial applications. Springer Science & Business Media, 2013.
32. Chiche J., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* 2010;14(4):771–94. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x
33. Tafreshi N.K., Lloyd M.C., Bui M.M. et al. Carbonic anhydrase: mechanism, regulation, links to disease, and industrial applications. *Subcell Biochem* 2014;5:221–54. DOI: 10.1007/978-94-007-7359-2_12
34. Zatovicova M., Sedlakova O., Svastova E. et al. Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br J Cancer* 2005;93(11):1267–76. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602861
35. Kirkpatrick J.P., Rabbani Z.N., Bentley R.C. et al. Elevated CAIX expression is associated with an increased risk of distant failure in early-stage cervical cancer. *Biomark Insights* 2008;3:45–55. DOI: 10.4137/bmi.s570

36. Hilvo M., Baranauskiene L., Salzano A.M. et al. Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes. *J Biol Chem* 2008;283(41):27799–809. DOI: 10.1074/jbc.M800938200
37. Chiche J., Brahimi-Horn M.C., Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *J Cell Mol Med* 2010;14(4):771–94. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x
38. De Simone G., Supuran C.T. Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804 (2):404–9. DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.07.027
39. Rausch V., Sala V., Penna F. et al. Understanding the common mechanisms of heart and skeletal muscle wasting in cancer cachexia. *Oncogenesis* 2021;10(1):1. DOI: 10.1038/s41389-020-00288-6
40. Sainz B., Martín B., Tatari M. et al. ISG15 is a critical microenvironmental factor for pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2014;74(24):7309–20. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1354
41. Zhang Z., Huang L., Zhao W., Rigas B. Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF-kappaB and inhibits its activation: anticancer effects in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2010;70(6):2379–88. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4204
42. GeneCards: The Human Gene Database. MAL mal, T-cell differentiation protein. Available at: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAL>.
43. Voet D., Voet J.G., Pratt C.W. *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*. 4th ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2013. Pp. 581–620.
44. Li N., Zhao J., Ma Y. et al. Dissecting the expression landscape of mitochondrial genes in lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma. *Oncology Letters* 2018;16(3):3992–4000. DOI: 10.3892/ol.2018.9113
45. Moon Y., Rao G., Kim J. et al. LAMC2 enhances the metastatic potential of lung adenocarcinoma. *Cell Death Differ* 2015;22(8):1341–52. DOI: 10.1038/cdd.2014.228
46. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13(2):139–45. DOI: 10.1038/nm1551
47. Wang K.X., Denhardt D.T. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19(5–6):333–45. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2008.08.001
48. Sakata M., Tsuruha J.I., Masuko-Hongo K. et al. Autoantibodies to osteopontin in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001;28(7):1492–5.
49. Clay R., Siddiqi S.A. Recent advances in molecular diagnostics and therapeutic targets for pancreatic cancer. *Theranostic Approach Pancreatic Cancer* 2019:325–67.
50. Farrokhi V., Chabot J.R., Neubert H., Yang Z. Assessing the feasibility of neutralizing osteopontin with various therapeutic antibody modalities. *Sci Rep* 2018;8(1):7781.
51. Claus A., Lilja H., Lundwall A. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. *Biochem J* 2002;368(1):233–42. DOI: 10.1042/BJ20020869
52. Belaouaj A., Kim K.S., Shapiro S.D. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 2000;89(5482):1185–8. DOI: 10.1126/science.289.5482.1185
53. Nugteren S., den Uil S.H., Delis-van Diemen P.M. et al. High expression of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in stage III microsatellite stable colorectal cancer is associated with reduced disease recurrence. *Sci Rep* 2022;12:12174. DOI: 10.1038/s41598-022-16427-5
54. Chen S.H., Hsiao S.Y., Chang K.Y., Chang J.Y. New insights into oral squamous cell carcinoma: from clinical aspects to molecular tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 2021;22(5):2252. DOI: 10.3390/ijms22052252

Вклад авторов

Д.С. Кутилин: разработка концепции исследования, проведение биоинформационного анализа, выполнение экспериментальной части работы, написание текста статьи;

А.Э. Данилова: сбор биологического материала, выполнение экспериментальной части работы, написание текста статьи;

А.Ю. Максимов: разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, научное редактирование;

А.В. Снежко: анализ и интерпретация данных, научное редактирование;

М.А. Енгибарян: разработка дизайна исследования, научное редактирование.

Authors' contributions

D.S. Kutilin: development of the research concept, bioinformatics analysis, experimental part of the work, article writing;

A.E. Danilova: collection of biological material, implementation of the experimental part of the work, article writing;

A.Yu. Maksimov: study design development, data analysis and interpretation, scientific editing;

A.V. Snezhko: analysis and interpretation of data, scientific editing;

M.A. Engibaryan: research design development, scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.С. Кутилин / D.S. Kutilin: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

А.Ю. Максимов / A.Yu. Maksimov: <https://orcid.org/0000-0002-9471-3903>

А.В. Снежко / A.V. Snezhko: <https://orcid.org/0000-0003-3998-8004>

М.А. Енгибарян / M.A. Engibaryan: <https://orcid.org/0000-0001-7293-2358>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биоэтике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (протокол № 14 от 16.10.2019).

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the bioethics committee of the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 14 of 10/16/2019).

All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 16.09.2022. **Принята к публикации:** 16.01.2023.

Article submitted: 16.09.2022. **Accepted for publication:** 16.01.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-79-86



Исследование подавления роста опухоли, экспрессирующей раково-эмбриональный антиген, новым высокотехнологичным препаратом карплазмин (CAR-T-терапия) у мышей линии Balb/c nude

В.К. Боженко¹, А.М. Шишкин¹, А.Н. Шкопоров², Я.Ю. Киселева¹, Т.М. Кулинич¹, О.Б. Большакова¹, Е.А. Кудинова¹, В.А. Солодкий¹

¹ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86;

²APC Microbiome Ireland, School of Microbiology & Department of Medicine, University College; College Road, T12 K8AF Cork, Ireland

Контакты: Яна Юрьевна Киселева yukiseleva@rncrr.ru

Введение. Адоптивная иммунотерапия на основе химерных антигенных рецепторов (CAR) рассматривается как перспективное направление в лечении солидных злокачественных опухолей. Для получения генетически модифицированных Т-лимфоцитов человека в настоящее время чаще всего используется ленти-/ретровирусная трансдукция. Однако проблемы безопасности, связанные с продукцией вирусного вектора и возможной нежелательной модификацией генома, ограничивают клиническую применимость CAR-T-клеток. Поэтому невирусные методы трансфекции, в частности электропорация с использованием ДНК- или РНК-векторов, активно исследуются как подход для получения CAR-T-лимфоцитов.

Цель исследования – оценка противоопухолевой активности *in vivo* нового высокотехнологичного лекарственного средства карплазмин, предназначенного для CAR-T-терапии опухолей, экспрессирующих раково-эмбриональный антиген (РЭА).

Материалы и методы. Карплазмин получен методом электропорации активированных лимфоцитов человека плазмидной ДНК, несущей ген CAR 3-го поколения, специфичный к РЭА. Исследование выполнено на модели ксено-трансплантата колоректального рака человека, полученной при интраперитонеальном введении РЭА-положительных клеток линии НСТ116 бестимусным мышам линии Balb/c nude. Введение карплазмина проводили 1 раз в неделю, начиная с 3-го дня после прививания клеток НСТ116. Мышам 2 контрольных групп вводили либо лимфоциты, подвергнутые электропорации без внесения плазмиды (пульс-лимфоциты), либо культуральную среду RPMI-1640 (группа без лечения).

Результаты. *In vivo* карплазмин демонстрировал выраженное противоопухолевое действие. Семь еженедельных введений препарата привитым мышам привели к выраженному эффекту противоопухолевой терапии: 80 % животных в экспериментальной группе выжили (при этом у 40 % мышей наблюдалась полная ремиссия без признаков определяемой опухоли), тогда как в контрольной (без лечения) группе 100 % животных погибли.

Заключение. Результаты доклинических исследований эффективности демонстрируют, что карплазмин является перспективным препаратом для терапии РЭА-позитивных интраперитонеальных опухолей.

Ключевые слова: адоптивная иммунотерапия, химерный антигенный рецептор, CAR-T-терапия, электропорация, раково-эмбриональный антиген

Для цитирования: Боженко В.К., Шишкин А.М., Шкопоров А.Н. и др. Исследование подавления роста опухоли, экспрессирующей раково-эмбриональный антиген, новым высокотехнологичным препаратом карплазмин (CAR-T-терапия) у мышей линии Balb/c nude. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(1):79–86. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-79-86

Study of the suppression of a tumor growth expressing a carcinoembryonic antigen with a new high-tech drug carplazmin (CAR-T therapy) in Balb/c nude mice

V.K. Bozhenko¹, A.M. Shishkin¹, A.N. Shkoporov², Y. Yu. Kiseleva¹, T.M. Kulnich¹, O.B. Bolshakova¹, E.A. Kudinova¹, V.A. Solodkiy¹

¹Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia; 86 Profsoyuznaya St., Moscow 117997, Russia;

²APC Microbiome Ireland, School of Microbiology & Department of Medicine, University College; College Road, T12 K8AF Cork, Ireland

Contacts: Yana Yurevna Kiseleva yykiseleva@ncrr.ru

Introduction. Adoptive immunotherapy based on chimeric antigen receptors (CAR) is considered as a promising direction in the treatment of solid malignant tumors. To produce genetically modified human T-lymphocytes, lenti/retroviral transduction is currently most often used. However, safety concerns associated with the viral vector production and possible unwanted genome modification limit the clinical utility of CAR-T cells. Therefore, non-viral transfection methods, in particular electroporation, using of DNA or RNA vectors, are being actively studied as a method for producing CAR-T lymphocytes.

Aim. To evaluate *in vivo* antitumor activity of the new high-tech drug carplasma, intended for CAR-T therapy of tumors expressing carcinoembryonic antigen (CEA).

Materials and methods. Carplasma was obtained by electroporation of activated human lymphocytes with plasmid DNA carrying the third generation CAR gene specific to CEA. The study was performed on a human colorectal cancer xenograft model obtained by intraperitoneal injection of CEA-positive HCT116 cell line to athymic Balb/c nude mice. Carplasma treatment was carried out once a week, starting from the third day after HCT116 cell inoculation. Mice in the two control groups were treated with either electroporated lymphocytes without plasmid addition (pulse-lymphocytes) or RPMI-1640 culture medium (group without treatment).

Results. *In vivo*, carplasma demonstrated a pronounced antitumor effect. Seven weekly injections of the drug to inoculated mice led to a prominent effect of antitumor therapy: 80 % of the animals in the experimental group survived (with 40 % of the mice had a complete remission without signs of a detectable tumor), compared to 100 % death in the control group (without treatment).

Conclusion. The results of preclinical efficacy studies demonstrate that carplasma is a promising drug for the treatment of CEA-positive intraperitoneal tumors.

Keywords: adoptive immunotherapy, chimeric antigen receptors, CAR-T therapy, electroporation, carcinoembryonic antigen

For citation: Bozhenko V.K., Shishkin A.M., Shkoporov A.N. et al. Study of the suppression of a tumor growth expressing a carcinoembryonic antigen with a new high-tech drug carplasma (CAR-T therapy) in Balb/c nude mice. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):79–86. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-79-86

ВВЕДЕНИЕ

Лечение злокачественных новообразований на поздних стадиях развития и рецидивирующих опухолей с использованием традиционных методов, таких как хирургия, радио- и химиотерапия, как правило, неэффективно. Это стимулировало появление новых подходов к терапии злокачественных новообразований, одним из которых является адоптивная иммунотерапия на основе Т-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (chimeric antigen receptor, CAR) заданной специфичности. Успешное применение CAR-T-терапии с продолжительным периодом полной ремиссии показано для пациентов с гемобластомами при переносе CAR-T-лимфоцитов, направленных против CD19, CD20, иммуноглобулина каппа (Ig-каппа) и BCMA [1–3]. Адаптация CAR-T-терапии для лечения солидных опухолей в настоящее время рассматривается как перспективное направление в лечении злокачественных заболеваний [1]. Для доставки CAR в первичные Т-клетки человека широко используется высокоэффективная ленти-/ретровирусная трансдукция, при которой, однако, из-за интеграции нового генетического материала в геном клетки существует риск потенциальной аутоагрессии или злокачественной трансформации.

В настоящее время нами разрабатывается высокотехнологичный лекарственный препарат с рабочим названием карплазмин, предназначенный для лечения РЭА-положительных опухолей человека (РЭА – раково-эмбриональный антиген). Он представляет собой

лимфоциты, генетически модифицированные *ex vivo* ДНК-плазмидой, доставленной в клетку с помощью электропорации. Данная плазида обеспечивает экспрессию на поверхности клеток CAR с высокой аффинностью к опухолевому варианту РЭА. Распознающая часть CAR является фрагментом варибельного участка моноклонального антитела 3С1, специфичного к эпитопу 4 (по классификации GOLD [4]) домена А1В1 молекулы РЭА [4, 5]. 3С1 было выбрано из панели антител, специфичных к различным эпитопам РЭА, при анализе их связывания с поверхностью РЭА-положительных культур клеток HT29, HCT116 и A549 [5, 6].

Ранее нами было показано, что карплазмин обладает способностью поражать линии опухолевых клеток человека HT29 (колоректальная аденокарцинома), HCT116 (колоректальная карцинома) и A549 (карцинома легкого), экспрессирующих РЭА, и имеет минимальную цитотоксичность по отношению к РЭА-отрицательным клеткам [5–7].

В настоящей работе в рамках доклинических исследований препарата карплазмин были изучены его противоопухолевые свойства на модели гетеротопического ксенографта колоректального рака человека на мышах линии Balb/c nude.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тестируемый препарат. Карплазмин – лимфоциты, генетически модифицированные ДНК-плазмидой 3С1-3g («Медгамал», Россия). Эта плазида имеет молекулярную массу 3458 кДа и кодирует CAR 3-го поколения [8],

состоящий из антиген-распознающего домена scFv (клон мышинового антитела 3C1, специфичного к РЭА), шарнирного участка CD8, трансмембранного домена CD28 и активационных доменов CD28, CD137 (4-1BB), CD247 (ζ -цепь).

Клеточная линия. Клетки перевиваемой культуры колоректального рака человека HCT116 культивировали в питательной среде DMEM (содержание глюкозы 4,5 г/л; ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, Gibco, Paisley, Великобритания) и 10 мкг/мл гентамицина (ООО «ПанЭко», Россия).

Введение опухолевых клеток HCT116 бестимусным мышам. Эксперименты на животных были проведены на базе филиала Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (Пушино, Россия). В эксперимент были включены 40 семинедельных самцов мышей линии Balb/c nude, приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пушино» – филиале Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Для прививания опухоли готовили суспензию клеток культуры HCT116 по стандартной методике, используя 0,25 % раствор трипсин-этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (ООО «ПанЭко», Россия). Полученную суспензию отмывали бессывороточной средой DMEM при 300 г в течение 5 мин. Осадок ресуспендировали в этой же среде, количество клеток в суспензии определяли на гематологическом анализаторе Адвия-60 (Bayer HealthCare LLC, США). Суспензию клеток линии HCT116 вводили интрабрюшинно в количестве $1,9 \times 10^6$ клеток/мышь (объем суспензии составлял 0,375 мл) 30 мышам экспериментальной группы. Еще 10 мышей, которым опухолевые клетки не вводили, составили группу интактных мышей, необходимую для контроля качества содержания и исключения возможной смертности в связи с иммунной недостаточностью и присоединения инфекций.

Получение первичной культуры лимфоцитов человека и их активация. Мононуклеары периферической крови выделяли из гепаринизированной периферической крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла (1,077 г/мл; ООО «ПанЭко», Россия) при 400 г в течение 25 мин. Мононуклеары периферической крови отмывали фосфатно-солевым буфером, pH 7,4 (ООО «ПанЭко», Россия) и культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), L-глутамин и 10 мкг/мл гентамицина, при 37 °C и 5 % CO₂. Количество и состав выделенных мононуклеаров периферической крови контролировали на гематологическом анализаторе Адвия-60. Лимфоциты стимулировали к пролиферации добавлением 50 Ед/мл интерлейкина-2 (НПК «Биотех», Россия) и 2 мкг/мл фитогемагглютина (ООО «ПанЭко», Россия). Клетки культивировали в чашках Петри с адгезивным покрытием в сте-

рильных условиях при температуре 37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO₂ в течение 24 ч. За это время происходила адгезия содержащихся в мононуклеарной фракции крови моноцитов к дну чашек Петри. Неприкрепившиеся клетки, представляющие собой в основном активированные лимфоциты, смывали пипетированием и использовали для электропорации.

Приготовление препарата карплазмин и его введение мышам. Электропорацию активированных лимфоцитов проводили на приборе Neon (Invitrogen, США) с использованием набора Neon™ Transfection System 100 μ L Kit согласно рекомендациям производителя. Суспензию активированных лимфоцитов делили пополам. Одну часть трансфецировали плазмидой 3C1-3 g, другую подвергали электропорации в том же режиме без внесения плазмиды (пульс-лимфоциты). Для трансфекции 1 образца объемом 100 мкл использовали 1,5–2 млн клеток, 7 мкг плазмиды 3C1-3 g (стерильный раствор с концентрацией 1 мг/мл) и следующий режим: напряжение пульса 2200 В, продолжительность пульса 20 мс, количество пульсов – 1. Клетки после каждой трансфекции переносили в чашки Петри и культивировали в 5 мл среды RPMI-1640 с 10 % ЭТС без антибиотика в стерильных условиях при температуре 37 °C, 5 % CO₂ и относительной влажности 95 % в течение 24 ч. Через 1 сут лимфоциты дважды отмывали в 10 мл среды RPMI-1640 при 300 г в течение 5 мин. Карплазмин и пульс-лимфоциты разводили средой RPMI-1640 до одинаковой концентрации клеток. Полученные суспензии клеток вводили интраперитонеально бестимусным мышам в объеме 0,2 мл в разные сроки после прививания опухоли. Мыши с привитой опухолью были разделены на 3 группы: 10 мышей в каждой. Животным одной группы вводили карплазмин, другой – пульс-лимфоциты, третьей – тот же объем среды RPMI-1640.

Оценка содержания CD3-лимфоцитов человека в смывах брюшной полости мышей, получавших лечение. Смывы получали из брюшной полости животных в конце эксперимента (на 68-й день). Смывы фильтровали с помощью сита с диаметром пор 40 мкм, центрифугировали при 250 г 5 мин, надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с добавлением 2 % ЭТС и 2 мМ ЭДТА. Полученную суспензию клеток окрашивали моноклональными мышинными антителами, меченными FITC, специфичными к рецептору CD3 человека, и изотипическими антителами IgG1, меченными FITC (Becton Coulter, США), согласно рекомендациям производителя. Клетки анализировали в течение 2 ч после окраски на проточном цитофлуориметре FC500 (Becton Coulter Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование противоопухолевой активности карплазмина проводилось на модели ксенографта колоректального рака человека (клеточная линия

НСТ116) у бестимусных мышей линии Balb/c nude. Суспензию клеток линии НСТ116 вводили однократно внутрибрюшинно 30 бестимусным мышам. Животные были разделены на 3 равные группы. Для удобства группы обозначены следующим образом: 1-я – мыши, которым внутрибрюшинно вводили карплазмин; 2-я – группа сравнения, в которой мышам внутрибрюшинно вводили лимфоциты, подвергнутые электропорации без добавления ДНК-плазмиды (пульс-лимфоциты); 3-я – контрольная (мыши не получали лечения, внутрибрюшинно им вводили среду RPMI-1640). Внутрибрюшинные инъекции животным начали делать на 3-й день после прививания опухоли и далее, начиная с 14-го дня, вводили с интервалом 1 раз в неделю в течение 6 нед. Количество вводимых лимфоцитов составляло 1–1,5 млн на инъекцию.

Рост привитой культуры происходил в основном в виде солидных опухолей, спаянных с париетальной брюшиной и прорастающих ее. Асцит наблюдался в терминальной стадии развития опухоли и быстро приводил к гибели экспериментальных животных. Внутрибрюшинный характер роста опухоли после прививания делал невозможным контроль ее размеров. Для мониторинга состояния животных проводили их еженедельное взвешивание и визуальное наблюдение за опухолевыми узлами, появляющимися после прорастания опухолью брюшины. Во всех группах до 28-го дня после прививания опухоли наблюдалось постепенное увеличение массы тела мышей. Далее в группах с привитой опухолью отмечалась стабилизация показателей массы тела, а в группе интактных

мышей продолжалось ее линейное возрастание еще в течение 2 нед.

Динамика появления опухолевых узлов у мышей представлена в таблице. Первые видимые опухолевые узлы появились у 2 мышей 3-й группы на 14-й день после прививания. При этом их возникновение у животных 1-й и 2-й групп было отсрочено на неделю; опухолевые узлы появились на 21-е сутки у 4 мышей в каждой группе.

Кривые выживаемости мышей представлены на рис. 1. К 8-й неделе наблюдения (день 56) все животные в 3-й группе погибли. На этот момент в экспериментальных 1-й и 2-й группах оставались живыми 80 и 60 % мышей соответственно. Внешний вид бестимусных животных в 1-й и 3-й группах представлен на рис. 2.

Эксперимент был продолжен до 68-го дня после прививания с целью установления динамики гибели мышей в 1-й и 2-й группах. На момент окончания эксперимента в 1-й группе оставалось 6 мышей (2 – с признаками опухоли и 4 – без них), в то время как в группе 2 – только 3 мыши, причем у 2 из них наблюдались признаки опухоли и только у 1 их не было (см. таблицу). У мышей 1-й и 2-й групп были исследованы опухоли и внутренние органы, а также проведены смывы с брюшной полости для получения лимфоцитов с целью их цитофлуориметрического анализа. Следует отметить, что у 2 мышей с опухолью из 2-й группы отмечались признаки начинающегося асцита. У животных с опухолью из 1-й группы, получавших карплазмин, признаков асцита не было. Оставшиеся мыши

Число живых мышей с видимыми опухолевыми узлами и без узлов в разных группах по дням после прививания клеток НСТ116

Number of alive mice with visible tumor nodes and number of mice without nodes in groups by days after HCT116 cell inoculation

Группа Group	Число мышей, <i>n</i> Number of mice, <i>n</i>								
	7-й день 7 th day	14-й день 14 th day	21-й день 21 th day	28-й день 28 th day	35-й день 35 th day	42-й день 42 th day	49-й день 49 th day	56-й день 56 th day	68-й день 68 th day
1-я (карплазмин): Group 1 (carplasmin):									
число мышей с опухолевыми узлами, <i>n</i> number of mice with visible tumor nodes, <i>n</i>	0	0	4	5	5	5	5	4	2
число мышей без узлов, <i>n</i> number of mice without visible tumor nodes, <i>n</i>	10	10	6	5	5	5	4	4	4
2-я (пульс-лимфоциты): Group 2 (pulse-lymphocytes):									
число мышей с опухолевыми узлами, <i>n</i> number of mice with visible tumor nodes, <i>n</i>	0	0	4	7	7	6	5	5	2
число мышей без узлов, <i>n</i> number of mice without visible tumor nodes, <i>n</i>	10	10	6	3	3	1	1	1	1
3-я (без лечения, среда RPMI-1640): Group 3 (no treatment, RPMI-1640 medium):									
число мышей с опухолевыми узлами, <i>n</i> number of mice with visible tumor nodes, <i>n</i>	0	2	5	6	6	4	2	0	0
число мышей без узлов, <i>n</i> number of mice without visible tumor nodes, <i>n</i>	10	8	5	4	2	2	1	0	0

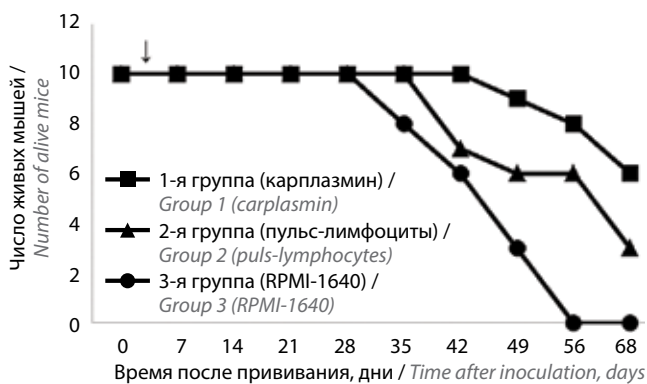


Рис. 1. Кривые выживаемости бестимусных мышей с привитыми опухолевыми клетками HCT116 в группах, получавших лечение карплазмином, пульс-лимфоцитами и не получавших лечения. Стрелка указывает время начала терапии

Fig. 1. Survival curves of athymic mice with transplanted HCT116 tumor cells in groups treated with carplazmin, pulse-lymphocytes and not treated. The arrow indicates the start time of therapy



Рис. 2. Внешний вид бестимусных мышей с привитой опухолью HCT116 на конец наблюдения: а – группы карплазмина; б – группы без лечения (в терминальной стадии развития опухоли)

Fig. 2. Appearance of athymic mice with transplanted HCT116 tumor at the end of the observation: а – in a group treated with carplazmin; б – in a group without treatment (in the terminal stage of tumor development)

(1 мышь 2-й группы и 4 мыши 1-й группы) наблюдались в течение 3 мес без признаков опухолевого роста.

Таким образом, можно заключить, что у этих животных произошло полное излечение.

Следует отметить, что опухоли, развившиеся у мышей, имели плохое кровоснабжение и уже при размере около $0,5 \times 0,5$ см содержали некротизированные участки. Узловой рост значительной части опухоли затруднял цитотоксическое воздействие со стороны вводимых интраперитонеально лимфоцитов. В то же время можно предположить, что ранние сроки начала противоопухолевой терапии – на 3-й день после прививания опухоли – обеспечивали цитотоксическое воздействие на опухоль незначительных размеров, что снижало темпы развития новообразования или вело к его лизису до достижения макроскопических размеров в 1-й и 2-й группах. Следует также учитывать, что основной причиной гибели экспериментальных животных было развитие опухолевого асцита. Как правило, не наблюдалось прорастания опухоли в жизненно важные органы и не было обнаружено отдаленных метастазов. По-видимому, в таких условиях интраперитонеальные инъекции цитотоксических лимфоцитов могли сдерживать развитие асцита и удлинять продолжительность жизни мышей.

Цитофлуориметрический анализ смывов с брюшной полости мышей, проведенный спустя 13 дней после окончания введения лимфоцитов человека, показал наличие у мышей 1-й группы большого количества CD3-лимфоцитов человека, составлявших основную часть клеточной массы смыва. В то же время в смывах мышей 2-й группы CD3-лимфоцитов практически не содержалось. Результаты проточной цитометрии представлены на рис. 3. Полученные данные могут говорить об избирательном накоплении карплазмина в областях, прилегающих к опухоли, и о продолжительности оказываемого ими цитотоксического эффекта. Можно предположить, что это связано с повышением выживаемости и/или пролиферации активированных антигеном лимфоцитов.

Таким образом, лимфоциты, трансфицированные плазмидой, кодирующей РЭА-специфичный химерный антигенный рецептор, оказывают выраженное противоопухолевое воздействие *in vivo* и сохраняются в брюшной полости в течение периода времени, достаточного для противодействия развитию РЭА-положительной опухоли при условии повторных еженедельных инъекций. Важным является тот факт, что на момент гибели 100 % мышей в контрольной группе, в группе мышей, получавших карплазмин, 80 % животных оставалось живыми. Также принципиально важно, что 40 % мышей в этой группе были излечены полностью.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мишенью карплазмина является РЭА – антиген, высокоэкспрессированный на поверхности опухолевых клеток аденокарцином желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы, немелкоклеточного

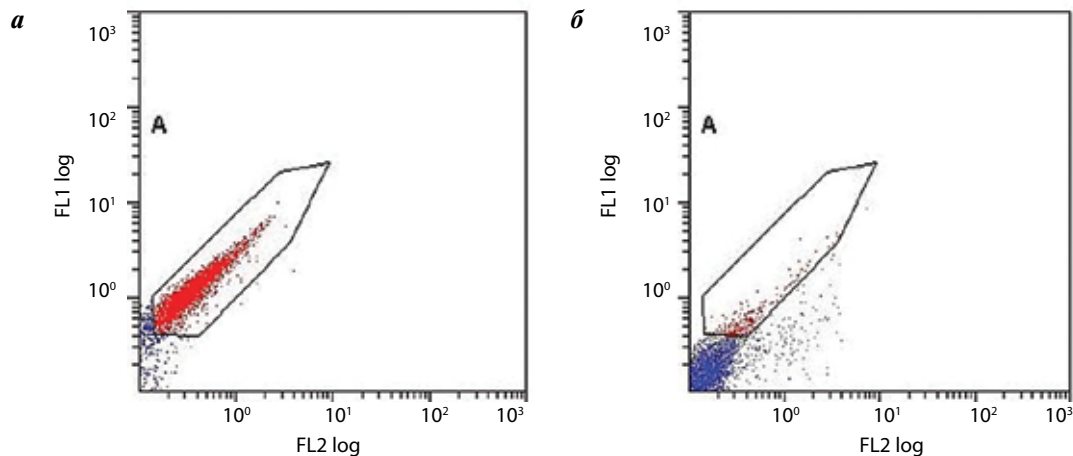


Рис. 3. Результаты цитофлуориметрического анализа лимфоцитов, содержащихся в смыве с брюшной полости мышей, получавших карплазмин (а) и пульс-лимфоциты (б). Красным цветом показаны лимфоциты, несущие на поверхности рецептор CD3, синим — лимфоциты, у которых рецептор CD3 отсутствует

Fig. 3. Results of flow cytometric analysis of human lymphocytes contained in peritoneal lavage of mice treated with cariplasmin (a) and pulse-lymphocytes (б). Lymphocytes bearing the CD3 receptor on the surface are shown in red, lymphocytes in which the CD3 receptor is absent, in blue

рака легких, рака молочной железы и при ряде других опухолей различной локализации [9]. В то же время в норме он экспрессирован на столбчатых эпителиальных и бокаловидных клетках толстой кишки, шеечных клетках выводных протоков фундальных желез и клетках пилорических желез желудка, клетках плоского эпителия языка, пищевода и шейки матки, протоков потовых желез и эпителиальных клетках простаты. Однако локализация РЭА на нормальных клетках ограничена апикальной поверхностью мембран и, таким образом, топологически отделена от воздействия иммунных клеток [9, 10]. При этом экспрессия РЭА на клетках аденокарциномы толстой кишки теряет свою полярность, а уровень ее значительно возрастает (до 35 раз), что усиливает различия между нормальной и опухолевой тканью [11]. Клинические испытания РЭА-специфических CAR-T-лимфоцитов в группе пациентов с метастатическим колоректальным раком показали минимальное проявление цитокинового шторма и стабилизацию заболевания в течение 34 нед у 7 пациентов против прогрессирования у 3 пациентов [12]. Эти данные, с одной стороны, указывают на минимальные побочные эффекты РЭА-специфичной CAR-T-терапии, а с другой — на необходимость создания и тестирования новых конструкций химерных рецепторов к другим эпитопам РЭА для повышения эффективности этой терапии.

По данным литературы, наряду с лентивирусными конструкциями, ДНК-плазмидами для создания CAR-T-клеток может использоваться матричная РНК (мРНК). Введение в клетку мРНК отличают быстрая и эффективная экспрессия CAR и высокая жизнеспособность клеток [13, 14]. Тем не менее ДНК является более стабильным генетическим материалом и может сохраняться в клетках длительное время [15], приводя к пролонгированной экспрессии CAR. Еще одним

недостатком мРНК является ее меньшая стабильность по сравнению с ДНК. Для получения, хранения и использования мРНК в качестве лечебного препарата необходимо создать специальные условия, включающие рабочее пространство, свободное от РНКаз. Использование ДНК не требует таких условий.

Для получения карплазмиды, а именно для введения в лимфоциты ДНК-плазмиды, использовался метод электропорации. Такой подход позволил получить модифицированные клетки, обладающие выраженной цитотоксической активностью в отношении РЭА-положительных клеточных культур НСТ116, НТ29 и умеренной — в отношении клеточной культуры А549. Цитотоксический эффект определялся с помощью МТТ-теста и измерения активности лактатдегидрогеназы после 24-часовой инкубации трансфицированных лимфоцитов с клетками-мишенями [5]. Кроме того, с помощью метода проточной цитофлуориметрии выявлен более чем 50 % цитотоксический эффект после 5-часовой инкубации клеток линии НСТ116, предварительно окрашенных CFDA-SE, с лимфоцитами, экспрессирующими CAR, в соотношении 1 : 10 [5, 7]. Как альтернатива данному подходу, CAR-лимфоциты могут быть получены с помощью трансдукции с использованием ретровирусных и лентивирусных векторов [16, 17]. Так, применив для трансдукции ретровирусный вектор MFG, D.M. Vargrett и соавт. [14] получали лимфоциты человека со 2-м поколением CAR, которые затем тестировали на модели мышей с привитой опухолью (генно-инженерная культура клеток MIPCEA с искусственно полученной экспрессией РЭА). Лечение РЭА-специфичными лимфоцитами проводилось в 2 вариантах: начиная с 1-го и 6-го дня после прививания РЭА-экспрессирующих клеток. При 1-м варианте терапии все мыши выжили, а при 2-м выжила только 1 из 4 особей

[16]. Таким образом, независимо от метода доставки ДНК (трансфекция методом электропорации или трансдукция) CAR-лимфоциты способны эффективно подавлять РЭА-положительную опухоль на мышинной модели. Однако, по нашему мнению, получение CAR-лимфоцитов с помощью доставки ДНК-плазмиды в клетку методом электропорации является более предпочтительным. Во-первых, это наиболее быстрый и дешевый способ получения CAR-лимфоцитов. Во-вторых, при таком подходе отсутствует риск инсерционного мутагенеза и активации онкогенов. В-третьих, постоянная антигенная стимуляция CAR-лимфоцитов клетками опухоли в организме реципиента приводит к неконтролируемому выбросу лимфокинов (так называемый цитокиновый шторм), который трудно купировать. В этом случае относительная кратковременность жизни CAR-лимфоцитов, полученных методом трансфекции, в сочетании с возможностью их дозирования и дробного введения позволяет скорректировать лечение и смягчить побочные эффекты терапии. Напротив, при трансдукции формируется лимфоцитарная популяция, в которой трансгены стабильно и произвольно интегрированы в хромосомы, что создает в том числе риск некон-

тролируемой пролиферации и длительной экспрессии конструкции CAR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании был достигнут выраженный противоопухолевый эффект после применения карплазмиды (РЭА-CAR-T) (в экспериментальной группе 80 % мышей выжили, тогда как в контрольной группе 100 % мышей погибли), зафиксирована большая продолжительность жизни в экспериментальных группах по сравнению с контрольной. В группе, получавшей терапию карплазмином, выживаемость на момент гибели всех мышей в контрольной группе составила 80 %, у 40 % мышей наблюдалась полная ремиссия без признаков определяемой опухоли в сроки наблюдения более 3 мес. Показано, что CAR-лимфоциты длительно сохраняются в брюшной полости. Использование электропорации при получении карплазмиды создает возможность оптимизации вводимой дозы препарата в повторных инъекциях с учетом ответа реципиента, что позволяет снизить вероятность такого осложнения, как цитокиновый шторм, которое часто наблюдается при введении долгоживущих лимфоцитов, трансдуцированных лентивирусами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Arabi F., Torabi-Rahvar M., Shariati A. et al. Antigenic targets of CAR T cell therapy. A retrospective view on clinical trials. *Exp Cell Res* 2018;369(1):1–10. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.05.009
2. Brentjens R.J., Davila M.L., Riviere I. et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med* 2013;5(177):177ra38. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005930
3. Kuehn B.M. The promise and challenges of CAR-T gene therapy. *JAMA*. 2017;318(22):2167–9. DOI: 10.1001/jama.2017.15605
4. Bjerner J., Lebedin Y., Bellanger L. et al. Protein epitopes in carcinoembryonic antigen. Report of the ISOBM TD8 workshop. *Tumour Biol* 2002;23(4):249–62. DOI: 10.1159/000067255
5. Шишкин А.М. Разработка метода адоптивной иммунотерапии раково-эмбриональный антиген позитивных опухолей человека: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2015. 22 с. Shishkin A.M. Development of the method of adaptive immunotherapy cancer-embryonic antigen of positive human tumors: abstract of the dissertation of the Candidate of Medical Sciences. Moscow, 2015. 22 p. (In Russ.).
6. Bojenko V.K., Shramova E.I., Shkoporov A.N. et al. Monomolecular chimeric T-cell receptor to a carcinoembryonic antigen. WO2013154458A2, 2013.
7. Bozhenko V.K., Shramova E.I., Shishkin A.M. et al. Characteristics of new monomolecular chimeric T-cell receptors to carcinoembryonic antigen. *Bull Exp Biol Med* 2013;156(1):165–71. DOI: 10.1007/s10517-013-2302-2
8. Skorka K., Ostapinska K., Malesa A. et al. The application of CAR-T cells in haematological malignancies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2020;68(6):34. DOI: 10.1007/s00005-020-00599-x
9. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 1999;9(2):67–81. DOI: 10.1006/scbi.1998.0119
10. Nap M., Mollgard K., Burtin P. et al. Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumour Biol* 1988;9(2–3):145–53. DOI: 10.1159/000217555
11. Boucher D., Courmoyer D., Stanners C.P. et al. Studies on the control of gene expression of the carcinoembryonic antigen family in human tissue. *Cancer Res* 1989;49(4):847–52.
12. Zhang C., Wang Z., Yang Z. et al. Phase I escalating-dose trial of CAR-T therapy targeting CEA(+) metastatic colorectal cancers. *Mol Ther* 2017;25(5):1248–58. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.03.010
13. Yoon S.H., Lee J.M., Cho H.I. et al. Adoptive immunotherapy using human peripheral blood lymphocytes transferred with RNA encoding Her-2/neu-specific chimeric immune receptor in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Gene Ther* 2009;16(6):489–97. DOI: 10.1038/cgt.2008.98
14. Barrett D.M., Zhao Y., Liu X. et al. Treatment of advanced leukemia in mice with mRNA engineered T cells. *Hum Gene Ther* 2011;22(12):1575–86. DOI: 10.1089/hum.2011.070
15. Mitchell D.A., Nair S.K. RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2000;106(9):1065–9. DOI: 10.1172/JCI11405
16. Emtage P.C., Lo A.S., Gomes E.M. et al. Second-generation anti-carcinoembryonic antigen designer T cells resist activation-induced cell death, proliferate on tumor contact, secrete cytokines, and exhibit superior antitumor activity in vivo: a preclinical evaluation. *Clin Cancer Res* 2008;14(24):8112–22. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4910
17. Wang X., Riviere I. Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Mol Ther Oncolytics* 2016;3:16015. DOI: 10.1038/mt.2016.15

Благодарность. Авторы выражают благодарность к.м.н., директору ООО «ХЕМА» Ю.С. Лебедину за предоставление клона мышиного антитела 3С1, специфичного к РЭА.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to Yu.S. Lebedin, Ph.D., Director of HEMA LLC, for providing a clone of the 3C1 mouse antibody specific to CEA.

Вклад авторов

В.К. Боженко: разработка концепции и дизайна исследования, научное консультирование, окончательное утверждение версии статьи;
А.М. Шишкин: оптимизация методов, проведение исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка чернового варианта статьи;
А.Н. Шкопоров: разработка CAR, оптимизация методов, проведение исследования, анализ и интерпретация данных;
Я.Ю. Киселева: написание текста статьи, редактирование;
Т.М. Кулинич: цитофлуориметрический анализ смывов с брюшной полости мышей;
Е.А. Кудинова: подбор доноров для получения лимфоцитов, анализ научной литературы по теме статьи, редактирование;
О.Б. Большакова: подготовка иллюстративного материала, анализ научной литературы по теме статьи;
В.А. Солодкий: научное консультирование, окончательное утверждение версии статьи.

Authors' contribution

V.K. Bozhenko: development of the concept and design of the study, scientific consultation, final approval of the version of the article;
A.M. Shishkin: optimization of methods, research, analysis and interpretation of data, preparation of a draft version of the article;
A.N. Shkoporov: CAR development, optimization of methods, research, data analysis and interpretation;
Y.Y. Kiseleva: article writing, editing;
T.M. Kulinich: cytofluorimetric analysis of washes from the abdominal cavity of mice;
E.A. Kudinova: selection of donors for obtaining lymphocytes, analysis of scientific literature on the topic of the article, editing;
O.B. Bolshakova: preparation of illustrative material, analysis of scientific literature on the topic of the article;
V.A. Solodky: scientific consulting, in the final approval of the version of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.К. Боженко / V.K. Bozhenko: <https://orcid.org/0000-0001-8351-8152>
А.М. Шишкин / A.M. Shishkin: <https://orcid.org/0000-0002-8934-2845>
А.Н. Шкопоров / A.N. Shkoporov: <https://orcid.org/0000-0002-5547-8672>
Я.Ю. Киселева / Y.Yu. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-8352-4787>
Т.М. Кулинич / T.M. Kulinich: <https://orcid.org/0000-0003-2331-5753>
О.Б. Большакова / O.B. Bolshakova: <https://orcid.org/0000-0001-8382-3579>
Е.А. Кудинова / E.A. Kudinova: <https://orcid.org/0000-0002-5530-0591>
В.А. Солодкий / V.A. Solodky: <https://orcid.org/0000-0002-1641-6452>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки России (проект #14.N08.11.0018).

Funding. The study was carried out with the support of the Ministry of Education and Science of Russia (project #14.N08.11.0018).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (9-го пересмотра, 2013 г.) и этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Протоколы исследования одобрены локальным этическим комитетом и этической комиссией ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России (протоколы № 9 от 27.09.2013 и № 2/14-Э от 17.02.2014).

Доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study was carried out in accordance with the Helsinki Declaration of 1964 (9th revision, 2013) and the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrates Used for Research and Other Scientific Purposes. The protocol of the study was approved by the local ethics committee and ethics commission of Russian Scientific Center of Radiology, Ministry of Health of the Russia (protocols No. 9 of 27.09.2013 and No. 2/14-E dated 17.02.2014).

Donors signed an informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 18.11.2022. **Принята к публикации:** 20.02.2023.

Article submitted: 18.11.2022. **Accepted for publication:** 20.02.2023.

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-87-93



Наследственный диффузный рак желудка, ассоциированный с неописанным герминальным вариантом с.1596G>A в гене *CDH1*

А.М. Данишевич¹, Т.С. Лисица², С.Э. Николаев¹, И.С. Абрамов³, М.Г. Филиппова², Н.И. Поспехова², А.М. Строганова², М.П. Никулин², А.Е. Калинин², И.С. Стилиди², Л.Н. Любченко^{4,5}

¹ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

³ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства; Россия, 119121 Москва, Погодинская ул., 10, стр. 1;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России»; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский пр-д, 3;

⁵Научно-исследовательский центр урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, 3-я Парковая ул., 51, стр. 1

Контакты: Анастасия Михайловна Данишевич danisham7@gmail.com

Рак желудка является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований во всем мире. Около 10 % пациентов с данной патологией сообщают об отягощенном семейном анамнезе; наследственную форму заболевания выявляют в 1–3 % случаев. Синдром наследственного диффузного рака желудка возникает в результате герминальных мутаций в гене *CDH1* и характеризуется высоким риском развития диффузного рака желудка у обоих полов и долькового рака молочной железы у женщин.

В статье приведен клинический случай диагностики и лечения пациента, 41 года, с диффузным раком желудка, у которого методом массового параллельного секвенирования (next generation sequencing, NGS) выявлена неописанная герминальная мутация с.1596G>A в гене *CDH1*, что позволило установить точный диагноз.

Ключевые слова: рак желудка, наследственный диффузный рак желудка, *CDH1*, вариант с.1596G>A, критерии генетического тестирования

Для цитирования: Данишевич А.М., Лисица Т.С., Николаев С.Э. и др. Наследственный диффузный рак желудка, ассоциированный с неописанным герминальным вариантом с.1596G>A в гене *CDH1*. Успехи молекулярной онкологии 2023;10(1):87–93. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-87-93

Hereditary diffuse gastric cancer associated with a novel germline variant с.1596G>A in the *CDH1* gene

A.M. Danishevich¹, T.S. Lisitsa², S.E. Nikolaev¹, I.S. Abramov³, M.G. Filippova², N.I. Pospekhova², A.M. Stroganova², M.P. Nikulin², A.E. Kalinin², I.S. Stilidi², L.N. Lyubchenko^{4,5}

¹A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; 86 Shosse Ehntuziastov, Moscow 111123, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

³Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency; Bld. 1, 10 Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russia;

⁴National Medical Research Center for Radiology, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinsky proezd, Moscow 125284, Russia;

⁵N.A. Lopatkin Research Center for Urology and Interventional Radiology – branch of the National Medical Research Center for Radiology, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 51 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia

Contacts: Anastasia Mikhailovna Danishevich danisham7@gmail.com

Gastric cancer is one of the most common malignancies worldwide. Approximately 10 % of patients with gastric cancer are characterized by accumulation of gastric cancer cases in their family. The hereditary forms of gastric cancer account for 1–3 % of all gastric cancer cases. Hereditary diffuse GC syndrome is caused by germline mutations in *CDH1* gene and determines a high risk of developing diffuse GC and lobular breast cancer. In this article, we present a clinical case of a 41-year-old patient with diffuse gastric cancer, who was found to be a carrier of novel germline mutation in the *CDH1* gene. Next-generation sequencing (NGS) has facilitated an identification of *CDH1* c.1596G>A genetic variant, thus enabling an accurate clinical diagnosis hereditary diffuse gastric cancer.

Keywords: gastric cancer, hereditary diffuse gastric cancer, *CDH1*, c.1596G>A variant, genetic testing criteria

For citation: Danishevich A.M., Lisitsa T.S., Nikolaev S.E. et al. Hereditary diffuse gastric cancer associated with a novel germline variant c.1596G>A in the *CDH1* gene. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2023;10(1):87–93. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-1-87-93

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований во всем мире. В Российской Федерации ежегодно выявляется около 36 тыс. новых случаев данной патологии, большинство из которых диагностируются на III–IV стадии (60,7 %) [1]. Преимущественно РЖ носит спорадический характер и возникает под влиянием факторов внешней среды, питания, курения, инфицирования *H. pylori*. Около 10 % больных РЖ сообщают об отягощенном семейном анамнезе, однако наследственную форму заболевания удается установить в 1–3 % случаев [2]. Среди основных наследственных форм РЖ выделяют наследственный диффузный РЖ (НДРЖ), аденокарциному желудка с проксимальным полипозом, семейный РЖ кишечного типа [3]. Кроме того, известен ряд других наследственных опухолевых синдромов (НОС), при которых также отмечен повышенный риск развития РЖ: синдром Пейтца–Егерса, ювенильный полипоз, синдром наследственного рака молочной железы (РМЖ) и яичников, *TP53*-ассоциированный опухолевый синдром, семейный аденоматозный полипоз, *MUT*-ассоциированный полипоз и некоторые другие [4].

Синдром НДРЖ (OMIM#137215, GASTRIC CANCER, HEREDITARY DIFFUSE; HDGC) является наиболее изученным НОС и обуславливает высокий риск развития диффузного РЖ (ДРЖ) у обоих полов и долькового РМЖ у женщин. Наследственный ДРЖ характеризуется аутосомно-доминантным типом наследования и высокой пенетрантностью. В большинстве случаев причиной НДРЖ является носительство герминальной мутации в гене-онкосупрессоре *CDH1*, который кодирует трансмембранный белок E-кадгерин, относящийся к кальций-зависимым кадгеринам [5]. Реже встречаются мутации во 2-м белке межклеточной адгезии, α -катенине (ген *CTNNA1*) [6]. Первые НДРЖ был описан в семье маори из Новой Зеландии в 1998 г. В настоящее время в России частота носительства мутаций в гене *CDH1* не установлена, во всем мире она составляет 5–10 случаев на 100 тыс. новорожденных.

Ген *CDH1* включает 16 экзонов. Кодирующая область *CDH1* ответственна за синтез сигнальных пепти-

дов кадгерин-*PRE* и кадгерин-*PRO*, 5 кальций-связывающих внеклеточных повторяющихся доменов кадгерина (домены 1–5EC) и внутриклеточной цитоплазматической области *CDH1* (включая области связывания с p120- и β -катенином) (рис. 1a). Цитоплазматический домен E-кадгерина образует белковый комплекс с β -, p120- и α -катенинами, который связывает эту молекулу с актин-миозиновой сетью, координируя форму и полярность клеток в эпителии. Кроме того, посредством активации сигнальных путей и экспрессии генов E-кадгерин участвует в поддержании стабильности клеточной структуры, межклеточной адгезии, тканевой дифференцировки, пролиферации, выживаемости и миграции клеток [7]. Изменения экспрессии E-кадгерина или структурные модификации гена *CDH1* являются пусковым механизмом эпителиально-мезенхимального перехода и прогрессирования рака [8].

Описанные на сегодняшний день клинически значимые мутации в гене *CDH1* затрагивают все функциональные домены белкового продукта, однако в некоторых публикациях описаны так называемые «горячие точки» – единичные повторяющиеся в 4 и более семьях патогенные варианты c.1003C>T, c.1212delC, c.1792C>T, c.2398delC c.1008G>T, c.1137G>A и c. 1679C>G [9]. Интересно, что наиболее частым событием биаллельной инактивации в опухолях НДРЖ является гиперметилирование 2-го аллеля гена *CDH1*, тогда как 2-я мутация, по-видимому, встречается реже [10].

Клинический фенотип НДРЖ демонстрирует значительную гетерогенность. По различным данным, нарушение экспрессии белка E-кадгерина в результате мутации гена *CDH1* приводит к риску развития НДРЖ в 40–70 % и 56–83 % случаев у мужчин и женщин в возрасте до 80 лет соответственно [11]. Средний возраст манифестации заболевания составляет около 38 лет, однако может варьировать даже в пределах одной семьи [12]. При гистологическом исследовании у бессимптомных носителей мутации в гене *CDH1* в большинстве случаев выявляют множественные микроскопические очаги внутрислизистой (pT1a) перстневидно-клеточной *in situ* карциномы с педжетоидным распространением. Ранний рак демонстрирует отсутствие иммуноэкспрессии белков Ki-67 и p53. Прогрессирующий НДРЖ

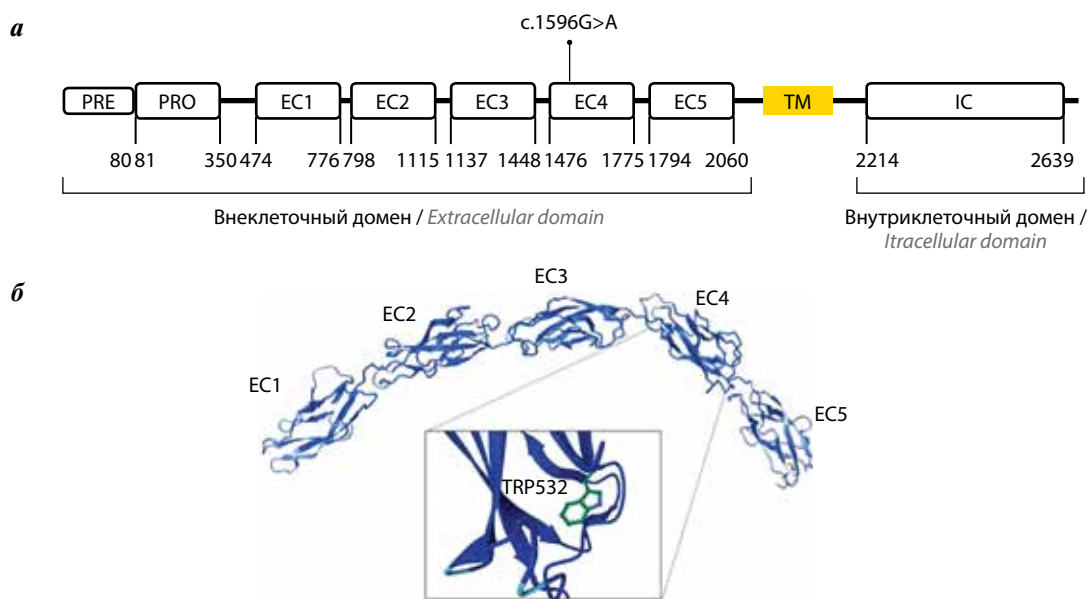


Рис. 1. Положение мутации *c.1596G>A* в гене *CDH1* и визуализация 3D-структуры белка *E*-кадгерин: а – структура гена *CDH1* и мутация *c.1596G>A*; б – положение варианта *c.1596G>A* в структуре белка *E*-кадгерин

Fig. 1. Position of *c.1596G>A* in the *CDH1* gene and 3D visualization of the *E*-cadherin protein structure: а – structure of the *CDH1* gene and mutation *c.1596G>A*; б – mutation *c.1596G>A* in the *E*-cadherin protein

имеет плохой прогноз и представлен лinitis plastica – инвазивной карциномой низкокогезивного/диффузного типа, обычно с малым количеством типичных перстневидных клеток, характеризующийся утолщением и ригидностью стенки желудка. Распространенные карциномы (pT>1) проявляют «агрессивный» фенотип с плеоморфными клетками, которые иммунореактивны к Ki-67 и p53 [13]. Кроме риска развития РЖ, у женщин значительно повышен риск возникновения дольчатого РМЖ, который в течение жизни составляет 42 %. Для женщин совокупный риск развития диффузной карциномы желудка и РМЖ к 80 годам достигает 90 % [14]. Также описаны случаи *CDH1*-ассоциированного рака толстой кишки, однако степень риска возникновения злокачественных новообразований данной локализации на сегодняшний день не определена.

Ниже представлен клинический случай диагностики и лечения пациента с ДРЖ.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Пациент Ф., 41 года, направлен в Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина для дообследования и лечения в связи с подозрением на новообразование желудка. В ходе комплексного обследования выполнена эзофагогастродуоденоскопия (ЭГДС), при которой в дистальном направлении по задней стенке желудка и в направлении большой кривизны выявлен инфильтративно-язвенный очаг и заподозрен рак проксимального отдела желудка с переходом на розетку кардии. При диагностической лапароскопии асцит и метастазы по брюшине не обнаружены. В ходе цитологического исследования смывов брюшной полости

в пределах полученного материала опухолевых клеток не выявлено. При иммуногистохимическом исследовании экспрессия рецептора *HER2-neu* (*HER2* – human epidermal growth factor receptor 2) не обнаружена. Установлен диагноз «рак тела и проксимального отдела желудка с переходом на проксимальный отдел пищевода, T4aN1M0, IIIA стадия».

В связи с ранним возрастом манифестации РЖ пациент направлен на консультацию к врачу-генетику. В ходе анализа семейной истории больной сообщил о единичном случае РЖ у родственника 3-й степени родства в пожилом возрасте. Для исключения наследственной формы РЖ пациент направлен на молекулярно-генетическое исследование панели генов, ассоциированных с НДРЖ и другими НОС.

В рамках научно-исследовательской работы по созданию национальной базы данных для диагностики наследственных форм онкологических заболеваний методом массового параллельного секвенирования (*next generation sequencing*, NGS) в лаборатории разработки новых методов молекулярной диагностики заболеваний человека Центра постгеномных исследований ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» выполнено исследование панели генов, ассоциированных с НОС, включающей ген *CDH1*. Протоподготовка, биоинформатическая обработка и оценка клинической значимости вариантов нуклеотидной последовательности выполнены, как было описано ранее [15].

В результате ДНК-диагностики в 11-м экзоне гена *CDH1* (NM_004360.5) выявлен вариант нуклеотидной последовательности *chr16:68819310G>A* (*c.1596G>A*, *p.Trp532Ter*) в гетерозиготной форме. Выявленный

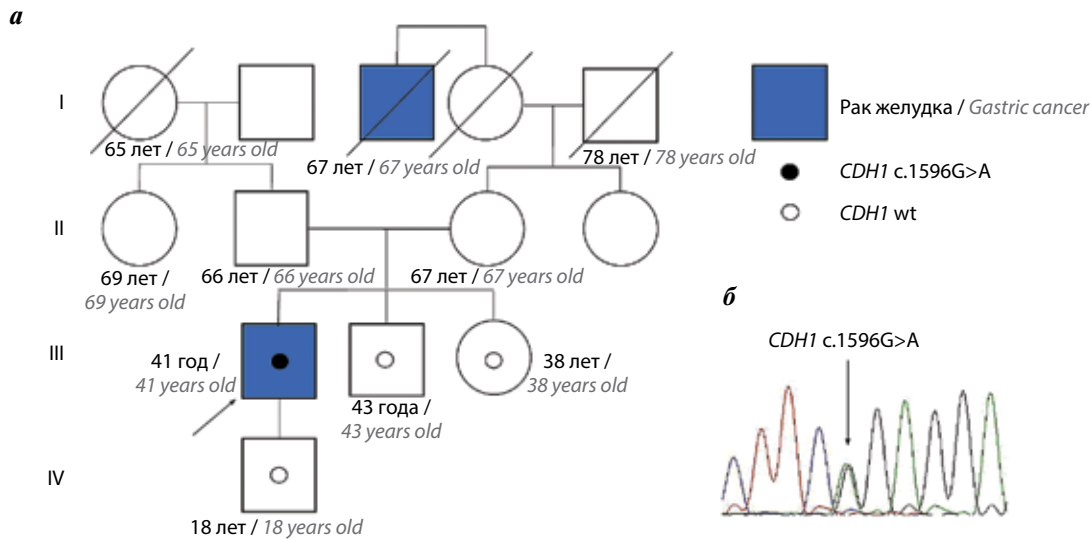


Рис. 2. Родословная и секвенирограмма гена *CDH1* пациента Ф.: а – родословная больного; б – секвенирограмма участка гена *CDH1* с заменой гуанина на аденин в 1596-м положении

Fig. 2. Pedigree and Sanger sequencing results of the *CDH1* gene in patient F.: а – pedigree of the patient; б – sequence of the *CDH1* gene with the replacement of guanine with adenine at position 1596

вариант ранее не описан в базах данных популяционных частот *gnomAD Exomes* и *gnomAD Genomes*. Замена гуанина на аденин в 1596-й позиции приводит к возникновению стоп-кодона и преждевременной остановке синтеза белка, и, согласно рекомендациям Американского колледжа медицинской генетики и геномики (*American College of Medical Genetics and Genomics*), данный вариант классифицирован как патогенный (*PVS1, PM2*). Наличие мутации подтверждено методом секвенирования по Сэнгеру (рис. 2б). Пациенту установлен диагноз НДРЖ. С учетом аутосомно-доминантного типа наследования риск передачи герминального варианта *c.1596G>A* потомству составляет 50%. Вероятность наличия данной мутации у брата и сестры зависит от статуса родителей, которые отказались от проведения ДНК-диагностики. Для оценки сегрегации данного варианта в семье выполнено молекулярно-генетическое обследование сибсов и сына пробанда, в генотипе которых мутация *c.1596G>A* не выявлена (см. рис. 2б).

В рамках комбинированного лечения в период с января по март 2021 г. пациенту проведены 4 курса полихимиотерапии по схеме FLOT. При контрольном обследовании (март 2021 г.) выполнена эндоскопическая ультрасонография, в ходе которой на уровне 39 см от резцов определена проксимальная граница гипоехогенной опухоли, исходящей из слизистой оболочки и распространяющейся на все слои стенки желудка. Узурации серозной оболочки не отмечено. У проксимального края опухоли толщина стенки пищевода составляла 0,7 см, протяженность поражения – 2,5 см. Рентгенологически проксимальная граница опухолевого поражения пищевода – на уровне абдоминального сегмента. Просвет пищевода сужен на 1/2, супрастенотического расширения не выявлено. При компьютерной томографии в сравнении с рентгеновской компьютерной томографией от 19.12.2020

отмечены уменьшение утолщения верхней трети стенки тела желудка с 2,3–3,0 см до 1,2 см, незначительное уплощение и тяжесть парагастральной клетчатки. Размеры всех ранее определяемых парагастральных лимфатических узлов (ЛУ) уменьшились: вдоль малой кривизны желудка (по ходу левой желудочной артерии) с 0,8–0,9 см до 0,3–0,6 см по короткой оси. В воротах печени определялись плоские ЛУ размерами до 1,6 × 0,8 см; забрюшинные ЛУ не увеличены (единичные ЛУ сохранялись без динамики – до 0,6 см по короткой оси). По данным ЭГДС существенных изменений не выявлено.

С учетом положительной динамики 08.04.2021 были проведены гастрэктомия, лимфаденэктомия D2, резекция абдоминального сегмента пищевода. При гистологическом исследовании послеоперационного препарата в желудке определялась инфильтративно-язвенная опухоль размерами 5,0 × 3,0 см, представленная очагами фиброза и единичными комплексами клеток, с разрастаниями низкодифференцированной (низкокогезивной) карциномы G₃. Отмечены признаки лечебного патоморфоза I (по Лавниковой) и IV (по Mandard) степеней; опухоль проросла все слои стенки желудка и врастала в жировую ткань. По классификации Lauren – диффузный рак. Достоверных признаков сосудистой и периневральной инвазий не выявлено, в краях резекции пищевода и желудка элементов опухолевого роста не обнаружено. В 1 из 15 ЛУ выявлены метастазы опухоли, представленные очагами фиброза со скоплениями ксантомных клеток, гемосидерофагов – признаки лечебного патоморфоза метастаза опухоли IV степени. В 4 ЛУ большой кривизны элементов опухолевого роста не определялось. С мая по август 2021 г. продолжена полихимиотерапия в режиме FLOT (до 4 курсов).

На сегодняшний день пациент находится под динамическим наблюдением.

ОБСУЖДЕНИЕ

Повышение доступности методов молекулярно-генетической диагностики привело к значительному росту идентификации больных НДРЖ. На сегодняшний день в гене *CDH1* зарегистрирован 321 клинически значимый вариант: 249 патогенных и 72 вероятно патогенных. Их наибольшее количество представлено мутациями со сдвигом рамки считывания (128 вариантов), нонсенс-мутациями (73 варианта), реже – мутациями в сайтах сплайсинга (19 вариантов), миссенс-мутациями (14 вариантов), синонимичными заменами (7 вариантов), вариантами с потерей старта (5 вариантов), инсерционно-делеционными нарушениями (1 вариант). Кроме того, описаны мутации вне кодирующих экзонов (2 варианта); большие делеции от 357 пар оснований до 175 килобаз (включая экзоны) встречались редко [16]. Терминирующие варианты, такие как выявленный нами вариант с.1596G>A (р. Trp532Ter), приводят к полной потере экспрессии E-кадгерина из-за возникновения преждевременного стоп-кодона, укорочения белка, оказывая патогенное влияние. Ранее мутация с.1596G>A в гене *CDH1* описана как соматическая в клетках опухоли пищевода [17]. Дополнительные функциональные исследования для подтверждения каузативности варианта, как правило, требуются при выявлении миссенс-мутаций в гене *CDH1* (20 % случаев), приводящих к образованию полноразмерных молекул E-кадгерина, влияние которых на функцию белка непредсказуемо [18].

Согласно рекомендациям Международного консорциума по раку желудка (International Gastric Cancer Linkage Consortium, IGCLC), проведение профилактической гастрэктомии в возрасте 20–30 лет остается основным методом первичной профилактики НДРЖ у носителей патогенных герминальных мутаций в гене *CDH1* [19]. С учетом неполной пенетрантности и значительной клинической гетерогенности заболевания гастрэктомия носит рекомендательный характер и остается предметом дискуссий. В связи с широким диапазоном возраста манифестации НДРЖ (описаны случаи НДРЖ в 14 и 85 лет) было предположено, что на развитие определенного фенотипа кроме типа мутации может влиять локализация нарушения [20]. Для определения фено-генотипических ассоциаций W. Lo и соавт. использовали программный инструмент I-TASSER, который позволяет визуализировать модель структуры белка при возникновении «усекающих» мутаций (truncating mutations), приводящих к укорочению синтезируемого белка, в известных функциональных доменах гена *CDH1*. Так, некоторые варианты в кадгерине-PRO приводят к укорочению белка с потерей всех ключевых доменов за пределами положения мутации, тогда как при мутации в домене IC белок способен интегрироваться в клеточную мембрану и связываться с p120, но будет лишен возможности связывания с β-катенином. Вариант с.1596G>A располагается в домене EC4 (см. рис. 1). С учетом того, что

C-концевые домены кадгерина EC3, EC4 и EC5 отвечают за гетеродимеризацию с другими молекулами адгезии или рецепторными тирозинкиназами, вероятно, возникновение замены с.1596G>A может привести к нарушению этой функции, что повлечет за собой потерю межклеточной адгезии [9, 21]. W. Lo и соавт. провели систематический анализ и проследили фено-генотипические корреляции у 152 пациентов с мутацией в гене *CDH1*. Авторы отметили, что в семьях с «укорачивающими» вариантами в C-концевых доменах EC3/4/5 ДРЖ манифестировал после 40 лет [9]. В описанном нами случае вариант с.1596G>A привел к возникновению у пациента ДРЖ в возрасте 41 года. В исследовании P.R. Venusiglio и соавт. у больного ДРЖ 44 лет описан патогенный вариант с.1595G>A, находящийся в соседнем нуклеotide с выявленным нами вариантом с.1596G>A. Данный вариант также приводит к формированию преждевременного стоп-кодона в 523-м положении, терминации синтеза белка и характеризуется как патогенный. Как и в нашем случае, P.R. Venusiglio и соавт. отмечают отсутствие злокачественных новообразований в семейном анамнезе обследованного пациента [22]. Упоминание о повреждающем характере мутации с.1595G>A содержится в работе T.L. Mastracci и соавт., в ходе которой были исследованы опухолевые образцы долькового РМЖ [23]. С учетом отказа родителей пробанда от ДНК-диагностики оценить пенетрантность варианта с.1596G>A в описанной нами семье затруднительно, поскольку не исключен *de novo* характер мутации.

Накопление данных о клинических особенностях НДРЖ привело к пересмотру IGCLC критериев 2015 г. по отбору лиц, нуждающихся в исследовании мутаций гена *CDH1*. Например, в работе M.F. Jacobs и соавт. у 7 из 20 носителей мутации в гене *CDH1* семейный анамнез был не отягощен, картина заболевания не отвечала существующим критериям отбора [24]. K. Lowstuter и соавт. выполнили исследование 26936 образцов крови пациентов, у 16 (0,06 %) из которых выявили наличие патогенных мутаций в этом гене. В 4 (1,0 %) случаях наблюдался инвазивно-протоковый РМЖ, в 1 (5 %) – сочетание инвазивного протокового рака и дольковой карциномы молочной железы, в 1 (5,0 %) – рак толстой кишки. В целом 65 % обследованных также не соответствовали критериям отбора [25]. Основным отличием критериев IGCLC, опубликованных в 2020 г., стало повышение возраста ДНК-диагностики пациентов с ДРЖ, подлежащих тестированию на наличие мутаций в гене *CDH1*, с 40 до 50 лет [26]. Это изменение позволило нам выявить новый патогенный вариант, пополнив перечень мутаций в гене *CDH1*, и имело ключевую роль в постановке окончательного диагноза НДРЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Массовое параллельное секвенирование является незаменимым и эффективным методом поиска герминальных мутаций при подозрении на наличие НОС, в том

числе при диффузной карциноме желудка. Благодаря этому методу нами выявлен ранее не представленный в международных базах данных и мировой литературе патогенный герминальный вариант с.1596G>A в гене *CDH1*.

ДНК-диагностика у пациентов с клиническими признаками НРЖ определяет стратегию лечения

и прогноз течения заболевания. Своевременное выявление здоровых обладателей мутации в гене *CDH1* открывает возможности индивидуализированного ведения больных, профилактики ДРЖ, и, как следствие, снижения уровня заболеваемости раком.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, О.А. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 239 с. Malignant neoplasms in Russia in 2021. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, O.A. Shahzadova. Moscow: P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2022. 239 p. (In Russ.).
2. Van der Post R.S., Vogelaaar I.P., Carneiro F. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: Updated clinical guidelines with an emphasis on germline *CDH1* mutation carriers. *J Med Genet* 2015;52(6): 361–74. DOI: 10.1136/JMEDGENET-2015-103094
3. Assumpção P., Araújo T., Khayat A. et al. Hereditary gastric cancer: three rules to reduce missed diagnoses. *World J Gastroenterol* 2020;26(13):1382–93. DOI: 10.3748/WJG.V26.I13.1382
4. Setia N., Clark J.W., Duda D.G. et al. Gastrointestinal cancer familial gastric cancers. *Oncologist* 2015;20(12):1365–77. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0205
5. Hansford S., Kaurah P., Li-Chang H. et al. Hereditary diffuse gastric cancer syndrome: *CDH1* mutations and beyond. *JAMA Oncol* 2015;1(1):23–32. DOI: 10.1001/JAMAONCOL.2014.168
6. Lobo S., Benusiglio P.R., Coulet F. et al. Cancer predisposition and germline *CTNNA1* variants. *Eur J Med Genet* 2021;64(10):104316. DOI: 10.1016/J.EJMG.2021.104316
7. Godwin T.D., Kelly S.T., Brew T.P. et al. E-cadherin-deficient cells have synthetic lethal vulnerabilities in plasma membrane organisation, dynamics and function. *Gastric Cancer* 2019;22(2):273–86. DOI: 10.1007/S10120-018-0859-1
8. Paredes J., Figueiredo J., Albergaria A. et al. Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826(2):297–311. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.05.002
9. Lo W., Zhu B., Sabesan A. et al. Associations of *CDH1* germline variant location and cancer phenotype in families with hereditary diffuse gastric cancer (HDGC). *J Med Genet* 2019;56(6):370–9. DOI: 10.1136/jmedgenet-2018-105361
10. Grady W.M., Willis J., Guilford P.J. et al. Methylation of the *CDH1* promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 2000;26(1):16–7. DOI: 10.1038/79120
11. Hansford S., Kaurah P., Li-Chang H. et al. Hereditary diffuse gastric cancer syndrome: *CDH1* mutations and beyond. *JAMA Oncol* 2015;1(1):23–32. DOI: 10.1001/JAMAONCOL.2014.168
12. Kaurah P., MacMillan A., Boyd N. et al. Founder and recurrent *CDH1* mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA* 2007;297(21):2360–72. DOI: 10.1001/JAMA.297.21.2360
13. Van der Post R.S., Gullo I., Oliveira C. et al. Histopathological, molecular, and genetic profile of hereditary diffuse gastric cancer: current knowledge and challenges for the future. *Adv Exp Med Biol* 2016;908:371–91. DOI: 10.1007/978-3-319-41388-4_18
14. Pharoah P.D.P., Guilford P., Caldas C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in *CDH1* (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* 2001;121(6):1348–53. DOI: 10.1053/gast.2001.29611
15. Абрамов И.С., Лисица Т.С., Строганова А.М. и др. Диагностика наследственных опухолевых синдромов методом высокопроизводительного секвенирования. Опыт создания базы данных. *Клиническая практика* 2021;12(2):36–42. DOI: 10.17816/clinpract76383
16. Abramov I.S., Lisitsa T.S., Stroganova A.M. et al. Diagnostics of hereditary cancer syndromes by NGS. Process of creating a database. *Klinicheskaya praktika = Clinical practice* 2021;12(2): 36–42. (In Russ.). DOI: 10.17816/clinpract76383
17. Oliveira C., Senz J., Kaurah P. et al. Germline *CDH1* deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. *Hum Mol Genet* 2009;18(9):1545–55. DOI: 10.1093/hmg/ddp046
18. Hoang T., Ganesan A., Hiyama D. et al. Gene mutations distinguishing gastric from colorectal and esophageal adenocarcinomas. *J Gastrointest Oncol* 2020;11(1):45–54. DOI: 10.21037/jgo.2019.12.06
19. Melo S., Figueiredo J., Fernandes M.S. et al. Predicting the functional impact of *CDH1* missense mutations in hereditary diffuse gastric cancer. *Int J Mol Sci* 2017;18(12):1–18. DOI: 10.3390/ijms18122687
20. Blair V.R., McLeod M., Carneiro F. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical practice guidelines. *Lancet Oncol* 2020;21(8):38697. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30219-9
21. Gullo I., Devezas V., Baptista M. et al. Phenotypic heterogeneity of hereditary diffuse gastric cancer: report of a family with early-onset disease. *Gastrointest Endosc* 2018; 87(6):1566–75. DOI: 10.1016/j.gie.2018.02.008
22. Yasmeeen A., Bismar T., Moustafa A. et al. ErbB receptors and complex in human carcinomas. *Future Oncol* 2006;2(6):765–81. DOI: 10.2217/14796694.2.6.765
23. Benusiglio P.R., Malka D., Rouleau E. et al. *CDH1* germline mutations and the hereditary diffuse gastric and lobular breast cancer syndrome: a multicentre study. *J Med Genet* 2013;50(7):486–9. DOI: 10.1136/JMEDGENET-2012-101472
24. Mastracci T.L., Tjan S., Bane A.L. et al. E-cadherin alterations in atypical lobular hyperplasia and lobular carcinoma *in situ* of the breast. *Mod Pathol* 2005;18(6):741–51. DOI: 10.1038/modpathol.3800362
25. Jacobs M.F., Dust H., Koeppel E. et al. Outcomes of endoscopic surveillance in individuals with genetic predisposition to hereditary diffuse gastric cancer. *Gastroenterology* 2019;157(1):87–96. DOI: 10.1053/J.GASTRO.2019.03.047
26. Lowstuter K., Espenschied C.R., Sturgeon D. et al. Unexpected *CDH1* mutations identified on multigene panels pose clinical management challenges. *JCO Precis Oncol* 2017;(1):1–12. DOI: 10.1200/PO.16.00021
27. Ford J.M. Totally unexpected: nonsyndromic *CDH1* mutations and hereditary diffuse gastric cancer syndrome. *JCO Precis Oncol* 2017;1:1–2. DOI: 10.1200/po.17.00006

Вклад авторов

А.М. Данишевич: сбор биологических образцов, медико-генетическое консультирование, анализ данных массового параллельного секвенирования, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи;
Т.С. Лисица, И.С. Абрамов: выделение нуклеиновых кислот, разработка и оптимизация методов, подготовка библиотек и проведение массового параллельного секвенирования, редактирование;
М.Г. Филиппова: медико-генетическое консультирование, редактирование;
Н.И. Поспехова, А.М. Строганова: дизайн праймеров, проведение секвенирования по Сэнгеру, анализ сиквенсов;
М.П. Никулин, А.Е. Калинин: получение биологических образцов, сбор клинических данных;
С.Э. Николаев: биоинформатическая обработка и анализ данных высокопроизводительного секвенирования, подготовка иллюстративного материала, редактирование;
И.С. Стилиди, Л.Н. Любченко: редактирование.

Authors' contributions

A.M. Danishevich: collection of biological samples, medical genetic counseling, analysis of high-throughput sequencing data, preparation of illustrative material, article writing;
T.S. Lisitsa, I.S. Abramov: nucleic acid isolation, development and optimization of methods, library preparation and NGS sequencing, preparation of illustrative material, editing;
M.G. Filippova: medical genetic counseling, editing;
N.I. Pospekhova, A.M. Stroganova: primers design, Sanger sequencing, sequence analysis;
M.P. Nikulin, A.E. Kalinin: obtaining biological samples, collecting clinical data;
S.E. Nikolaev: bioinformatics processing and analysis of high-throughput sequencing data, preparation of illustrative material, editing;
I.S. Stilidi, L.N. Lyubchenko: editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.М. Данишевич / A.M. Danishevich: <https://orcid.org/0000-0002-3573-8342>
Т.С. Лисица / T.S. Lisitsa: <https://orcid.org/0000-0002-6212-7627>
И.С. Абрамов / I.S. Abramov: <https://orcid.org/0000-0002-6954-1564>
М.Г. Филиппова / M.G. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-1882-2214>
Н.И. Поспехова / N.I. Pospekhova: <https://orcid.org/0000-0001-5255-5065>
А.М. Строганова / A.M. Stroganova: <https://orcid.org/0000-0002-7297-5240>
М.П. Никулин / M.P. Nikulin: <https://orcid.org/0000-0002-9608-4696>
А.Е. Калинин / A.E. Kalinin: <https://orcid.org/0000-0001-7457-3889>
С.Э. Николаев / S.E. Nikolaev: <https://orcid.org/0000-0003-0673-3590>
И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-5229-8203>
Л.Н. Любченко / L.N. Lyubchenko: <https://orcid.org/0000-0003-4775-3299>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Пациент подписал информированное согласие на публикацию своих данных.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The patient gave written informed consent to the publication of his data.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках государственного задания № АААА-А20-120111690063-8/221031200167-1/ 222031100003-2.

Funding. The study was carried out with a support of the state assignment № АААА-А20-120111690063-8/221031200167-1/ 222031100003-2.

Статья поступила: 19.11.2022. Принята к публикации: 16.02.2023.

Article submitted: 19.11.2022. Accepted for publication: 16.02.2023.

При направлении статьи в редакцию журнала «Успехи молекулярной онкологии» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами.

1. Общие правила

Статья должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором проведена данная работа. **Бланк сопроводительного письма** (заполненный, подписанный всеми авторами, с подписью руководителя и круглой печатью учреждения) отсканировать и загрузить как дополнительный файл при подаче рукописи в редакцию (в формате *.pdf или *.jpg). Файл назвать «... (фамилия, инициалы) первого автора. Сопроводительное письмо». Для каждой указанной в рукописи организации необходимо представить отдельное сопроводительное письмо.

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- название статьи,
- инициалы и фамилии всех авторов,
- ученые степени, звания, должности, место работы каждого из авторов, а также их ORCID (при наличии),
- полное название учреждения (учреждений), в котором (которых) выполнена работа,
- адрес учреждения (учреждений) с указанием индекса.

Последняя страница должна содержать:

- Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - фамилия, имя, отчество полностью,
 - занимаемая должность,
 - ученая степень, ученое звание,
 - персональный международный идентификатор ORCID (подробнее: <http://orcid.org/>),
 - персональный идентификатор в РИНЦ (подробнее: http://elibrary.ru/projects/science_index/author_tutorial.asp),
 - контактный телефон,
 - рабочий адрес с указанием индекса,
 - адрес электронной почты.
- Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в форматах doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, кегль 14, межстрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы. Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (без учета иллюстраций и списка литературы)

Оригинальная статья – не более 12 страниц (большой объем допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции).

Описание клинических случаев – не более 8 страниц.

Обзор литературы – не более 20 страниц.

Краткие сообщения и письма в редакцию – 3 страницы.

5. Резюме

Ко всем видам статей на отдельной странице должно быть приложено резюме на русском и английском (по возможности) языках. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики.

Объем резюме – не более 2500 знаков, включая пробелы. Резюме не должно содержать ссылки на источники литературы и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются ключевые слова на русском и английском (по возможности) языках в количестве от 3 до 10.

6. Структура статей

Оригинальная статья должна содержать следующие разделы:

- введение,
- цель,
- материалы и методы,
- результаты,
- обсуждение,
- заключение (выводы),
- вклад всех авторов в работу,
- конфликт интересов для всех авторов (в случае его отсутствия необходимо указать: «Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов»),
- одобрение протокола исследования комитетом по биоэтике (с указанием номера и даты протокола),

– информированное согласие пациентов (для статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев),

– при наличии финансирования исследования – указать его источник (грант и т. д.),

– благодарности (раздел не является обязательным).

7. Иллюстративный материал

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в форматах TIFF, JPG с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм).

Рисунки, графики, схемы, диаграммы должны быть редактируемыми, выполненными средствами Microsoft Office Excel или Office Word.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подрисуночными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т. д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т. д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подрисуночной подписи. Подписи к рисункам даются на русском и английском языках на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле. Все надписи на рисунках также должны быть переведены на английский язык.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Вся информация, содержащаяся в таблице, включая ее название и примечание (если есть), должна быть переведена на английский язык.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ).

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, полимеразная цепная реакция (ПЦР)).

9. Список литературы

На следующей после текста странице статьи должен располагаться список цитируемой литературы.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по порядку цитирования в тексте статьи, не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках начиная с 1 (например, [5]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях – не более 20–25, в обзорах литературы – не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники, цитирование одного автора по работе другого недопустимо.

Включение в список литературы тезисов возможно исключительно при ссылке на иностранные (англоязычные) источники.

Ссылки на диссертации и авторефераты, неопубликованные работы, а также на данные, полученные из неофициальных интернет-источников, не допускаются.

Для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском в тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

При ссылке на **статьи из журналов** после авторов указывают название статьи, название журнала, год, том, номер выпуска, страницы, DOI статьи (при наличии). При ссылке на **монографии** указывают также полное название книги, место издания, название издательства, год издания, число страниц. В ссылках на русскоязычные источники необходимо дополнительно указывать информацию для цитирования на латинице.

Статьи, не соответствующие данным требованиям, к рассмотрению не принимаются.

Общие положения:

- Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.
- Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной.
- Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.
- Редакция не предоставляет авторские экземпляры журнала. Номер журнала можно получить на общих основаниях (см. информацию на сайте).

Материалы для публикации принимаются по адресу онлайн на сайте <http://umo.abvpress.ru/jour>.

Полная версия требований представлена на сайте журнала.

